



HAL
open science

Rôle de la phosphorylation PKA-dépendante de la Sérine2030 du RyR2 lors de la réponse β -adrénergique dans le pacemaker cardiaque

Ana Maria Gómez

► To cite this version:

Ana Maria Gómez. Rôle de la phosphorylation PKA-dépendante de la Sérine2030 du RyR2 lors de la réponse β -adrénergique dans le pacemaker cardiaque. Sciences du Vivant [q-bio]. Université paris-saclay, 2024. Français. \langle NNT : \rangle . \langle tel-05517648 \rangle

HAL Id: tel-05517648

<https://inserm.hal.science/tel-05517648v1>

Submitted on 18 Feb 2026

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

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



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

Rôle de la phosphorylation PKA-dépendante de la Sérine2030 du RyR2 lors de la réponse β - adrénergique dans le pacemaker cardiaque

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA),
Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie,

Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche Signalisation et physiopathologie cardiovasculaire
(Université Paris-Saclay, INSERM), sous la direction de **Ana-Maria GOMEZ**, directeur de
recherche Inserm

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 18 décembre 2024, par

Sarah TBOULL

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Saadia Kerdine-Römer Professeure, Université Paris-Saclay, Paris	Présidente & Examinatrice
Fabien BRETTE Chargé de recherche, HDR, Inserm, Université de Montpellier	Rapporteur & Examineur
Vincent JACQUEMOND Directeur de recherche, CNRS, Université Claude Bernard, Lyon	Rapporteur & Examineur
Matteo MANGONI Directeur de recherche, CNRS, Université de Montpellier	Examineur
Lucile MIQUEROL Directrice de recherche, CNRS, Université Aix-Marseille	Examinatrice

Titre : Rôle de la phosphorylation PKA-dépendante de la Ser2030 du RyR2 lors de la réponse β -adrénergique dans le pacemaker cardiaque.....

Mots clés : Récepteur à la ryanodine 2, phosphorylation, canaux calciques, automatisme cardiaque

Résumé : L'automatisme des cellules du Nœud sino-atrial (NSA) est régulé par un système de deux horloges couplées : l'horloge dite membranaire qui dépend principalement du courant I_f et l'horloge dite calcique qui dépend principalement des libérations de calcium (Ca^{2+}) du Récepteur à la ryanodine 2 (RyR2). Lors d'une réponse β -adrénergique, l'augmentation des taux en AMPc régule directement les canaux du courant $I_{f(HCN)}$. L'activation plus rapide de ces canaux conduit à l'accélération du rythme cardiaque lors d'un stress, dit effet chronotrope positif de la réponse sympathique. L'augmentation des taux en AMPc active également la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle les canaux impliqués dans l'automatisme des cellules du NSA dont notamment le RyR2. Ainsi, il est reconnu que le RyR2 est phosphorylé par la PKA lors de la réponse β -adrénergique mais les effets de cette phosphorylation restent encore mal compris. Le RyR2 est phosphorylé sur différentes sérines (S) identifiées à ce jour tels que les S2808 et S2030 qui sont des sites PKA-dépendants, et la S2814 qui est un site CaMKII-dépendant. Les sites de phosphorylation S2808 et S2814 ont largement été étudiés dans la littérature mais peu d'études portent sur le site S2030. Mon projet de thèse vise à comprendre les mécanismes de régulation du RyR2 par la phosphorylation du site S2030 PKA-dépendant lors de la réponse β -adrénergique. L'étude du rôle de la phosphorylation de la S2030 sur des modèles murins génétiquement modifiés non phosphorylable (S2030A), mimétiquement phosphorylés (S2030D) et des modèles contrôles (WT) a démontré que la phosphorylation de S2030 est impliquée dans le rythme cardiaque sinusal. En effet, le rythme cardiaque in vivo à l'état basal des S2030D est plus rapide que celui des WT et S2030A. Par ailleurs, la phosphorylation de S2030 est également essentielle à une réponse β -adrénergique totale. En effet, nous avons démontré in vivo et sur les NSA que les modèles S2030A présentent une réponse β -adrénergique moindre à l'ISO par rapport aux WT et S2030D. La phosphorylation de S2030 joue également un rôle sur l'activité du RyR2 et notamment sur sa probabilité d'ouverture lors de la phase diastolique. En effet, les cellules sinusales des S2030D présentent un nombre et une fréquence de Ca^{2+} sparks plus élevée que celles des WT et S2030A. Par ailleurs, lors d'un stress intense (Epinéphrine+caféine), la phosphorylation de S2030 favorise la survenue d'arythmies ventriculaires sévères tels que des tachycardies ventriculaires bidirectionnelles.

Title : Role of RyR2 Ser2030-dependent PKA phosphorylation during β -adrenergic response in the cardiac pacemaker.....

Keywords : Ryanodine receptor 2, phosphorylation, calcium channels,cardiac automatism

Abstract : Sino-atrial Node (SAN) cells automatism is regulated by a system of two coupled clocks : the so-called membrane clock, which depends mainly on I_f current, and the so-called calcium (Ca^{2+}) clock, which depends mainly on Ca^{2+} release from Ryanodine receptor 2 (RyR2). During a β -adrenergic response, increased cAMP levels directly regulate HCN channels responsible for I_f current. Faster activation of these channels leads to acceleration of the heart rate during stress, and positive chronotropic effect of the sympathetic response. Increased cAMP levels also activate Protein Kinase A (PKA), which phosphorylates the channels contributing to SAN cells automatism, notably RyR2. RyR2 is known to be phosphorylated by PKA during the β -adrenergic response, but the effects of this phosphorylation remain poorly understood. RyR2 is phosphorylated at various serines (S) identified to date, such as S2808 and S2030, which are PKA-dependent sites, and S2814, which is a CaMKII-dependent site. The S2808 and S2814 phosphorylation sites have been extensively studied in the literature, but few studies have focused on the role of S2030. My thesis project aims to understand the mechanisms by which RyR2 is regulated by phosphorylation at the S2030 PKA-dependent site during the β -adrenergic response.

The study of the role of S2030 phosphorylation in non-phosphorylatable (S2030A), mimetically phosphorylated (S2030D) and control (WT) models has demonstrated that S2030 PKA-dependent phosphorylation of RyR2 is a key component of the β -adrenergic response. Investigation of the role of S2030 phosphorylation in non-phosphorylatable (S2030A), mimetically phosphorylated (S2030D) and control (WT) models has demonstrated that S2030 phosphorylation is involved in sinus rhythm. Indeed, the in vivo basal heart rate of S2030D is faster than WT and S2030A. Furthermore, S2030 phosphorylation is also essential for a full β -adrenergic response. Indeed, we have demonstrated in vivo and on SAN that S2030A models exhibit impaired β -adrenergic response to ISO compared to WT and S2030D. S2030 phosphorylation also plays a role in RyR2 activity, and notably its opening during the diastolic phase. S2030D SAN cells have a higher number and frequency of Ca^{2+} sparks than WT and S2030A. Furthermore, under intense stress (epinephrine+caffeine), phosphorylation of S2030 favors severe ventricular arrhythmias such as bidirectional ventricular tachycardia.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury, qui ont accepté d'évaluer la qualité de mes travaux de recherche. Je vous remercie pour vos suggestions et remarques, qui ont enrichi notre discussion lors de ma soutenance de thèse.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse. Tu m'as ouvert les portes du laboratoire dès mon Master 2 et m'as permis de poursuivre une thèse sous ta direction. Merci pour ta bienveillance, ton écoute et ton soutien constants pendant ces trois années. Grâce à toi, j'ai énormément appris, tant sur le plan personnel que professionnel. Tu as su faire preuve de patience malgré mes erreurs, tout en respectant mes opinions, mes choix et mon besoin d'autonomie dans mon travail, tout en me guidant avec justesse lorsque je m'égarais. Tu as toujours été présente quand j'en avais besoin, même la veille de ma soutenance, lorsque tu corrigeais mon discours. Je n'oublierai jamais nos moments de complicité lors des congrès ou au cours de nos réunions dans ton bureau. J'espère sincèrement que nous resterons en contact, et je te dis à bientôt à Los Angeles en février.

Merci à tous les membres du laboratoire U1180 pour votre bienveillance et votre soutien tout au long de ma thèse ! Je tiens particulièrement à remercier les membres de mon équipe, qui m'ont accompagnée depuis ma préparation au concours doctoral jusqu'à ma soutenance. Merci à Jean-Pierre pour nos discussions scientifiques et ton aide précieuse, que ce soit pour mes présentations ou pour les analyses statistiques. Ton regard critique m'a permis d'acquérir une rigueur scientifique et de forger ma propre opinion. Merci à Jean-Jacques pour tes remarques avisées, ta bienveillance inégalable et ton soutien indéfectible. Merci à Jessica pour ton écoute, ton aide et ton soutien, particulièrement durant les moments difficiles. Merci d'avoir toujours été présente lorsque j'avais besoin de toi. Merci à Laetitia pour nos longues conversations thérapeutiques, ta bonne humeur et tes conseils avisés, tant sur le plan professionnel que personnel. Merci à Corinne pour ton aide précieuse, que ce soit dans l'organisation des événements du laboratoire, dans la rédaction de l'APAFIS ou à l'animalerie. Merci pour ta patience et ton expertise, notamment pour l'implantation des capteurs, sans oublier les nombreuses heures passées à rafistoler nos souris. Elles ne nous ont vraiment pas facilité la tâche, ces souris, haha !

Merci à Romain, qui a été à la fois mon professeur, mon assistant technique, mon partenaire de sacrifices de souris et, surtout, un ami. Je te suis infiniment reconnaissante pour ton soutien tout au long de cette thèse. Je n'oublierai pas les rondes que tu faisais dans mon bureau vers la fin de ma thèse pour t'assurer que j'allais bien, haha. Tu vas énormément me manquer, tout comme tes blagues de "tonton", qui parvenaient toujours à me faire sourire, même dans les moments les plus difficiles. Prépare un stock de blagues pour notre prochaine rencontre à Los Angeles !

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe qui nous ont quittés au cours de ces années. Merci à Pascale, qui m'a appris à cultiver les iPS avec patience et gentillesse. Merci à Estelle pour ton aide, ta bienveillance et nos moments de karaoké tardifs dans le bureau à Châtenay-Malabry, à chanter *L'amooooour brillee sous les étoooooiles*. Merci à Almudena, qui a été mon encadrante lors de mon Master 2 et qui est rapidement devenue une amie précieuse. Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour les merveilleux moments passés ensemble à Paris, à jouer les touristes dans les musées, les cafés et les petites rues. J'espère que nous aurons bientôt l'occasion de nous revoir, ou que je pourrai enfin te rendre visite à Madrid, comme je l'avais promis.

Thank you to Rui, who has been a great friend and congress partner. I'll cherish all the moments we shared in Toledo and Boston. I hope you'll achieve everything you wish for and I look forward to seeing you again in China.

Je remercie également Gladys pour ta bonne humeur, ton efficacité et ton aide dans mes démarches administratives. Tu as été un véritable rayon de soleil, et tu vas beaucoup me manquer.

I would also like to thank Hector for hosting me in the Cardiovascular Research Center in Wisconsin during my thesis. Thank you for your support and kindness. Thank you to Carmen for your amazing teaching and generosity. Thank you to Fran, who helped and guided me whenever I needed it. A big thanks also to Jingjing for being such a caring friend. I would also like to thank Holly, Anna, Sushimita, Veggie, and Sergio for your warm welcome and all the great moments we shared.

I would like to thank Ernst Niggli and Marcel Egger for welcoming me to Bern during my thesis. Big thanks to Miguel, Rado, and Ruben for your help and support during my short stay.

Je remercie chaleureusement le personnel de l'animalerie, tant pour votre travail que pour votre gentillesse. Merci à Valérie pour ton aide précieuse dans la rédaction de l'APAFIS. Merci à Manon pour le maintien des lignées, et à Ayma, Pauline, Christian, Olivier et Julie pour avoir veillé sur mes souris lors des sessions de télémétrie.

Je tiens d'avance à m'excuser si j'oublie de mentionner certaines personnes dans ces remerciements !

Merci à tous les stagiaires, M2, doctorants et postdocs, anciens comme actuels, qui ont apporté joie et bonne humeur au laboratoire et qui ont illuminé mes journées les plus sombres. Vous êtes la véritable colonne vertébrale de ce labo ! Merci à Melda, Eddie, Anne B, Garance, Maëliiss, Maya, Kaveen, Rima, Mathieu, Kevin, Anissa, Kaouter, Carole (ma "sœur d'anniversaire"), Anne-Sophie, George, Imane, etc. Merci à Chloé J., ma stagiaire préférée, pour ton implication exemplaire dans ce projet. Je suis certaine qu'une grande carrière t'attend. J'espère que tu découvriras que la recherche, bien qu'émaillée d'échecs, est une aventure enrichissante et passionnante.

Merci à Aurélien pour nos fous rires et nos blagues légendaires. Je suivrai ma bonne étoile et sauterai dans le bon train, comme promis.

Et enfin, je tiens à remercier ces personnes qui sont devenues plus que des collègues ou des amis, mais ma famille de cœur.

Merci à Célia pour ta générosité, ton soutien, ta gentillesse et ton amitié. Tu vas énormément me manquer. Je te souhaite beaucoup de succès pour ta thèse, et j'espère de tout cœur te revoir. Thanks to Zhenyi for your amazing friendship, the beautiful moments we shared, and many others to come! I'm going to miss you so much, you have no idea!

Merci à Francisco J., mon binôme, qui m'a appris bien plus qu'il ne le pense. Merci de m'avoir soutenue dans les moments difficiles, de m'avoir fait rire, d'avoir partagé nos délires, et d'avoir toujours été là pour moi. Je te souhaite beaucoup de courage avec les souris (tu en auras besoin, haha), mais surtout je te souhaite d'être fier du chemin que tu as parcouru. Ce projet est le fruit de nos efforts à tous les deux.

Un énorme merci à mes sœurs de cœur, Pauline et Angèle ! Même si nous nous sommes rencontrées tardivement, je n'aurais jamais imaginé avoir la chance de croiser des personnes aussi formidables que

vous. Aussi soudées que les *Totally Spies* (même si personne ne veut être Alex), je sais que nous finirons à 90 ans dans une villa au bord de la mer, haha ! Ma petite sœur Pauline, accroche-toi car je sais que tu en es capable et que tu feras une professeure admirable ! Je vous aime de tout mon cœur et je vous revois très vite !

Pour finir, je remercie ma famille, qui m'a soutenue sans relâche depuis mes premiers pas. Merci à ma grande sœur Mimi, qui m'a inspirée à faire une thèse malgré les obstacles. Merci à Bilel, qui m'a initiée au monde de la recherche et aidée à trouver ma voie. Merci à tonton Nourredine et tata Salima, mes grands-parents de cœur que j'adore. Merci à tata Linda pour ton amour et ta bienveillance. J'ai hâte d'assister à la thèse de Sirine, car je suis convaincue que nous aurons bientôt une deuxième chercheuse dans la famille. Merci à tonton Jamel et tata Soraya pour votre soutien et votre amour. Merci à mes petits frères, Sami et Isaac, pour votre soutien et amour inconditionnel. Enfin, merci à ma mère, qui m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-même et à persévérer pour atteindre mes objectifs. Cette thèse, je l'ai faite pour moi, mais aussi pour toi, en hommage à tes sacrifices pour m'offrir un meilleur avenir. Je t'aime et je suis fière de nous

Abréviations

AC : Adénylate cyclase

ACh : Acétylcholine

AChT : Acétylcholine transférase

ACTH : hormone adrénocorticotrope

ADP : Adénosine diphosphate

AKAP : Protéine d'ancrage à la PKA

AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique

ANP : Peptides natriurétiques atriaux

ATP : Adénosine triphosphate

BK : Canaux potassiques sensibles au calcium de grande conductance

BNP : Peptides natriurétiques cérébraux

Ca²⁺ : Ions Calcium

CaM : Calmoduline

CaMKII : Calcium/Calmoduline-dépendante Kinase II

Ca_v : Canaux calciques voltage-dépendants

CEC : Couplage Excitation-Contraction

CICR : Calcium-Induced Calcium Release ; Libération de calcium induite par le calcium

CL : cycle length

CNBD : Domaine de liaison des nucléotides cycliques

CNP : Peptides natriurétiques de type C

CPVT : Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia ou Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholergique (TVPC)

CRU : Calcium release units

CSQ2 : Calséquestrine 2

CT : Crista Terminalis

CTD : Domaine C-terminal

Cx : Connexine

D50 : Duration at 50% ou durée médiane du transitoire

DD : Dépolarisation diastolique

DAD : Delay-After Depolarization (Post-dépolarisation retardée)

DAG : Diacérylglycérol

DKI : Double Knock-In

EAD: Early-After Depolarization (Post-dépolarisation précoce)

EAG: ether-a-go-go

ECG: Electrocardiogramme

EC50: Concentration effective à 50% de l'effet

EPAC: Exchange Protein Activated by AMPc; Protéine d'échange directement activée par l'AMPc

FC : Fréquence Cardiaque

FKBP12.6 : FK506 Binding Proteins 12.6 kiloDalton

GC : Guanylate cyclase

Gi : Protéine G inhibitrice

GIRK : Canaux potassiques régulés par la protéine G

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

Gs : Protéine G stimulatrice

GTP : Guanosine triphosphate

HCN : Canaux activés par hyperpolarisation et sensibles aux nucléotides cycliques

HERG : Human Ether-a-go-go channels related G protein

IC : Insuffisance cardiaque

$I_{Ca,L}$: Courant calcique de type L

$I_{Ca,T}$: Courant calcique de type T

I_f : Courant *funny*

I_K : Courant potassique

IK : Canaux potassiques sensibles au calcium de conductance intermédiaire

$I_{K,r}$: Courant potassique d'activation rapide

$I_{K,s}$: Courant potassique d'activation lente

I_{KACH} : Courant potassique activé par acétylcholine

I_{Kur} : Courant potassique rectifiant entrant ultra-rapide

I_{Na} : Courant sodique

IP3 : Récepteurs Inositol Triphosphate

ISO : Isoprénaline

I_{st} : Courant soutenue

$I_{to,f}$: Courant transitoire rapide

JPH2 : Junctophiline 2

K^+ : Ions potassium

Kir : Canal potassique rectifiant

K_v : Canaux potassiques voltage-dépendants

LCR : Local Calcium Release ; Libération locale de calcium

LTCC : L-Type Calcium Channels ou Canaux calciques de type L

M2 : Récepteur muscarinique de type 2

Mg^{2+} : Ions magnésium

MyBP-C : Myosine binding protein C : Protéine de liaison à la myosine

Na^+ : Ions sodium

Na_v : Canaux sodiques voltage dépendants

NAV : Nœud auriculo-ventriculaire

NCX : Echangeur Sodium/Calcium

NO : monoxyde d'azote

NPR : récepteur de peptides natriurétiques

NSA : Nœud sino-atrial

NTD : Domaine N-terminal

OD : oreillette droite

OG : oreillette gauche

PA : Potentiel d'Action

PDE : Phosphodiesterases

PKA : Protéine kinase A dépendante de l'AMPc

PKAI : Protéine kinase de type I

PKAII : Protéine kinase de type II

PKI : Inhibiteur de la protéine kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol biphosphate

PLB : Phospholamban

PLC : Phospholipase C

PMCA : Plasma membrane Ca^{2+} ATPase

RCPG : récepteur aux protéines G

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SERCA2A : SR Ca^{2+} -ATPase ou réticulum sarcoplasmique/endoplasmique Ca^{2+} -ATPase

SK : Canaux potassiques sensible au calcium de faible conductance

SNA : système nerveux autonome

SNC : système nerveux central

SNIC : système nerveux intracardiaque

SOICR: Store Overload Induced Calcium Release

SPEG: Striated muscle preferentially expressed protein kinase

TRP: Transient receptor potential

TTC: T type calcium channels; canaux calciques de type T

TTX: Tétrodotoxine

VCI: Veine cave inférieure

VCS: Veine cave supérieure

WT: Wild-Type

β -AR : récepteur β -adrénergique

Liste des Figures

- Figure 1-Propagation de l'activité électrique du cœur (en jaune) ; Le nœud sino-atrial (NSA) génère une activité électrique qui induit la dépolarisation des oreillettes. L'activité électrique est ensuite relayée vers le nœud atrio-ventriculaire (NAV) d'Aschoff et Tawara puis vers l'ensemble du myocarde ventriculaire par le faisceau de His puis les fibres de Purkinje. (Illustration issue du site web pacemaker.html 42_08HeartRhythm.jpg (nicerweb.net))..... 22
- Figure 2- Enregistrement de l'activité électrique du cœur par électrocardiogramme (ECG) chez l'humain ; (A)Représentation schématisée de l'emplacement des électrodes frontales (rouge ; bras droit, jaune ; bras gauche et vert ; jambe gauche), précordiales thoraciques (V1-V6) et du triangle d'Einthoven. Les dérivations II, III et aVF explorent la surface cardiaque inférieure. Les dérivations I et aVL explorent la surface latérale du ventricule gauche. (B) Représentation de l'activité électrique cardiaque mesurée par ECG et les durées d'intervalles entre ces ondes en condition physiologique chez l'humain..... 22
- Figure 3- Photographie de cellules sinuales isolées (à gauche) illustrant les différents types de cellules composant le NSA ; (a)Elongated, (b)Spindle, (b) Spider-like, (c) cellules atriales. Dimension barre noir 30 μm , r (Verheijck et al., 1998) 24
- Figure 4-Représentation schématisée du déplacement du centre initiateur du pacemaker ; Déplacements du centre initiateur du NSA en réponses à différents stimuli. RA : oreillette droite, CT : crista terminalis, SVC : veine cave supérieure, IVC : veine cave inférieure, SEP : septum interatrial. (Lang et al., 2021) 25
- Figure 5- Représentation schématisée des modèles de propagation de la conduction électrique du NSA ; (A) Représentation graphique des modèles de gradient, mosaïque et de fibrose interstitielle. CPC, cellules pacemaker cardiaques ; AM, cellules atriales. (B) Diagramme de conduction électrique du NSA (bleu vers rouge). Cette conduction électrique du NSA est délimitée par des voies d'échappement (Exit pathways) et des tissus connectifs (gris) qui servent de barrières (lignes bleues) contre l'influence hyperpolarisante de l'oreillette droite. SVC, Veine cave supérieure ; RA, oreillette droite (Easterling et al., 2021)..... 26
- Figure 6- Architecture des fibres de Purkinje révélée par marquage de la Cx40 par la GFP. (A) Marquage par immunofluorescence des fibres de Purkinje, (B) Photo d'une cellule de Purkinje et son potentiel d'action automatique. HB : faisceau de His, PF : fibres de Purkinje, LVW : paroi du ventricule gauche, RVW : paroi du ventricule droit, LBB : branche gauche du faisceau de His, RBB : branche droite du faisceau de His, APM : muscles papillaires. (Miquerol et al., 2004) 27
- Figure 7- Morphologie des potentiels d'action selon les régions du cœur ; Schéma d'une coupe longitudinale du cœur et illustration des différents types de potentiels d'actions correspondant au tracé d'électrocardiogramme (ECG) humain (Weisbrod et al.,2016) 28
- Figure 8-Représentation schématisée d'un ECG humain associé au potentiel d'action ventriculaire ; (A) Représentation schématisée d'un ECG normal chez l'humain ; la dépolarisation ventriculaire coïncide avec le complexe QRS et la repolarisation ventriculaire avec l'onde. L'intervalle QT (350-440 ms chez l'humain) correspond au temps entre le début de la dépolarisation ventriculaire et la fin de la repolarisation ventriculaire. (B) Représentation schématisée du potentiel d'action des cardiomyocytes ventriculaires et ses différentes phases ; Dépolarisation rapide par activation des canaux sodiques voltage-dépendants (I_{Na}) (phase 0), Repolarisation rapide par l'activation des canaux potassiques voltage-dépendants (I_{to}) (phase 1), Phase de plateau par activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L ($I_{Ca, L}$) et canaux K^+ des courants rectifiant entrants (I_{Kur} , I_{Kr} et I_{Ks}) (phase 2), Repolarisation par activation des canaux K^+ voltage-dépendants (I_{K1})(phase 3) et retour au potentiel de repos. (Illustration de Li et al., 2016)..... 29
- Figure 9- Mécanismes du couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes ventriculaires. Enregistrement simultanée d'un potentiel d'action (courbe noire), un transitoire calcique (courbe bleue) et une contraction cellulaire (courbe rouge) dans un cardiomyocyte ventriculaire de lapin à 37°C. NCX,Echangeur Sodium/Calcium ; ATP, ATPase, PLB,Phospholamban ; SR, Réticulum Sarcoplasmique (Bers,Nature review 2002) 30
- Figure 10- Image illustrant un transitoire calcique ; Coupe longitudinale (line scan) d'un cardiomyocyte ventriculaire isolé de souris adulte par microscopie confocale, incubée avec une sonde fluorescente calcique, après stimulation électrique à 1Hz. A droite de l'image se trouve le rapport de fluorescence

- normalisée permettant de caractériser les paramètres de ce transitoire (amplitude et décroissance du transitoire calcique) 32
- Figure 11- Images séquentielles de cardiomyocytes ventriculaires isolés et quiescents de rat couplés à une sonde calcique (Fluo3AM) présentant des sparks et vagues calciques après augmentation de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire dans la solution (10 mM) ; (A) Images séquentielles obtenues toutes les 0.5 secondes. Les points blancs correspondent aux Ca^{2+} sparks à travers la cellule. Echelle 20 μm . (B) Images séquentielles de la même cellule 4 minutes plus tard illustrant la propagation d'une vague calcique initiée après recrutement de Ca^{2+} sparks (flèche blanche). (C) Coupe transversale (line scan) d'une cellule illustrant une vague calcique à une vitesse de propagation de 70 $\mu\text{m/s}$ (flèche blanche). Les sparks calciques sont présents en grand nombre à l'origine (Flèche noire) et à la fin de la vague démontrant le mécanisme d'activation des vagues calciques par recrutement de Ca^{2+} sparks. Echelle 10 μm horizontal et 200 ms vertical) (Cheng et al.,1993) 33
- Figure 12- Le potentiel de membrane des cellules sinusales et les mécanismes associés ; (Haut) Potentiel d'action spontanée de cellules sinusales de lapin et ses différentes phases ; Dépolarisation diastolique (DD) spontanée en phase 4, dépolarisation membranaire rapide (phase 0) suivie d'une repolarisation membranaire (phase 2 et 3). (Milieu) Représentation schématique de l'amplitude et de la durée d'activation des canaux ioniques impliqués dans l'horloge électrique (Membrane clock). (Bas) Représentation schématique de l'amplitude et de la durée d'activation des canaux ioniques impliqués dans l'horloge calcique (Calcium clock). MDP : potentiel diastolique maximum ; DD : dépolarisation diastolique ; I_f : courant « funny » ; $I_{\text{Ca,T}}$: courant Ca^{2+} voltage-dépendant de type T ; $I_{\text{Ca,L}}$: courant Ca^{2+} voltage-dépendant de type L ; I_K : courant K^+ voltage-dépendant ; I_{NCX} : courant de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; LCR (Local Ca^{2+} Release) : libération locale de Ca^{2+} ; SERCA : Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique (Monfredi et al., 2013) 34
- Figure 13- Localisation et représentation schématique des canaux HCN4 dans le NSA ; (A) Représentation schématique d'un cœur illustrant la localisation du NSA et l'expression des canaux HCN (prédominance des HCN4), (B) Représentation schématique des canaux HCN et de leurs sous-unités. SVC, Veine cave supérieure ; IVC, Veine cave inférieure ; RAA, Appendice de l'oreillette droite ; Ao, Aorte ; RSA, Artère subclavière droite ; LCCA, Artère carotique gauche ; RCCA, Artère carotide droite right ; LSA ; Artère subclavière gauche ; LCV, Veine cérébral gauche ; PA, Artère pulmonaire ; PV, Veine pulmonaire. (Adapté de Hennis et al., 2021) 35
- Figure 14-(A) Courbes courant-tension (I-V) et (B) Courbes d'inactivation des canaux calciques voltage-dépendants TTCC ($\text{Ca}_v3.1$) et LTCC ($\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$), enregistrées sur cellules sinusales de souris (Mangoni et al.,2006)..... 38
- Figure 15- Structure des canaux calciques voltage dépendants ; Ces canaux sont constitués de la sous unité α_1 composée de 4 domaines transmembranaires à 6 segments (S1-S6) qui forme le pore du canal, et de sous unités auxiliaires β , γ , α_2 et δ . (Tevoufouet et al.,2014) 39
- Figure 16- Libération rythmique et périodique indépendamment du voltage des LCR via les RyR2 sur cellules sinusales isolées de lapin. Enregistrement de PA (haut), LCR et transitoire calcique (milieu) et rapport de la fluorescence calcique F/F0 aux voltages imposés (A) de -65 mV et (B) de -10 mV. (D'après Vinogradova et al.,2004)..... 42
- Figure 17- Représentation schématique du concept d'horloge couplée dans les cellules du NSA ; L'horloge membranaire est représentée par la zone périphérique bleu et l'horloge calcique par la zone centrale grise. Les acteurs communs de ces deux horloges sont représentés en rouge. (Lakatta et al., 2009) 50
- Figure 18- Reconstruction 3D d'un tissu sinusal immunomarké ; Le tissu sinusal est situé entre la veine cave supérieure (SVC), la veine cave inférieure (IVC), le septum (SPT) et l'oreillette droite (RA) bordé par la crista terminalis (CT). La nouvelle population de cellules est marquée au S100B⁺ (cyan)/GFAP⁻ (vert) au sein du réseau de cellules sinusales marquées au HCN4⁺ (rouge). La ligne en pointillés délimite la CT. (Bychkov et al., 2022) 52
- Figure 19- Représentation schématique de la régulation sympathique et parasympathique au sein des cellules sinusales. L'activation des récepteurs β -adrénergiques par les catécholamines active la voie AMPc-PKA (voie sympathique en pointillés rouge) ; activation des canaux HCN4 du courant I_f et phosphorylation PKA dépendante des acteurs de l'horloge membranaire (LTCC $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$) et l'horloge calcique (RyR2, PLB). L'activation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine diminue les taux d'AMPc et active le

<p>courant $I_{K_{ACh}}$ repolarisant (voie parasympathique en pointillés verts). (Schéma issue de la thèse de J.Louradour, « Rôle des canaux calciques de type L Cav 1.3 dans le contrôle de la fréquence cardiaque par les catécholamines » et adapté de Mangoni et Nargeot,2008)</p>	53
<p>Figure 20-Structure du récepteur à la ryanodine (RyR) ; (A) Reconstruction par cryo-EM du RyR, vue cytosolique, (B) vue de profil (Van Petegem,2012), (C) Structure générale du RYR avec sa partie N-terminal (NTD A et B) en bleu foncé, les domaine SPRY1 SPRY2 et SPRY3 en bleu clair ,les pinces (R1, R2,R3,R4) en rose foncé, la castalbine (Cs2) ou FKBP12.6 en jaune, le core solénoïde C-sol en rouge relié à la partie cytosolique par le pont solénoïde B-sol en vert, et à la partie transmembranaire par le domaine C-terminal (CTD) en orange. Domaines de liaison au Ca^{2+} en violet (EF). (Zalk et al.,2015)</p>	60
<p>Figure 21-Arrangements des clusters de RyR2 en microscopie électronique haute résolution sur cardiomyocyte ventriculaire humain. (A) Vue orthogonal d'une dyade, (i)XY, (ii) YZ, (iii)XZ, épaisseur 1nm. Les doubles flèches indiquent les tubules T et les simples flèches le réticulum sarcoplasmique. Echelle 60 nm. (B) Position et orientation des tétramères de RyR2 (carré rouge).(C)(i) Visualisation des tétramères de RyR2 (carré rouge)et la distance entre deux RyR2 (ligne verte) exprimées en nm. (ii) Histogramme exprimant le nombre de tétramères identifiés et leurs arrangements (organisés selon plusieurs schémas ; côte-à-côte (side by side), échiquier (checkboard) et isolés (isolated). N=5 patients, n=84 tétramères (Adapté de Ashgari et al., 2014 et Ashgari et al.,2024)</p>	62
<p>Figure 22-Structure du RyR2 en état ouvert et fermé ; (A) Modélisation 2D par cryo-EM de l'état fermé et ouvert du RyR d'un pont de vue cytosolique et luminale. (B) Superposition des structures du RyR2 en position ouvert (bleu) et fermé (jaune). La flèche bleue indique le déplacement de la partie cytosolique de son état fermé à son état ouvert.SR, réticulum sarcoplasmique (Peng et al.,2016)</p>	63
<p>Figure 23- Figure illustrant les différents états de conductance de RyR1 par enregistrement monocanal par bicouche lipidique ; (A) Représentation des tracés d'enregistrement des RyR1 purifiés dans divers conditions cytosoliques (chambre cis) : sans Ca^{2+}, avec 30 μM de Ca^{2+}, avec 10 μM de ryanodine, avec 2mM ATP et 5 mM de caféine sans Ca^{2+} et avec 30 μM Ca^{2+}, 2mM ATP et 5 mM caféine. L'état fermé du canal est identifié ici par la lettre C (closed). (B) Probabilité d'ouverture (P_o) du canal en fonction des conditions cytosoliques. (C) Moyenne de la durée d'ouverture du canal (ms) en fonction des conditions cytosoliques. (Adapté de Des Georges et al.,2016).....</p>	64
<p>Figure 24- Exemple de tracé ECG d'un patient atteint de CPVT (RyR2 R420Q) ; Des arythmies tels que des contractions prématurées, des tachycardies bidirectionnelles polymorphes, des bigéminés et ectopie atrial sont présents chez ce patient (Domingo et al., 2015)</p>	66
<p>Figure 25-Recensement des différentes mutations liées à la CPVT ; (Landstrom, Dobrev et Wehrens et al.,2017)</p>	66
<p>Figure 26- Régions des mutations du RyR2 catégorisées en 3 domaines (I : N-terminal, II : central et III : C-terminal), AA : nombre d'acides aminés estimés pour chaque région (D'après Medeiros-Domingo et al.,2009).....</p>	67
<p>Figure 27- Modélisation 3D du domaine N-terminal du RyR2 ; (A) Vue de dessus du RyR2 et modélisation du domaine N-terminal composé des domaines A (bleu), B (vert) et C (rouge) interagissant par des ions chlorure (rose). (Xiao et al.,2015) (B) Modélisation 3D du domaine N-terminal de RyR2 illustrant l'interaction des acides aminées avec les ions chlorure et la liaison hydrogène entre l'arginine 420 et la tyrosine 125 (lignes pointillés noirs) (Kimlicka et al.,2013)</p>	68
<p>Figure 28-Représentation schématique simplifié des effecteurs et protéines régulatrices du RyR2 ; Créée avec Biorender.com et adapté de Bers, 2004 et Steinberg et al.,2023.</p>	69
<p>Figure 29-Modèle hypothétique des sites de régulation du RyR2 par les ions Ca^{2+}/Mg^{2+} ; Les 3 sites de régulation cytosolique (A, I1 et I2) et le site de régulation luminale (L-site) sont représentés à gauche et les concentrations en ions Ca^{2+}/Mg^{2+} d'affinité du récepteur à droite. La concentration d'ions Mg^{2+} d'affinité pour le site I2 n'est pas connue (?). Les flèches noires illustrent les sites de fixation des ions Ca^{2+} au RyR2 (Laver et al.,2009)</p>	71
<p>Figure 30-Cascade de phosphorylation dans les cardiomyocytes ventriculaires lors de la réponse β-adrénergique. β-AR, récepteur β-adrenergique; LTCC,canaux calciques de type L; $G_s\alpha$, sous-unité α de la protéine G_s ; AC, adénylate cyclase; cAMP, adenosine monophosphate cyclique; PKA, protéine kinase A; Epac, Protéine d'échange activée par l'AMPC ; SR,réticulum sarcoplasmique ; PLN, phospholamban; SERCA, Ca^{2+}-ATPase du réticulum sarcoplasmique; RyR, récepteur à la ryanodine ; CaMKII, Kinase Ca^{2+} et</p>	

calmoduline-dépendante II; cMyBP-C, protéine de liaison à la myosine ; Rap2B, protéine RAS-related GTP-binding protein; PLC ϵ , phospholipase C ϵ ; PKC ϵ , protéine kinase C ϵ . (Grimm et al., 2010)	78
Figure 31- Représentation schématique de la protéine kinase A sous sa forme active et inactive ; La PKA est composée de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) et est ancrée sur la membrane plasmique par une protéine d'ancrage (AKAP). Les sous-unités R possèdent deux sites de liaison à l'AMPc, qui une fois liés, entraîne un changement de conformation et libère les sous-unités C qui phosphorylent les protéines cibles sur des résidus sérine/thréonine (Illustration de Sadeghian et al., 2022)	81
Figure 32- Représentation schématique de la structure de la CAMKII (Chao et al.,2011)	83
Figure 33- Modèle hypothétique de phosphorylation du RyR2 ; Ce modèle décrit la position et les potentielles interactions entre les sites de phosphorylation identifiés à ce jour. Les sites S2808 et S2814 seraient localisées sur la partie proéminente du RyR2 au sein du « hotspot » et seraient sujet à divers kinases. La phosphorylation de ce hotspot mettrait en évidence un effet à l'unisson de ces sites sur l'activité du RyR2 et notamment sur son domaine central formant le pore du canal. Ce modèle prendrait également en compte l'existence d'autres sites de phosphorylation, notamment le site S2030 et d'autres sites non identifiés à ce jour. L'interaction entre les kinases et les sites de phosphorylation sont identifiés par des flèches noires selon les modèles utilisés ; in vivo (flèche pleine) et in vitro (flèche en pointillés). (Camors, Valdivia, 2014)	85
Figure 34-Implantation de capteurs de télémétrie sur souris et exemples de tracés ECG ; à gauche implant de télémétrie (Sheath: gaine, Wire: câble, Cap: embout), à droite localisation sous-cutanée des deux électrodes (négative sur muscle pectoral et positive à 1cm de l'appendice xiphoïde du sternum) et correspondance des traces ECG selon la dérivation du triangle d'Einthoven. (Adapté de McCauley et Wehrens,2010 et Steijns et al.,2020)	95
Figure 35-Tracé représentatif d'un ECG de souris WT en condition basale avec les intervalles PR, RR, QRS et QT	96
Figure 36-Photo du nœud sino-atrial de souris. OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; NSA : nœud sino-atrial ; VCS : veine cave supérieur ; VCI : veine cave inférieur	98
Figure 37-Schéma illustrant le principe d'un microscope confocal à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur et la présence d'une ouverture de filtrage (pinhole) élimine la fluorescence parasite.	99
Figure 38- Mesure des caractéristiques des transitoires calciques des cellules sinuales ; Au-dessus de l'image illustrant des transitoires calciques enregistrés sur cellules sinuales se trouve le rapport de fluorescence F/F ₀ de ces transitoires et l'illustration des mesures des caractéristiques des transitoires ; l'amplitude (en orange), le temps au pic (en rouge), le cycle length (en bleu foncé), la durée à 50% du pic (D50) (en vert) et le temps de décroissance du transitoire (Decay time) (en bleu clair).....	100
Figure 39- Mesure des caractéristiques des Ca ²⁺ sparks ; En haut se trouve une image enregistrée par microscopie confocale illustrant un Ca ²⁺ spark. A droite de l'image est représenté le profil de fluorescence du Ca ²⁺ spark et la largeur maximale à 50 % du pic (W50). En dessous de l'image se trouve le même profil de fluorescence et les mesures de l'amplitude (peak), du temps au pic en rouge (Time to peak) et de la durée maximale à 50% du pic en vert (D50) (Images issues de la thèse de Y. WANG, 2016 « Ca ²⁺ handling in a mice model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, 2016)	101
Figure 40- Protocole illustrant l'étude de la dynamique calcique des cardiomyocytes ventriculaires des souris RyR2 ^{R420Q} et RyR2 ^{R420Q/S2030A}	109
Figure 41-Représentation des libérations de calcium dans les cardiomyocytes ventriculaires ; (gauche) Line scan (coupe longitudinale représenté par une flèche rouge) par microscopie confocale d'un cardiomyocyte ventriculaire isolé (souris adulte) couplé à une sonde fluorescente calcique Fluo3AM illustrant un transitoire calcique après stimulation électrique de 1 Hz ; (droite) Images en fonction du temps d'un cardiomyocyte ventriculaire isolé de souris adulte, couplé à une sonde fluorescente calcique présentant des vagues calciques visualisés par microscopie confocale (capturés toutes les 100 ms). L'échelle colorimétrique correspond au niveau de fluorescence du Ca ²⁺ intracellulaire.....	110
Figure 42-Effet de la phosphorylation de S2030 sur le rythme cardiaque ;.....	113
Figure 43-Effet de la phosphorylation de S2030 sur la réponse β -adrénergique in vivo	115

Figure 44- Effet de la phosphorylation de S2030 sur le nœud sino-atrial isolé lors de la réponse β -adrénergique	118
Figure 45- Caractéristiques des transitoires calciques des cellules sinusales en condition basale et en condition β -adrénergique	120
Figure 46- Effet de la phosphorylation de S2030 sur les libérations de Ca^{2+} sparks dans les cellules du NSA lors de la réponse β -adrénergique	123
Figure 47- Caractéristiques des Ca^{2+} sparks des cellules sinusales en condition basale et en condition β -adrénergique	126
Figure 48- Effet de la phosphorylation de S2030 sur l'activité électrique cardiaque lors d'un stress (Epinephrine+ Caféine)	129
Figure 49- Effet de la phosphorylation de S2030 sur la sensibilité au Ca^{2+} du RyR2	131
Figure 50- Effet de la phosphorylation de S2030 sur l'expression de RYR2 et les taux de phosphorylation de S2808 et S2814.....	133
Figure 51- Effet de la phosphorylation de S2030 dans un modèle arythmique CPVT (RyR2 ^{R420Q}) lors de la réponse β -adrénergique	137
Figure 52- Effet de la phosphorylation de S2030 sur les transitoires calciques dans un modèle arythmique CPVT (RyR2 ^{R420Q}) lors de la réponse β -adrenergique.....	139
Figure 53- Effet de la phosphorylation de S2030 sur la charge calcique du RS dans un modèle arythmique CPVT (RyR2 ^{R420Q}) lors de la réponse β -adrenergique.....	141

Table des matières

Remerciements	4
Abréviations	7
Liste des Figures	13
Chapitre 1 INTRODUCTION	21
I. L'activité électrique du cœur	21
I.1. Structure du NSA et conduction électrique	23
I.1.1 Structure et organisation du NSA	23
I.1.2 Conduction électrique du NSA vers d'autres centres rythmogènes	25
I.2. Propagation du potentiel d'action	27
I.3. Couplage Excitation-Contraction (CEC)	30
II. Mécanismes de l'automatisme du nœud sinusal	33
II.1 Caractéristique du potentiel d'action sinusal	33
II.2 Canaux impliqués dans la dépolarisation du PA sinusal	35
II.2.1. Canaux impliqués dans l'horloge membranaire	35
II.2.1.1 Canaux activés par l'hyperpolarisation de la membrane ou Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels (HCN)	35
II.2.1.2 Les canaux calciques voltage-dépendants	37
II.2.2. Canaux impliqués dans l'horloge calcique	41
II.2.2.1 Les récepteurs à la ryanodine (RyR)	41
II.2.2.2 L'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX)	42
II.3 Canaux ioniques impliqués lors de la repolarisation du PA sinusal (I_{Kr} , I_{Ks})	43
II.4 Canaux pouvant être impliqués dans la régulation de l'automatisme	45
II.4.1 Autres canaux potassiques	45
II.4.2 Les canaux sodiques voltage-dépendants	47
II.4.3 Les canaux mécano-sensibles au sein du NSA	48
II.5 Horloge couplée	50
III. Régulation du rythme cardiaque	51
III.1 Régulation par le système nerveux autonome	51
III.1.1 Régulation par le système sympathique	52
Réponse combat ou fuite (ou Fight or flight)	52
Déphosphorylation et régulation par les phosphodiésterases (PDE) et les phosphatases	54
Différences de la réponse sympathique liées au sexe	55
III.1.2 Régulation par le système parasympathique	56
III.2 Régulation par le système hormonal	56
IV. Récepteur à la ryanodine (RyR2)	58

IV.1	Fonction du RyR	58
IV.2	Isoformes du RyR	59
IV.3	Structure, perméabilité aux ions et organisation du RyR2.....	60
IV.4	Pathologie associée aux mutations du RyR2, la CPVT	65
IV.5	Régulation du RyR2.....	69
IV.5.1	Régulation par des effecteurs endogènes (Ions Ca ²⁺ , Mg ²⁺ et ATP)	71
IV.5.2	Régulation du RyR2 par les protéines cytosoliques associées	73
IV.5.3	Régulation du RyR2 par les protéines luminales associées.....	76
V.	La phosphorylation lors de la réponse β-adrénergique et régulation du RyR2.....	77
V.1	Différentes voies de phosphorylation lors de la réponse β-adrénergique	77
	Voie de phosphorylation PKA-dépendante.....	79
	Voie de phosphorylation CaMKII-dépendante	79
V.2	La phosphorylation du RyR2.....	80
V.2.1	Phosphorylation du RyR2 par la PKA	80
V.2.2	Phosphorylation du RyR2 par la CaMKII	83
	OBJECTIFS DE LA THESE	87
	Chapitre 2 MATERIELS ET METHODES	88
I.	Conception des modèles génétiquement modifiés	88
II.	Génotypage des lignées S2030A et S2030D.....	89
III.	Exploration fonctionnelle <i>in vivo</i> par télémétrie des modèles WT, S2030A et S2030D	94
III.1.	Implantation des capteurs de télémétrie et protocoles d'enregistrement	94
III.2	Analyse des tracés ECG	96
IV.	Exploration fonctionnelle <i>ex vivo</i> des modèles WT, S2030A et S2030D	97
IV.1	Dissection du nœud sinusal.....	97
IV.2	Etude de la dynamique calcique dans le NSA par microscopie confocale	98
IV.3	Analyse de la dynamique calcique dans le NSA.....	100
V.	Méthodes de biologie et biochimie moléculaire	101
V.1	Mesure du taux d'expression des protéines des modèles WT, S2030A et S2030D	101
V.2	Mesure de l'activité du RyR2 par technique de Radiobinding assay des modèles WT, S2030A et S2030D	105
VI.	Etude de l'effet de S2030 dans un modèle arythmique	107
VI.1	Isolement des cardiomyocytes ventriculaires des souris RyR2 ^{R420Q} et RyR2 ^{R420Q/S2030A}	108
VI.2	Etude de la dynamique calcique des souris RyR2 ^{R420Q} et RyR2 ^{R420Q/S2030A}	108
VII.	Tests statistiques.....	111
	Chapitre 3 RESULTATS	113
I.	Rôle de la phosphorylation de S2030 lors de la réponse β-adrénergique	114

1.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur le rythme cardiaque	114
2.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur la réponse β -adrénergique in vivo.....	116
3.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur le NSA lors de la réponse β -adrénergique 119	
4.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur les libérations de Ca^{2+} sparks dans le NSA lors de la réponse β -adrénergique	124
5.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur l'activité électrique cardiaque lors d'un stress (Epinéphrine/Caféine)	130
6.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur la sensibilité au Ca^{2+} du RyR2	132
7.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur l'expression de RyR2 et les sites de phosphorylations S2808 et S2814	134
II.	Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 dans un modèle arythmique lors de la réponse β -adrénergique	136
Chapitre 4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES		143
I.	La phosphorylation du RyR2 sur S2030 et la fréquence cardiaque.....	143
II.	La phosphorylation de RyR2 sur S2030 et la réponse β -adrénergique	144
III.	La phosphorylation de S2030 et la survenue d'arythmies ventriculaires	145
IV.	La phosphorylation de S2030 et les autres sites de phosphorylation	147
V.	La phosphorylation de S2030 et l'activité du RyR2.....	148
VI.	Différences liées au sexe.....	151
VII.	La phosphorylation de S2030 dans un modèle arythmique.....	152
CONCLUSION GENERALE.....		154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		155

Chapitre 1 INTRODUCTION

I. L'activité électrique du cœur

Le cœur est un muscle autonome capable de se contracter et de distribuer le sang vers les organes. La contraction (phase systolique) et la relaxation (phase diastolique) de ce muscle sont initiées par l'activité électrique générée par différents types de cardiomyocytes. L'activité électrique est initiée par un groupe de cardiomyocytes qui possèdent la propriété de générer automatiquement des potentiels d'action (PA). Ces cardiomyocytes sont les cellules cardionectrices ou sinusales. Ces cellules automatiques composent le nœud sino-atrial (NSA) de Keith et Flack, décrit comme le pacemaker primaire et située sur la paroi atriale droite du cœur, à proximité de la veine cave supérieure.¹ Les cellules du NSA génèrent des potentiels d'action à une fréquence régulière et modulée en permanence en fonction des besoins de l'organisme.

L'activité électrique est ensuite relayée par d'autres cardiomyocytes automatiques au sein du nœud atrio-ventriculaire (NAV) d'Aschoff et Tawara situé dans l'oreillette droite, entre l'orifice du sinus coronarien et la valve tricuspide (**Figure 1**). En effet, ces cardiomyocytes ont également la capacité de se contracter automatiquement. La présence de foyers automatiques observés au sein du NAV lui attribue la fonction de pacemaker secondaire lors d'une absence de rythme sinusal du NSA avec cependant une fréquence de dépolarisation plus faible que celle du NSA.² Ainsi, ce sont les cellules les plus rapides qui imposent leur rythme, notamment les cellules du NSA en condition physiologique. De ce fait, les cellules du NAV prennent le relais en cas de dysfonction du NSA.

Enfin, ce signal électrique se propage du faisceau de His vers les fibres de Purkinje présentes dans les parois des ventricules et conduit à une contraction synchrone et complète du myocarde (**Figure 1**).³ En effet, les cardiomyocytes situés dans le faisceau de His et les fibres de Purkinje ont la propriété de conduire l'activité électrique. La contraction des ventricules se produit alors quelques fractions de seconde après celle des oreillettes en condition physiologique. En effet, l'activité électrique originaire du NSA est ralentie due aux propriétés de conduction du NAV.

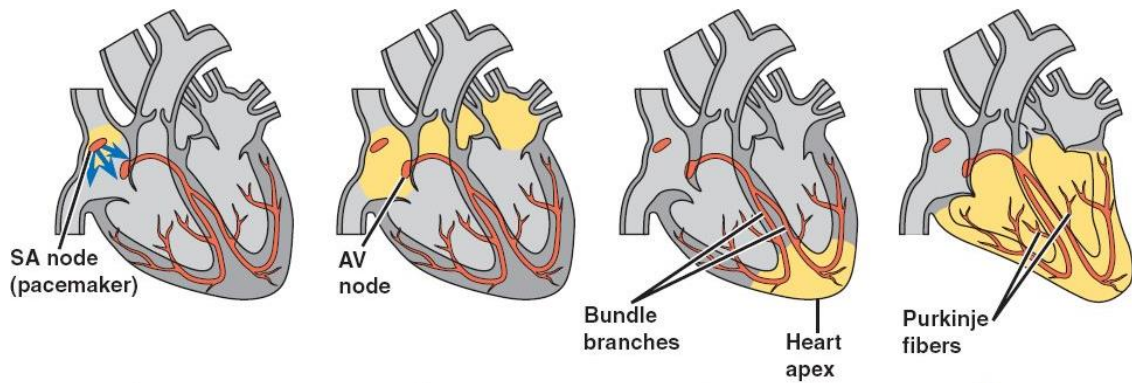


Figure 1-Propagation de l'activité électrique du cœur (en jaune) ; Le nœud sino-atrial (NSA) génère une activité électrique qui induit la dépolarisation des oreillettes. L'activité électrique est ensuite relayée vers le nœud atrio-ventriculaire (NAV) d'Aschoff et Tawara puis vers l'ensemble du myocarde ventriculaire par le faisceau de His puis les fibres de Purkinje. (Illustration issue du site web pacemaker.html 42_08HeartRhythm.jpg (nicerweb.net))

L'activité électrique cardiaque peut être mesurée par l'application d'électrodes à la surface de la peau du patient. Le signal enregistré est appelé un électrocardiogramme (ECG). Cette méthode indolore et rapide trouve son origine en 1887 par Augustus D Waller qui effectua le premier électrocardiogramme humain.⁴ L'ECG est obtenue sous forme de différence de potentiel selon un axe délimité par des électrodes de surface ou dits dérivations. Willem Einthoven décrit notamment pour la première fois, à l'aide d'un galvanomètre à corde, les dérivations bipolaires DI, DII et DIII formant un triangle équilatéral nommé le triangle d'Einthoven. Les 3 dérivations bipolaires ainsi que les 3 dérivations unipolaires aVR, aVL et aVF permettent d'étudier l'activité électrique cardiaque dans le plan frontal. Les 6 autres dérivations appelées dérivations précordiales V1, V2, V3, V4, V5, V6 permettent, elles, d'étudier l'activité électrique dans le plan transversal (**Figure 2**).

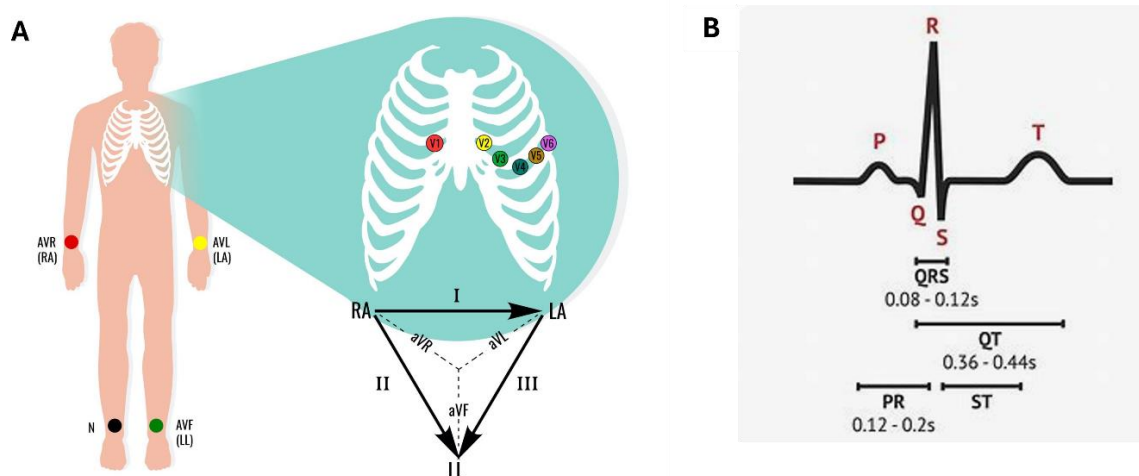


Figure 2- Enregistrement de l'activité électrique du cœur par électrocardiogramme (ECG) chez l'humain ; (A) Représentation schématique de l'emplacement des électrodes frontales (rouge ; bras droit, jaune ; bras gauche et vert ; jambe gauche), précordiales thoraciques (V1-V6) et du triangle d'Einthoven. Les dérivations II, III

et aVF explorent la surface cardiaque inférieure. Les dérivations I et aVL explorent la surface latérale du ventricule gauche. **(B)** Représentation de l'activité électrique cardiaque mesurée par ECG et les durées d'intervalles entre ces ondes en condition physiologique chez l'humain.

Le tracé de l'ECG est composé des ondes P, Q, R, S et T correspondant aux différentes phases de contraction des oreillettes et des ventricules. La dépolarisation et contraction des oreillettes lors de la systole auriculaire correspond à l'onde P (environ 80 ms chez l'humain) sur l'électrocardiogramme.⁵ La conduction de l'activité électrique du NAV vers les ventricules par les faisceaux de His est représentée par l'intervalle P-R (environ 120 ms chez l'humain) et correspond à la durée entre la dépolarisation des oreillettes et celle des ventricules^{6,7}. La dépolarisation des ventricules lors de la systole est illustrée par le complexe QRS (environ 120 ms chez l'humain) et la repolarisation par l'onde T (environ 160 ms chez l'humain). Ainsi, la durée du cycle de dépolarisation et repolarisation ventriculaire est mesurée par l'intervalle QT sur l'ECG.⁸

La conduction de l'activité électrique du NSA vers le myocarde est notamment dépendante de l'interaction intercellulaire au sein du NSA.

I.1. Structure du NSA et conduction électrique

I.1.1 Structure et organisation du NSA

Le NSA est un tissu cardionecteur fin et transparent situé sur la paroi postérieure de l'oreillette droite, adjacente à la crista terminalis entre les veines caves supérieure et inférieure.⁹ Le NSA est composé de cellules spécialisées qui se contractent et génèrent un PA spontanément. Les cellules sinusales peuvent différer au sein du NSA en fonction de leur localisation et de leur morphologie.¹⁰ Une fois isolées, les cellules sinusales ont pu être distinguées sous 4 formes (**Figure 3**) ; les cellules en fuseau (*spindle*), les cellules allongées (*elongated*), les cellules en araignée (*spider-like*) et les cellules en transition ou atriale-like.¹¹

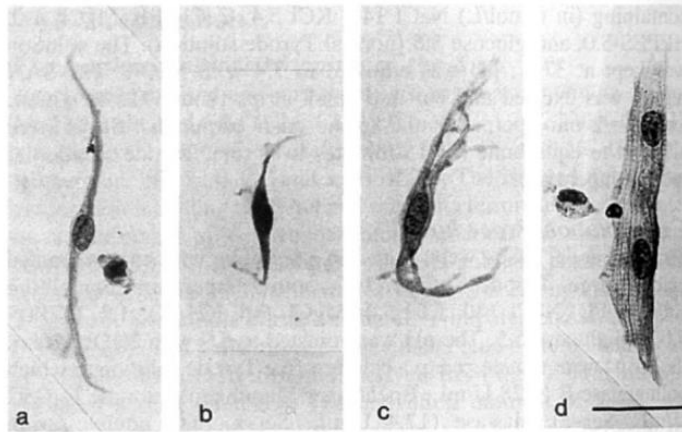


Figure 3- Photographie de cellules sinuales isolées (à gauche) illustrant les différents types de cellules composant le NSA ; (a)Elongated, (b)Spindle, (b) Spider-like, (c) cellules atriales. Dimension barre noir 30 μ m, (Verheijck et al., 1998)

Le NSA est délimitée principalement en deux zones ; le NSA centrale et le NSA périphérique. Ces cellules sont distribuées sur l'ensemble du NSA avec une prédominance des cellules atriales sauf dans la zone centrale du NSA.¹¹ L'hétérogénéité de ce tissu a notamment mis en évidence les différentes propriétés électrophysiologiques des cellules du NSA en fonction de leur localisation. En effet, différentes morphologies de PA ont été observés en fonction de la localisation de ces cellules.¹² De plus, la sensibilité des cellules à la nifédipine, un inhibiteur des canaux calciques de type lent (LTCC) et à la tétrodotoxine (TTX), un inhibiteur des canaux sodiques, varie selon la localisation des cellules du NSA. En effet, la nifédipine inhibe l'automatisme des cellules central du NSA mais pas périphérique, à l'inverse de la TTX qui ralentit la fréquence de dépolarisation des cellules périphériques du NSA uniquement.¹³ Ceci suggère que les cellules situées dans la zone centrale du NSA n'expriment pas ou peu de canaux sodiques, contrairement aux cellules périphériques.

La propagation de l'activité électrique du NSA est dépendante de l'expression de jonctions communicantes entre les cellules.¹⁴ Ces jonctions sont situées au niveau de la membrane plasmique des cellules et sont formées par des hémi-canaux appelés également connexons.^{14,15} Ces connexons sont formés de 6 sous-unités protéiques transmembranaires nommées connexines (Cx) dont 4 isoformes sont exprimés dans le cœur et notamment dans le NSA ; Cx30, Cx40, Cx43 et Cx45.^{16,17} Ces jonctions assurent la propagation de l'activité électrique entre cellules et le maintien d'un rythme cardiaque régulier. Leur expression diffère selon leur localisation ; les Cx45 sont prédominantes dans la région centrale du NSA et les Cx40 et Cx43 sont prédominantes dans la région périphérique du NSA. En effet, les Cx45 seraient essentielles à la coordination et à la synchronisation et les Cx40 et Cx43 contribueraient à la propagation de l'activité électrique.¹⁷

II.1.2 Conduction électrique du NSA vers d'autres centres rythmogènes

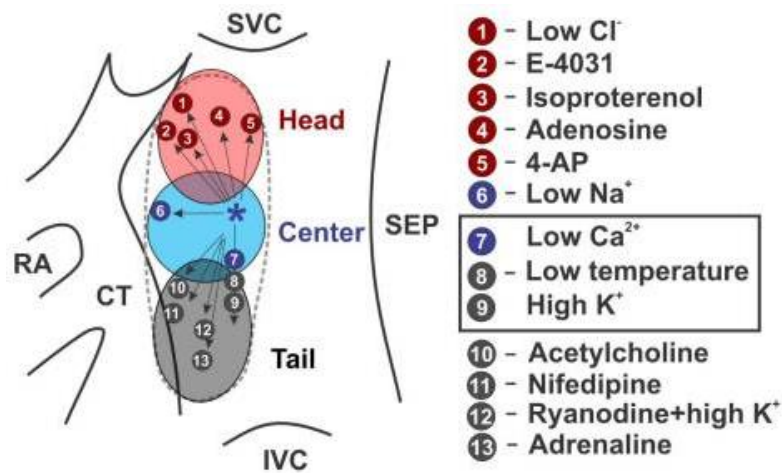


Figure 4- Représentation schématique du déplacement du centre initiateur du pacemaker ; Déplacements du centre initiateur du NSA en réponses à différents stimuli. RA : oreillette droite, CT : crista terminalis, SVC : veine cave supérieure, IVC : veine cave inférieure, SEP : septum interatrial. (Lang et al., 2021)¹⁸

L'initiation de cette activité électrique est régie par le centre initiateur ou « leading site » situé au niveau de la région centrale du NSA près de la veine cave supérieure. Cependant, ce centre initiateur n'est pas statique et sa position peut être différente selon les conditions physiopathologiques (**Figure 4**)¹⁸. En effet, il est possible d'observer les déplacements de ce centre initiateur par cartographie optique en réponse à une stimulation sympathique (agoniste β -adrénergique), une stimulation parasympathique (agoniste muscarinique) ou lors d'une dysfonction sinusale.¹⁸

Par ailleurs, il a été récemment observé que la stimulation sympathique de cellules sinusales isolées sans activité électrique spontanée apparente, dites « cellules dormantes », conduisait à la génération d'une activité électrique spontanée de ces cellules.¹⁹ Le même effet a été retrouvé ex vivo sur le NSA intact isolé de souris.^{20,21} Ainsi, la présence de ces cellules dites « dormantes » pourrait potentiellement contribuer au déplacement du centre initiateur de l'activité électrique du NSA en réponse à une réponse β -adrénergique.

Afin de mieux comprendre la propagation de l'activité électrique du NSA, différents types de modèles d'organisation des cellules du NSA ont été suggérés ; le modèle gradient qui reprend les notions de zone centrale et périphérique du NSA et le modèle mosaïque (**Figure 5**).

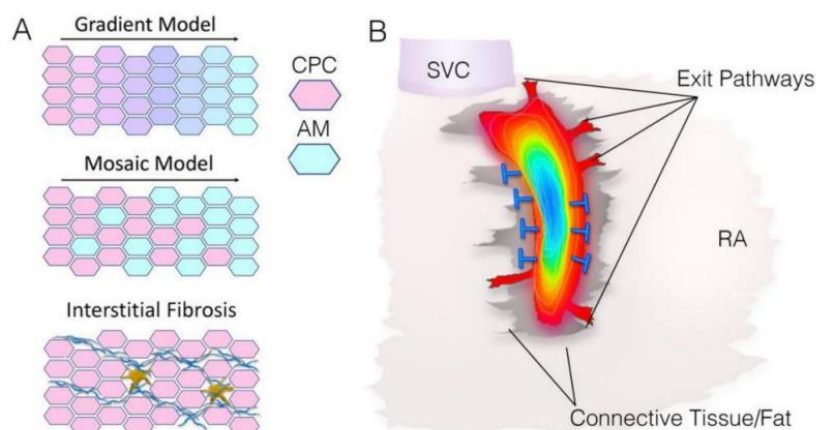


Figure 5- Représentation schématique des modèles de propagation de la conduction électrique du NSA ; (A) Représentation graphique des modèles de gradient, mosaïque et de fibrose interstitielle. CPC, cellules pacemaker cardiaques ; AM, cellules atriales. (B) Diagramme de conduction électrique du NSA (bleu vers rouge). Cette conduction électrique du NSA est délimitée par des voies d'échappement (Exit pathways) et des tissus connectifs (gris) qui servent de barrières (lignes bleues) contre l'influence hyperpolarisante de l'oreillette droite. SVC, Veine cave supérieure ; RA, oreillette droite (Easterling et al., 2021)²²

Le modèle gradient suggère une transition progressive des phénotypes des cellules du centre du NSA vers la périphérie et suggère que celles-ci présenteraient des caractéristiques différentes notamment la morphologie, la densité des courants ioniques et la conductivité.^{10,23,24} Un modèle alternatif dit « mosaïque » suggère que le NSA est constitué de deux populations de cellules (sinusales et atriales) disposés de manière alternative (**Figure 5**). La prédominance d'un type cellulaire d'une région du NSA dicte alors les propriétés électrophysiologiques de celle-ci.^{25,26} Cependant, ces modèles feraient débat. En effet, certains auteurs auraient rejeté le modèle de mosaïque stipulant que les caractéristiques électrophysiologiques retrouvées sur cellules sinusales isolées des différentes régions du NSA correspondraient au modèle de gradient définissant un NSA central et périphérique.²⁷ Cependant, les nouveaux modèles bio-informatiques soutiennent le modèle mosaïque mettant en évidence l'hétérogénéité et la complexité de ce tissu.²⁶ Enfin, il a été suggéré que le NSA serait entouré de tissus fibreux et adipeux qui serviraient de barrière contre l'influence hyperpolarisante de l'oreillette droite.^{28,29} En effet, le potentiel de repos des cardiomyocytes atriaux est plus négatif que celui des cellules du NSA. Ainsi, le contact les cellules atriales hyperpolarise les cellules du NSA et agissent comme un inhibiteur de l'automatisme du NSA. De ce fait, une accélération de la fréquence de dépolarisation du NSA a été observée après séparation de l'oreillette droite.³⁰ Ainsi, ces voies d'échappement permettraient alors de propager le signal électrique vers les oreillettes et le NAV. La propagation de l'activité électrique du NSA vers le NAV est ensuite ralentie lors de sa transition entre les oreillettes et les ventricules et serait dû à l'expression de Cx45 à faible conductance au sein du NSA périphérique.²⁹ En effet, ce ralentissement limiterait la survenue de tachycardie ventriculaire lors d'une réponse β -adrénergique chez l'humain.³¹

L'activité électrique est ensuite propagée du NAV vers les faisceaux de His jusqu'aux fibres de Purkinje (PF) situés dans la couche sous-endocardique des ventricules et permettant ainsi une contraction homogène des ventricules.³² Ces fibres de Purkinje sont composées de cellules dites de Purkinje de formes cylindriques et de petite taille (**Figure 6**). Bien qu'elles puissent être automatiques, les PA de ces cellules sont différents des PA des cellules du NSA et NAV.^{33,34} Les PF assurent alors la propagation rapide du signal électrique vers les ventricules du fait de l'expression de Cx40 et une résistance entre les cellules très faible (100 Ω /cm). En cas de bloc auriculo-ventriculaire, l'automatisme est relayé aux PF afin de maintenir la contraction synchrone des ventricules bien que la fréquence de dépolarisation des PF reste plus faible que celle du NAV et du NSA.³³

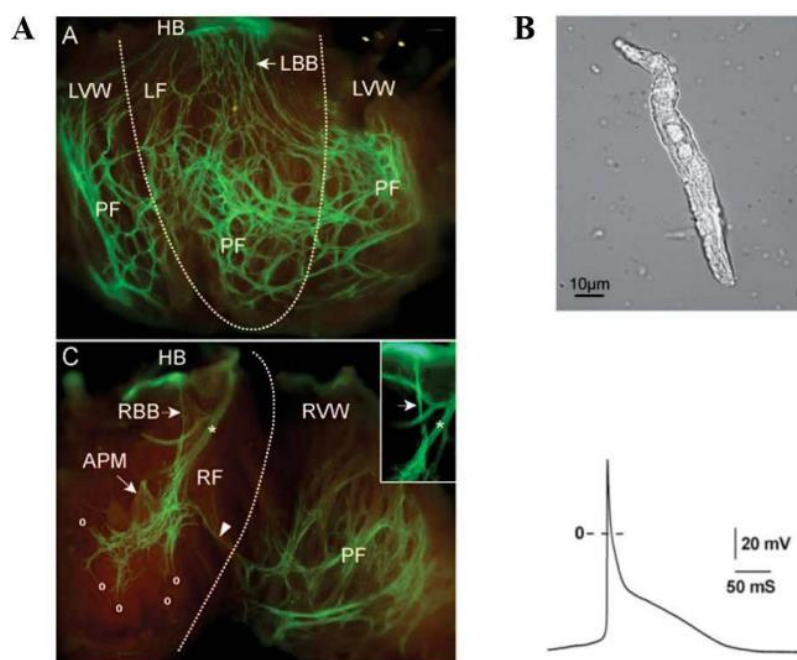


Figure 6- Architecture des fibres de Purkinje révélée par marquage de la Cx40 par la GFP. (A) Marquage par immunofluorescence des fibres de Purkinje, (B) Photo d'une cellule de Purkinje et son potentiel d'action automatique. HB : faisceau de His, PF : fibres de Purkinje, LVW : paroi du ventricule gauche, RVW : paroi du ventricule droit, LBB : branche gauche du faisceau de His, RBB : branche droite du faisceau de His, APM : muscles papillaires. (Miquerol et al., 2004)³⁴

I.2. Propagation du potentiel d'action

L'activité électrique du cœur ou potentiel d'action (PA) se propage des oreillettes (NSA et NAV) aux ventricules. Les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires sont des cellules dites excitables, c'est-à-dire qu'elles s'activent à la réception d'un signal électrique. A la suite de signal électrique, les cellules génèrent un PA. Un PA est décrit comme une variation de potentiel de membrane déterminée par l'activité des canaux ioniques voltage-dépendants présents à la surface de la cellule. L'hétérogénéité de ces PA est conférée par les différences d'expression des canaux ioniques qui permettent le passage

d'ions de part et d'autre de la membrane des cardiomyocytes. En effet, l'activité de ces canaux ioniques détermine la forme et la durée des PA. (**Figure 7**)

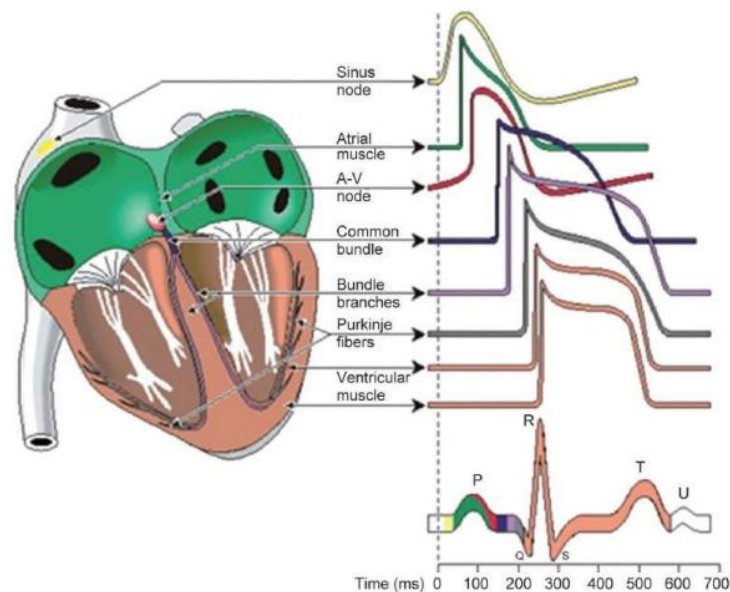


Figure 7- Morphologie des potentiels d'action selon les régions du cœur ; Schéma d'une coupe longitudinale du cœur et illustration des différents types de potentiels d'actions correspondant au tracé d'électrocardiogramme (ECG) humain (Weisbrod et al.,2016)⁸

Par exemple, dans les cellules non automatiques tels que les cardiomyocytes ventriculaires, le PA est décrit en 5 phases (dépolariation, repolarisation précoce, phase de plateau, repolarisation et maintien du potentiel de repos) (**Figure 8**).

La **phase 0** correspond à la dépolariation du PA. L'activation rapide des canaux sodiques voltage-dépendants $Na_v1.5$ à un seuil d'activation de -55 mV, conduit à un courant entrant d'ions sodium (Na^+).³ Cette dépolariation membranaire induit l'inactivation rapide des canaux $Na_v1.5$ qui marque la fin de la phase 0 de dépolariation.

La **phase 1** ou phase de repolarisation précoce comporte une composante rapide et lente. La dépolariation membranaire induit l'activation du courant potassique transitoire ($I_{to,fast}$) responsable d'un courant repolarisant rapide médié par les canaux $K_v4.2$ et $K_v4.3$ qui s'activent et s'inactivent rapidement.³⁵ La composante lente de la repolarisation est due à l'activation des canaux $K_v1.4$ responsables du courant $I_{to,slow}$. Cette sortie de potassium couplée à l'inactivation des canaux sodiques entraîne une repolarisation rapide du potentiel membranaire caractérisée par un pic visible en phase 1.

Lors de la **phase 2**, l'équilibre dynamique entre les courants dépolarisant et les courants repolarisant conduit à une phase de plateau. L'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L ($I_{Ca,L}$) « Long lasting » ($Ca_v1.2$) à un seuil d'activation de -50 mV induit un courant entrant d'ions calcium (Ca

²⁺).³⁶ En réponse à l'ouverture de ces canaux, les récepteur à la ryanodine (RyR2) libèrent du Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique (RS), véritable réservoir de Ca^{2+} de la cellule. Pendant cette même phase, l'activation des canaux K^+ voltage-dépendants I_{Kur} , I_{Kr} et I_{Ks} (respectivement $\text{K}_V1.4$, $\text{K}_V11.1$ et $\text{K}_V7.1$) ouverts à des voltages similaires induit un courant repolarisant. L'activation d'un courant dépolarisant et repolarisant conduit à cette phase de plateau.³⁷

La **phase 3** correspond à la phase de repolarisation. Elle est induite par l'inactivation des canaux calciques de type L ($I_{Ca,L}$) et conduit à une prédominance des courants potassiques par l'activation des canaux K^+ voltage-dépendants responsable du courant I_{K1} ($\text{K}_{ir}2.1$ majoritairement).³⁵

La concentration intracellulaire élevée en ions K^+ des cardiomyocytes ventriculaires conduit à un courant sortant repolarisant entraînant un retour au potentiel de repos entre -80 et -90 mV (**phase 4**). Le maintien du potentiel de repos est essentiellement dû à l'activation du canal potassique $\text{Kir}2.1$ responsable du courant I_{K1} .³ Ce courant est entrant à des potentiels plus négatifs que le potentiel de repos (-80 mV) et sortant à des potentiels entre -80 mV et +20 mV.

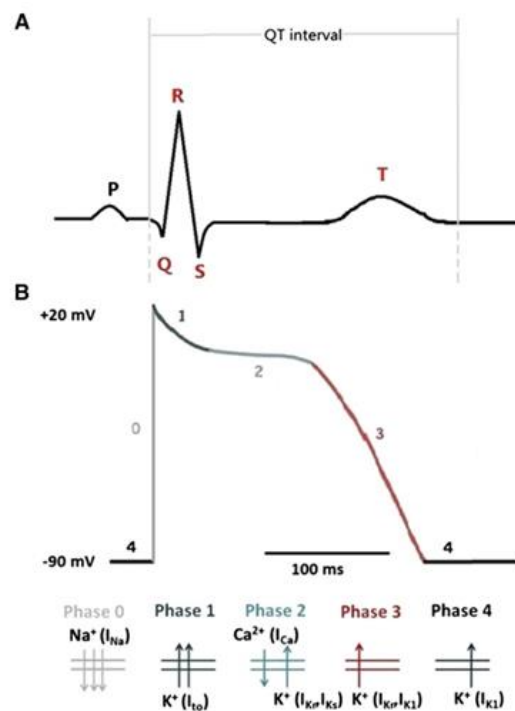


Figure 8- Représentation schématique d'un ECG humain associé au potentiel d'action ventriculaire ; (A) Représentation schématique d'un ECG normal chez l'humain ; la dépolarisation ventriculaire coïncide avec le complexe QRS et la repolarisation ventriculaire avec l'onde T. L'intervalle QT (350-440 ms chez l'humain) correspond au temps entre le début de la dépolarisation ventriculaire et la fin de la repolarisation ventriculaire. (B) Représentation schématique du potentiel d'action des cardiomyocytes ventriculaires et ses différentes phases ; Dépolarisation rapide par activation des canaux sodiques voltage-dépendants (I_{Na}) (phase 0), Repolarisation rapide par l'activation des canaux potassiques voltage-dépendants (I_{to}) (phase 1), Phase de plateau par activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L ($I_{Ca,L}$) et canaux K^+ des courants rectifiant entrants (I_{Kur} , I_{Kr} et I_{Ks}) (phase 2), Repolarisation par activation des canaux K^+ voltage-dépendants (I_{K1}) (phase 3) et retour au potentiel de repos. (Illustration de Li et al., 2016)³⁸

I.3. Couplage Excitation-Contraction (CEC)

Pendant le PA, la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants de type L (LTCC) et ainsi une entrée d'ions Ca^{2+} . L'entrée de Ca^{2+} qui s'ensuit est insuffisante pour déclencher une contraction des cardiomyocytes mais active des canaux de libération calcique, les récepteurs à la ryanodine type 2 (RyR2). Les RyR2 entraînent ensuite une sortie massive de Ca^{2+} du RS vers le cytosol par le phénomène de « Calcium-Induced Calcium Release »(CICR).³⁹ Ce phénomène décrit l'ouverture des RyR2 par l'augmentation des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} via les LTCC. Ainsi ce signal calcique initial est amplifié mettant à disposition suffisamment de Ca^{2+} pour induire la contraction des sarcomères après la liaison du Ca^{2+} sur la troponine C permettant ainsi l'interaction actine-myosine.⁴⁰ Ce mécanisme induisant la contraction des sarcomères est décrit comme le couplage Excitation-Contraction (CEC)⁴⁰ (**Figure 9**).

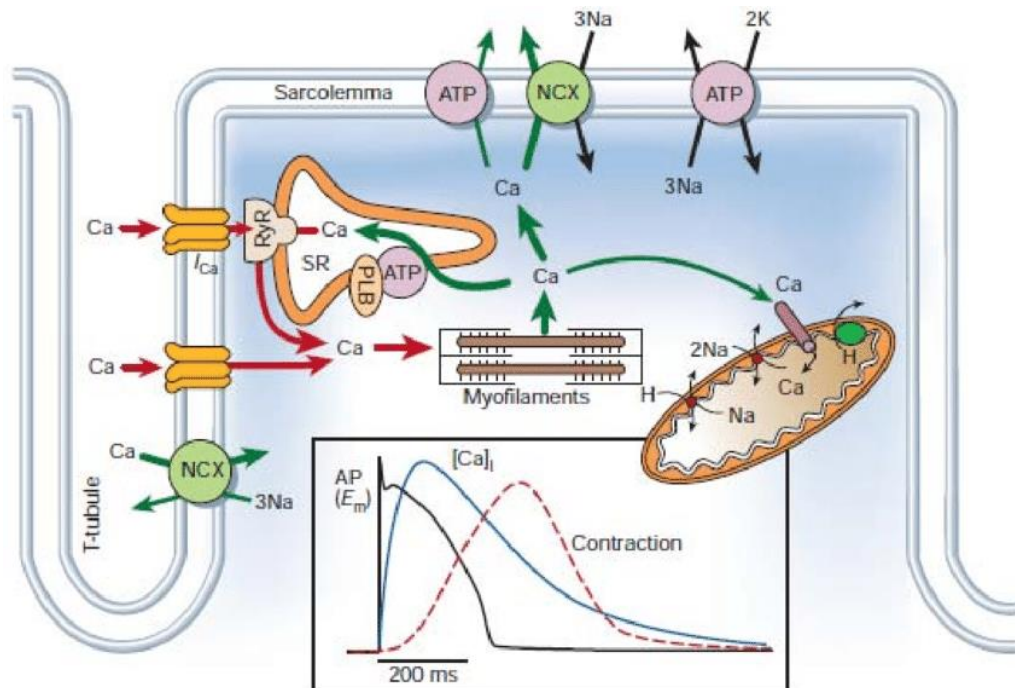


Figure 9- Mécanismes du couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes ventriculaires. Enregistrement simultané d'un potentiel d'action (courbe noire), un transitoire calcique (courbe bleue) et une contraction cellulaire (courbe rouge) dans un cardiomyocyte ventriculaire de lapin à 37°C. NCX, Echangeur Sodium/Calcium ; ATP, ATPase, PLB, Phospholamban ; SR, Réticulum Sarcoplasmique (Bers, Nature review 2002)⁴⁰

La proximité entre les canaux calciques impliqués dans le CEC (LTCC et RyR2) est importante au bon fonctionnement de ce mécanisme. En effet, la membrane plasmique des cardiomyocytes ventriculaires présente des invaginations qui forment les tubules T. Ces tubules T forment avec le RS jonctionnel les

dyades, structure fondamentale lors du CEC. L'altération structurelle des tubules T dans un modèle d'insuffisance cardiaque (IC) induit notamment l'altération du CEC, démontrant ainsi le rôle prépondérant des LTCC dans le mécanisme de CICR des cardiomyocytes ventriculaires.⁴¹

Cette augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ est transitoire. En effet, le Ca^{2+} est majoritairement repompé dans le RS par une pompe Ca^{2+} /ATPase localisée sur la membrane du RS (SERCA2A pour « Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase ») afin de remplir les réserves du RS. L'activité de cette pompe est régulée par une protéine associée, le phospholamban (PLB) qui agit comme un frein sur SERCA2A lorsque qu'il n'est pas phosphorylé. Ce Ca^{2+} est également extrudé hors de la cellule par l'échangeur Sodium/Calcium (NCX). La recapture par SERCA2A et l'extrusion par NCX du Ca^{2+} sont les deux mécanismes principaux permettant le retour aux concentrations calciques diastoliques. Il existe d'autres mécanismes dits « lents » : la pompe Ca^{2+} /ATPase plasmique (PMCA) et les mitochondries qui captent le Ca^{2+} par l'uniport calcique mitochondrial (**Figure 9**). Ainsi, la diminution des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} permet de rétablir l'homéostasie calcique et la relaxation des sarcomères.⁴⁰

Cette libération calcique cytosolique a été observée pour la première fois dans les années 60 sur des fibres musculaires de crustacée puis visualisées pour la première fois dans les années 70 dans les œufs de poisson après l'injection d'une photoprotéine (aequorin) spécifique émettant de la lumière lorsque les concentrations en Ca^{2+} augmentent.⁴³ L'injection de cette même photoprotéine dans des cardiomyocytes de grenouille a permis d'observer une augmentation de Ca^{2+} transitoire lors du CEC dont l'amplitude s'élevait après injection d'isoprénaline (ISO), un agoniste des récepteurs β -adrénergique.⁴⁴

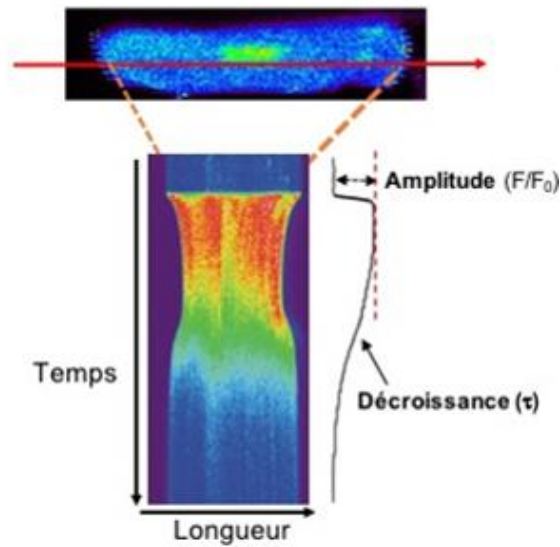


Figure 10- Image illustrant un transitoire calcique ; Coupe longitudinale (line scan) d'un cardiomyocyte ventriculaire isolé de souris adulte par microscopie confocale, incubée avec une sonde fluorescente calcique, après stimulation électrique à 1Hz. A droite de l'image se trouve le rapport de fluorescence normalisée permettant de caractériser les paramètres de ce transitoire (amplitude et décroissance du transitoire calcique)

Cette augmentation transitoire de Ca^{2+} lors de la phase systolique est notamment appelée « transitoire calcique » et correspond à une libération de Ca^{2+} globale et synchronisée induite par la dépolarisation membranaire des cardiomyocytes lors d'un PA (**Figure 10**). Afin d'étudier notamment le CEC, le transitoire calcique peut être visualisé par microscopie confocale après incubation des cardiomyocytes isolées à une sonde fluorescente calcique (Fluo3AM ou 4AM) perméable à la membrane. La quantification des paramètres tels que l'amplitude et le temps de décroissance de ces transitoires nous communique des informations sur l'activité des canaux impliqués dans le CEC. L'amplitude du transitoire est mesurée par le rapport entre F la fluorescence du signal et F_0 la fluorescence sur la période diastolique et correspond à l'augmentation de Ca^{2+} globale dans la cellule via les RyR2 et les LTCC. La mesure du temps de décroissance du transitoire (decay time, tau, en ms) correspond au retour à l'homéostasie calcique via entre autres NCX et SERCA2A.

Lors de la phase diastolique, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} reste faible (de l'ordre de 100 nM) et les RyR2 sont majoritairement fermés. Cependant, une libération de Ca^{2+} spontanée via les RyR2 pendant la phase diastolique dans des cardiomyocytes ventriculaires a été visualisée par microscopie confocale à l'aide de sonde fluorescente calcique et a été décrite comme des libérations rapides, brèves et localisées nommées « étincelles de Ca^{2+} » ou « Ca^{2+} sparks » (**Figure 11**).⁴⁵

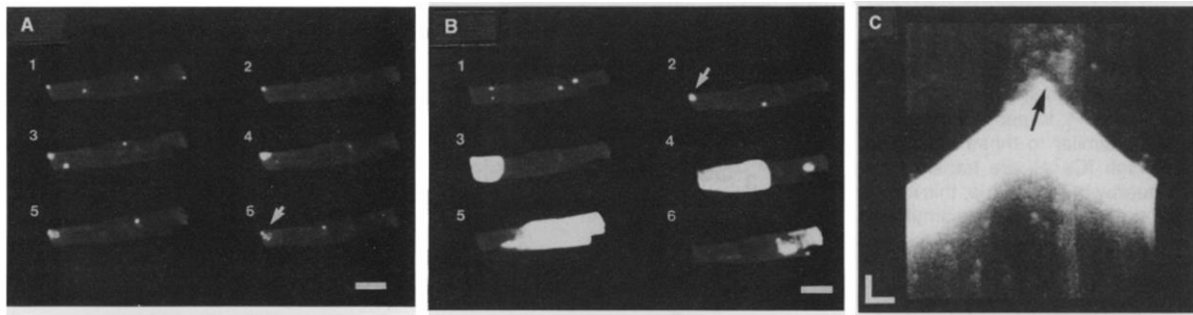


Figure 11- Images séquentielles de cardiomyocytes ventriculaires isolés et quiescents de rat couplés à une sonde calcique (Fluo3AM) présentant des sparks et vagues calciques après augmentation de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire dans la solution (10 mM) ; (A) Images séquentielles obtenues toutes les 0.5 secondes. Les points blancs correspondent aux Ca^{2+} sparks à travers la cellule. Echelle 20 μm . (B) Images séquentielles de la même cellule 4 minutes plus tard illustrant la propagation d'une vague calcique initiée après recrutement de Ca^{2+} sparks (flèche blanche). (C) Coupe transversale (line scan) d'une cellule illustrant une vague calcique à une vitesse de propagation de 70 $\mu\text{m/s}$ (flèche blanche). Les sparks calciques sont présents en grand nombre à l'origine (Flèche noire) et à la fin de la vague démontrant le mécanisme d'activation des vagues calciques par recrutement de Ca^{2+} sparks. Echelle 10 μm horizontal et 200 ms vertical) (Cheng et al.,1993)⁴⁵

Les Ca^{2+} sparks correspondent à des libérations localisées, rapides et brèves de Ca^{2+} intracellulaire à partir d'un groupe ou cluster de RyR2 sur la membrane sarcoplasmique.⁴⁶ Ces libérations locales peuvent survenir lors d'une activation des LTCC ou spontanément.^{41,45} Ils sont caractérisés par une amplitude variable, une durée courte (environ 25 ms) et un diamètre court (1-2 μm).^{46,47} Les transitoires calciques sont la sommation temporelle et spatiale de Ca^{2+} sparks. Ces Ca^{2+} sparks ont d'abord décrits dans les cardiomyocytes ventriculaires puis dans les cellules atriales et dans le NSA.^{48,49}

II. Mécanismes de l'automaticité du nœud sinusal

II.1 Caractéristique du potentiel d'action sinusal

Au sein du tissu nodal, les PA générés par les cellules du NSA et du NAV présentent une morphologie et des caractéristiques différentes des PA des cardiomyocytes ventriculaires. En effet, le PA des cellules sinusales sont caractérisées par une dépolarisation diastolique spontanée (DD) (phase 4 du PA sinusal) (**Figure 12**). Cette DD conduit à une dépolarisation lente et progressive du potentiel de membrane jusqu'à atteindre un seuil d'activation nécessaire à la génération d'un PA. Cette phase, non présente dans les cardiomyocytes ventriculaires, confère aux cellules du tissu nodal un caractère automatique.

Depuis la découverte du tissu sinusal en 1907, les mécanismes autour de l'automaticité cardiaque ont suscité beaucoup d'interrogations. La DD du PA sinusal, nommée pré-potentiel jusqu'alors, a été mesuré pour la première fois en 1955 par West par la technique de microélectrodes^{1,50-52}. La caractérisation du PA sinusal et la mise en place de technique d'isolement des cellules sinusales ont permis la mise en évidence du courant pacemaker I_f comme mécanisme principal de la génération

automatique des PA du pacemaker cardiaque et ainsi de la DD. La DD est notamment décrite en phase initiale et tardive.⁵³

La DD initiale est induite majoritairement par l'activation des canaux activés par l'hyperpolarisation de la membrane ou *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels* (HCN) responsable du courant *funny* (I_f). D'autres canaux voltage-dépendants contribuent à cette DD tels que les canaux calciques voltage-dépendants de type T, TTCC ($I_{Ca,T}$) notamment les canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$, les canaux calciques voltage-dépendants de type L, LTCC ($I_{Ca,L}$) notamment les canaux $Ca_v1.3$ (**Figure 12**).^{54,55} Ces canaux voltage-dépendants font partie d'une horloge dite membranaire ou « voltage clock ».

Il a été également proposé que le Ca^{2+} intracellulaire soit impliqué dans cette DD, notamment lors de la phase tardive.^{56,57} L'implication du Ca^{2+} dans la phase tardive de la DD a notamment été mis en évidence par l'incubation de ryanodine (inhibiteur de RyR2) sur des tissus auriculaires isolés de chats. En effet, la ryanodine induit une diminution de la pente de la DD. Il a notamment été démontré que des libérations locales et spontanées de Ca^{2+} via le RyR2 lors de la phase tardive de la DD activent les échangeurs NCX et accélèrent la DD par induction d'un courant entrant.^{56,58-60} Ce phénomène impliquant les ions Ca^{2+} est décrit comme une horloge calcique ou « Ca^{2+} clock ». Les caractéristiques et le rôle de ces canaux dans l'automatisme des cellules sinusales sont détaillés dans la partie suivante.

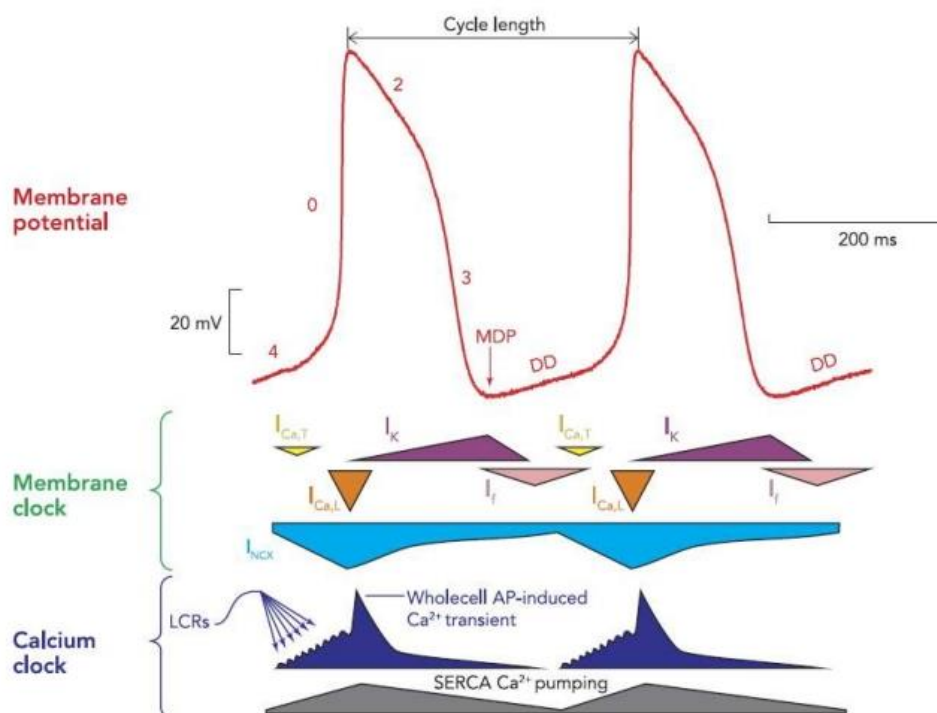


Figure 12- Le potentiel de membrane des cellules sinusales et les mécanismes associés ; (Haut) Potentiel d'action spontanée de cellules sinusales de lapin et ses différentes phases ; Dépolarisation diastolique (DD) spontanée en phase 4, dépolarisation membranaire rapide (phase 0) suivie d'une repolarisation membranaire (phase 2 et 3). (Milieu) Représentation schématique de l'amplitude et de la durée d'activation des canaux ioniques impliqués dans l'horloge électrique (Membrane clock). (Bas) Représentation schématique de l'amplitude et de la

durée d'activation des canaux ioniques impliqués dans l'horloge calcique (Calcium clock). *MDP* : potentiel diastolique maximum ; *DD* : dépolarisation diastolique ; *I_f* : courant « funny » ; *I_{Ca,T}* : courant Ca^{2+} voltage-dépendant de type T ; *I_{Ca,L}* : courant Ca^{2+} voltage-dépendant de type L ; *I_K* : courant K^+ voltage-dépendant ; *I_{NCX}* : courant de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} ; *LCR* (Local Ca^{2+} Release) : libération locale de Ca^{2+} ; *SERCA* : Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique (Monfredi et al., 2013)⁶¹

Cette phase de dépolarisation membranaire (**phase 0**) est notamment due à une entrée de Ca^{2+} par les LTCC ($Ca_v1.2$). La dépolarisation est ensuite suivie d'une repolarisation lente (**phase 2 et 3**) jusqu'au retour au potentiel diastolique maximum par l'activation des canaux K^+ voltage-dépendants. En effet, le potentiel de membrane des cellules sinusales n'atteint pas de potentiel de membrane de repos stable dû à l'absence de courant I_{K1} contrairement aux cardiomyocytes ventriculaires.⁶² Après avoir atteint un potentiel de repolarisation maximal appelé potentiel diastolique maximal (MDP, autour de -60 mV), les cellules sinusales se dépolarisent spontanément et progressivement jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement du PA suivant (aux alentours de -45/-35 mV).⁵⁴

La caractérisation des acteurs impliqués dans la génération d'une activité électrique spontanée des cellules du NSA et dans la régulation de cette automaticité a permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'automatisme du nœud sinusal que l'on connaît aujourd'hui sous forme de deux horloges couplées ; l'horloge membranaire et l'horloge calcique. Ce couplage d'horloges régule l'automatisme des cellules sinusales via l'activation séquentielle des canaux ioniques voltage-dépendants et la libération spontanée de Ca^{2+} via le RyR2.^{61,63}

II.2 Canaux impliqués dans la dépolarisation du PA sinusal

Dans cette partie, nous détaillerons les canaux impliqués dans la dépolarisation du PA sinusal, particulièrement lors de la DD mentionnée plus haut.

II.2.1. Canaux impliqués dans l'horloge membranaire

II.2.1.1 Canaux activés par l'hyperpolarisation de la membrane ou Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels (HCN)

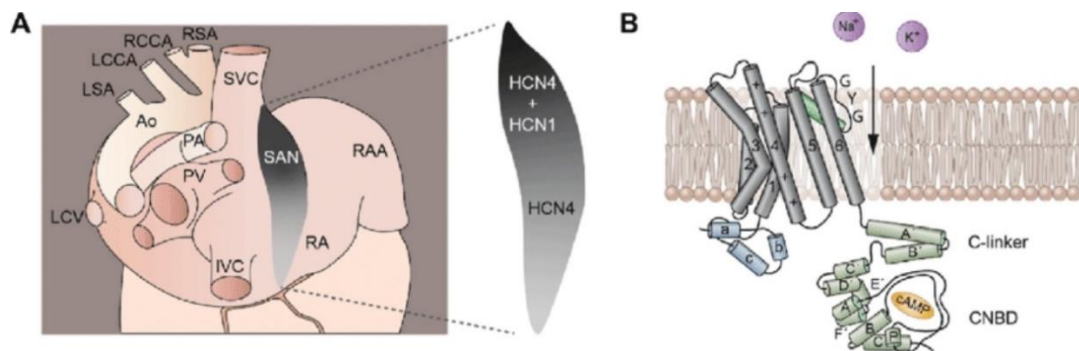


Figure 13- Localisation et représentation schématique des canaux HCN4 dans le NSA ; (A) Représentation schématique d'un cœur illustrant la localisation du NSA et l'expression des canaux HCN (prédominance des HCN4), **(B)** Représentation schématique des canaux HCN et de leurs sous-unités. *SVC*, Veine cave supérieur ; *IVC*, Veine cave inférieur ; *RAA*, Appendice de l'oreillette droite ; *Ao*, Aorte ; *RSA*, Artère subclavière droite ; *LCCA*, Artère

carotique gauche ; RCCA, Artère carotide droite right ; LSA ; Artère subclavière gauche ; LCV, Veine cérébral gauche ; PA, Artère pulmonaire ; PV, Veine pulmonaire. (Adapté de Hennis et al., 2021)⁶⁴

Le caractère automatique du NSA est notamment conféré par l'expression du gène *Hcn4* codant pour les canaux ioniques HCN4 responsable du courant I_f et de l'initiation de la DD du PA sinusal. Les canaux HCN4, étant spécifiques aux cellules sinusales, sont fréquemment utilisés comme marqueurs pour identifier les cellules sinusales.⁶⁵ Les canaux HCN sont des tétramères appartenant à la superfamille de canaux à 6 segments transmembranaires (S1-S6) (**Figure 13**). Ces canaux sont responsables d'un courant ionique I_f , appelé « *funny current* ». Son nom « *funny* » réfère à la propriété de ce courant d'être activé par une hyperpolarisation du potentiel de membrane et non d'une dépolarisation comme la plupart des autres canaux ioniques. Ces canaux sont constitués de senseur de voltage (segment S4) et d'une séquence glycine-tyrosine-glycine (GYG) entre les segments 5 et 6 qui favorise la perméabilité des cations avec une forte perméabilité des ions K^+ et Na^+ et une faible perméabilité des ions Ca^{2+} .^{66,67} En effet, la mesure du courant I_f sur des cellules sinusales de lapin et de souris a démontré une réduction de ce courant à des concentrations Na^+ extracellulaire diminuées (de 135 mM à 50 mM) et une augmentation de celui-ci à des concentrations de K^+ extracellulaires augmentées (de 5 à 35 mM).^{53,68}

Ces canaux sont exprimés sous 4 isoformes (HCN1, HCN2, HCN3, HCN4) sous forme d'hétéro ou d'homotétramères et sont tous exprimés dans le cœur, notamment les hétérotétramères HCN1-HCN4 et HCN2-HCN4 décrits dans le NSA.⁶⁹⁻⁷⁴ Ils sont cependant exprimés dans différentes régions du NSA ; HCN1 et HCN2 dans les myocytes périphériques et HCN4 sur la majorité du tissu et constituant la forme prédominante (70-80%).^{72,75} L'isoforme HCN3 contribue quant à lui au potentiel de membrane ventriculaire chez la souris.⁷⁶

Ces isoformes se distinguent par leurs caractéristiques notamment par leur cinétique d'activation et leur sensibilité aux nucléotides cycliques.⁷⁰ En effet, les canaux HCN possèdent un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD) dans leur région C-terminale. L'interaction directe de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) sur ce domaine active les canaux HCN et donc le courant pacemaker I_f .⁷⁷ La production d'AMPC lors d'une réponse sympathique du système nerveux autonome régule l'automatisme du pacemaker cardiaque. Ainsi une augmentation d'AMPC intracellulaire entraîne une accélération de la cinétique d'activation du courant I_f et donc une accélération du rythme cardiaque.⁷⁸ Les canaux HCN4 sont notamment plus sensibles à l'AMPC que les canaux HCN1 et HCN2.^{69,79,80}

Ces isoformes se distinguent également par leur contribution dans la régulation de la fréquence cardiaque. Des modèles murins n'exprimant pas les canaux HCN1 ont présentés des dysfonctions sinusales caractérisés par une bradycardie sinusale et des pauses sinusales récurrentes suggérant ainsi que les canaux HCN1 participent au maintien d'une fréquence cardiaque stable.⁸¹ La stimulation

sympathique par administration d'un agoniste β -adrénergique, l'isoprénaline, sur des modèles murins présentant une déficience des canaux HCN2 n'a pas démontré une réponse chronotrope différente des souris wild-type (WT) suggérant que la contribution des canaux HCN2 sur la réponse sympathique est moindre. Cependant, en condition basale, ces modèles HCN2 déficients présentent une variabilité importante de la fréquence cardiaque.⁸² Ainsi, ces résultats suggèrent que le rôle des canaux HCN1 et HCN2 dans la régulation de la fréquence cardiaque est moindre mais essentiel à la prévention d'arythmies ou de dysfonctions sinusales.⁸³

L'isoforme HCN4 représente la forme prédominante au sein du NSA humain, canin et rongeurs. Afin d'établir la contribution de ces canaux dans l'automatisme cardiaque, des modèles murins HCN4 déficients ont été générés mais la létalité embryonnaire était trop élevée due à une bradycardie sinusale et une ablation du courant I_f comparés aux souris WT, démontrant ainsi le rôle essentiel des canaux HCN4 dans l'automatisme cardiaque.⁸⁴ Pour contourner ce problème, des modèles murins inductibles HCN4 déficients global ou cardio-spécifique ont été générés. Les cellules isolées du NSA de ces modèles inductibles ont montrés un courant pacemaker I_f réduit, des pauses sinusales récurrentes mais une réponse β -adrénergique préservée. Cette étude démontre ainsi le rôle essentiel des canaux HCN4 dans la génération d'une fréquence cardiaque stable et suggère qu'ils ne sont pas essentiels dans la régulation de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome.⁸⁵ Une étude a notamment suggéré que la modification des concentrations en AMPc par la régulation sympathique modulerait l'excitabilité des cellules du NSA via ces canaux et stabiliserait l'activité électrique au sein du NSA, assurant une synchronicité du rythme cardiaque sinusal.⁸⁶

II.2.1.2 Les canaux calciques voltage-dépendants

Deux types de canaux calciques voltage-dépendants impliqués dans la DD sont exprimés dans le cœur et situés sur la membrane plasmique des cellules : les canaux de type T (TTCC) activés à des potentiels de membrane plus négatifs (-70 mV) que les canaux de type L (LTCC) (-50 mV) (**Figure 14**).

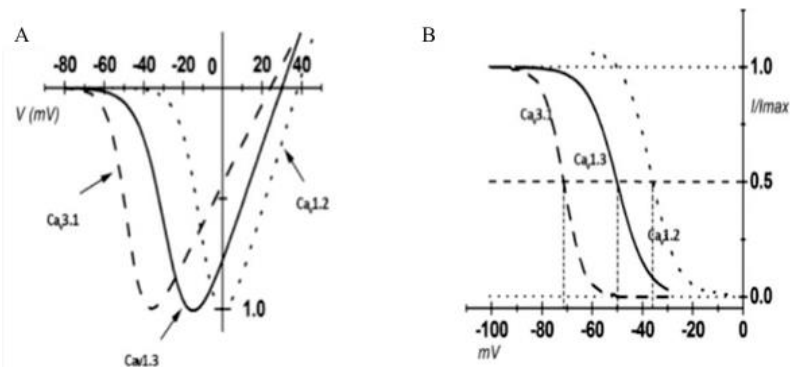


Figure 14-(A) Courbes courant-tension (I-V) et (B) Courbes d'inactivation des canaux calciques voltage-dépendants TTCC (Cav3.1) et LTCC (Cav1.2 et Cav1.3), enregistrées sur cellules sinusales de souris (Mangoni et al.,2006)⁸⁷

II.2.1.2.1 Les canaux calciques voltage-dépendants de type T (TTCC)

Les canaux calciques voltage-dépendants de type T (TTCC) pour « Transients type » sont caractérisés par leur ouverture et fermeture transitoire permettant une entrée brève d'ions Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. Leur activation à un potentiel de membrane négatif (-70 mV) génère un courant calcique entrant (I_{CaT}).^{42,88} Ces canaux sont constitués de 5 sous-unités α_1 , β , γ , α_2 et δ (**Figure 15**). La sous-unité α_1 forme le pore du canal et est codée par différents gènes. Les sous-unités β , γ , α_2 - δ sont des sous-unités auxiliaires.⁵⁵ Les canaux (Ca_v) formés par la sous-unité α_1 appartiennent également à la superfamille de canaux à 6 segments transmembranaires (S1-S6) et sont constitués de senseur de voltage (segment S4) et d'une séquence glycine-tyrosine-glycine (GYG) entre les segments 5 et 6 qui favorise la perméabilité des cations.

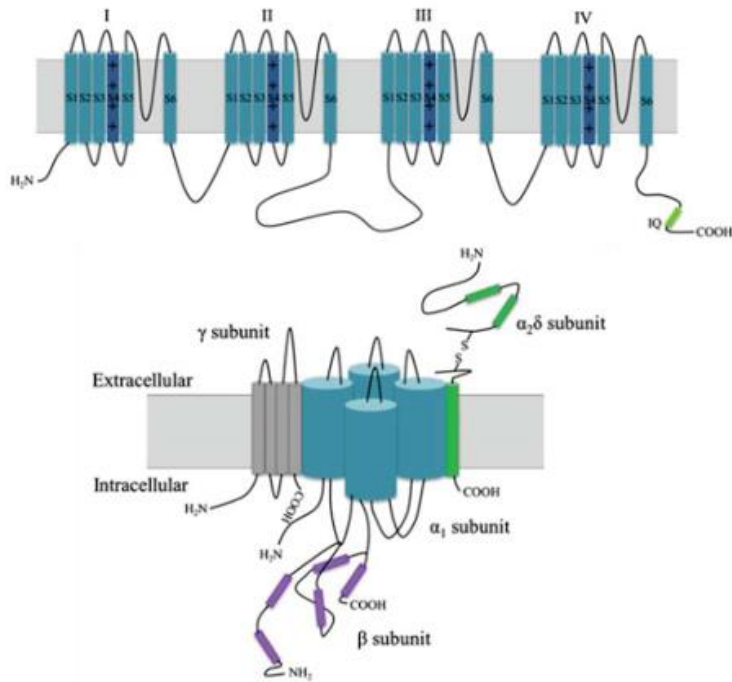


Figure 15- Structure des canaux calciques voltage dépendants ; Ces canaux sont constitués de la sous unité α_1 composée de 4 domaines transmembranaires à 6 segments (S1-S6) qui forme le pore du canal, et de sous unités auxiliaires β , γ , α_2 et δ . (Tevoufouet et al.,2014)⁸⁹

Il existe 3 sous-types de TTCC : $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$ (respectivement codés par α_{1G} , α_{1H} , et α_{1I}).^{90,91} Les sous-types $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ sont exprimés dans le cœur et les neurones tandis que $Ca_v3.3$ ne sont exprimés que dans les neurones.^{92,93} L'expression plus importante des canaux $Ca_v3.1$ dans le cœur adulte et notamment dans le NSA, le NAV et les fibres de Purkinje ont conduit à étudier leurs rôles dans l'automaticité cardiaque.^{42,94-97} En effet, ces canaux participeraient à la DD du PA sinusal.^{59,98} En effet, des modèles murins déficients en canaux $Ca_v3.1$ ont présentés des épisodes de bradycardie sinusale, une conduction atrio-ventriculaire ralentie ainsi qu'une réduction de la pente de DD du PA sinusal sur cellules isolées. Ces résultats démontrent alors le rôle prédominant des canaux $Ca_v3.1$ dans la génération du courant I_{CaT} ainsi que leur importance dans l'automaticité du NSA.⁹⁶ En effet, les modèles murins déficients en canaux $Ca_v3.2$ ne présentent aucune arythmie, ni altération de la DD du PA sinusal suggérant leur moindre contribution dans la génération du courant I_{CaT} dans l'automatisme cardiaque.⁹⁹ Cependant, ces canaux $Ca_v3.2$ sont plus exprimés dans le cœur lors de la phase embryonnaire que les canaux $Ca_v3.1$ suggérant leur rôle plus important lors de la période prénatale.¹⁰⁰

II.2.1.2.2 Les canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCC)

Les canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCC) pour « Long lasting type » s'ouvrent plus lentement et restent ouverts plus longtemps que les TTCC. Leur activation à un potentiel de membrane négatif (-50 mV) génère un courant calcique entrant (I_{CaL}).⁴² La structure de ces canaux est similaire

aux TTCC décrits précédemment. Il existe 4 sous-types de LTCC : $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.4$ (respectivement codés par α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} et α_{1F}).⁹² Seuls les canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ sont exprimés dans le cœur et notamment dans le NSA avec des fonctions différentes.⁹³ Les canaux $Ca_v1.3$ sont impliqués dans la DD du PA sinusal (phase 4) tandis que les canaux $Ca_v1.2$ sont impliqués dans la dépolarisation membranaire du PA sinusal (phase 0).^{101,102} En effet, c'est en 1999 que Verheijck et ses collaborateurs enregistrent un courant $I_{Ca,L}$ sensible à la nifédipine sur des cellules sinusales de lapin.¹⁰² Ce courant, possédant un seuil d'activation de -60 mV, est porté par l'activation des canaux $Ca_v1.3$ qui s'activent à des potentiels de membrane légèrement plus négatifs que les canaux $Ca_v1.2$ (-40 mV) (**Figure 14**). Ainsi, les canaux $Ca_v1.3$ sont activés lors de la phase initiale de la DD tandis que les canaux $Ca_v1.2$ avec un pic d'activation à 0 mV contribuaient à la phase ascendante du PA sinusal.

Par ailleurs, les canaux $Ca_v1.3$ participent à la DD du PA sinusal en facilitant la synchronisation de libération de Ca^{2+} sparks du SR via les RyR2 et entraînent ainsi l'activation du courant I_{NCX} qui accélère la dépolarisation du potentiel de membrane jusqu'au déclenchement du PA.^{59,98} En effet, cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire est notamment facilitée par la colocalisation de $Ca_v1.3$ avec les RyR2 dans le NSA.^{103,104} De plus, l'inhibition des LTCC par la nifédipine, un inhibiteur calcique appartenant à la famille des dihydropyridines, réduit considérablement l'activité spontanée des cellules sinusales isolées et du tissu NSA en inhibant $I_{Ca,L}$ sans altérations du courant $I_{Ca,T}$.¹⁰ Une réduction considérable de la densité du courant $I_{Ca,L}$ a été observée sur des cellules sinusales isolées des modèles murins déficients en $Ca_v1.3$ mettant en évidence la contribution des canaux $Ca_v1.3$ dans la génération du courant $I_{Ca,L}$ du NSA.^{104,105} Ces modèles déficients ont également présenté une dysfonction sinusale, notamment une bradycardie et des arythmies in vivo.^{105,106} L'altération du rythme cardiaque sinusal de ces modèles serait dû à l'altération de la dynamique calcique des cellules sinusales résultant de l'asynchronisme et de la diminution des libérations locales de Ca^{2+} intracellulaire.¹⁰⁴

Récemment, une étude sur un modèle murin pour lequel les canaux $Ca_v1.2$ ont été désensibilisés aux dihydropyridines (famille d'inhibiteurs de canaux calciques) a permis l'inhibition pharmacologique plus spécifique des canaux $Ca_v1.3$ par la nifédipine. Cette étude a été conduite afin de comprendre les mécanismes sous-jacents de la stimulation β -adrénergique des cellules sans activité électrique spontanée apparente dites « dormantes » du NSA. La génération automatique de PA de cellules sinusales dormantes après stimulation sympathique est complètement inhibée après inhibition par la nifédipine, démontrant ainsi le rôle des canaux $Ca_v1.3$ dans l'automatisme des cellules sinusales dites dormantes lors de la réponse β -adrénergique.¹⁰⁷ Les canaux $Ca_v1.3$ sont également importants dans la conduction atrio-ventriculaire. En effet, une altération de la conduction atrio-ventriculaire et de l'automatisme des cellules isolées du NAV a été démontré dans des modèles murins déficient en canaux $Ca_v1.3$.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

II.2.2. Canaux impliqués dans l'horloge calcique

L'inhibition du RyR2 par la ryanodine a démontré un ralentissement de l'automatisme des tissus auriculaires isolés de chat par réduction de la pente de la phase exponentielle de la DD dite également phase tardive, suggérant la contribution de RyR2 dans la génération de la DD du PA sinusal.⁵⁶ La théorie de l'horloge dite calcique décrit des libérations locales et spontanées de Ca^{2+} dit « Local Calcium Release (LCR) » par les RyR2 qui contribuent à l'automatisme cardiaque. Ces LCR activent ensuite l'échangeur NCX qui génère un courant entrant dépolarisant par échange de trois ions Na^+ par un ion Ca^{2+} . L'échangeur NCX participe ainsi à la dernière phase du DD du PA sinusal en accélérant l'atteinte du seuil de déclenchement du PA.^{56,58,59,61} Dans cette partie, nous détaillerons les canaux impliqués dans cette horloge dite calcique.

II.2.2.1 Les récepteurs à la ryanodine (RyR)

Les récepteurs à la ryanodine existent sous 3 isoformes ; les RyR1 exprimés dans les muscles squelettiques, les RyR2 exprimés majoritairement dans le cœur et les RyR3 exprimés dans les neurones hypothalamiques. Ces récepteurs sont constitués d'une partie cytosolique associée à des protéines régulatrices et une partie transmembranaire qui forme le pore central permettant la libération de Ca^{2+} du RS vers le cytosol.¹¹¹ Les caractéristiques du RyR2 seront plus détaillées dans la section IV.

Les RyR2 sont organisées en groupes ou « clusters ». La libération de Ca^{2+} par un cluster de RyR2 peut être visualisée par microscopie confocale sous la forme de Ca^{2+} sparks. Les Ca^{2+} sparks peuvent activer les RyR2 voisins et induire des relargages de Ca^{2+} propagés dans l'espace et le temps en formant des vagues calciques ou « Ca^{2+} waves ».¹¹² Ces libérations locales de Ca^{2+} (LCR) ont notamment été observées vers la fin de la DD dans les cellules sinusales. De plus, ces LCR se produisent de façon périodique et rythmée indépendamment du voltage (cellules perméabilisées) ou sous potentiel membranaire imposé (**Figure 16**).¹¹³ En effet, l'application soit d'un voltage à -65 mV c'est-à-dire proche du potentiel de repos du PA sinusal, soit d'un voltage à -10 mV, potentiel auquel les canaux calciques voltage-dépendants sont inactivés, n'empêchent pas la libération rythmique et périodique des LCR.¹¹³ Cette indépendance au voltage leur confère alors un caractère autonome indépendamment de l'horloge membranaire. C'est pourquoi l'implication des ions Ca^{2+} lors de la DD du PA sinusal est considérée comme une horloge à part entière.

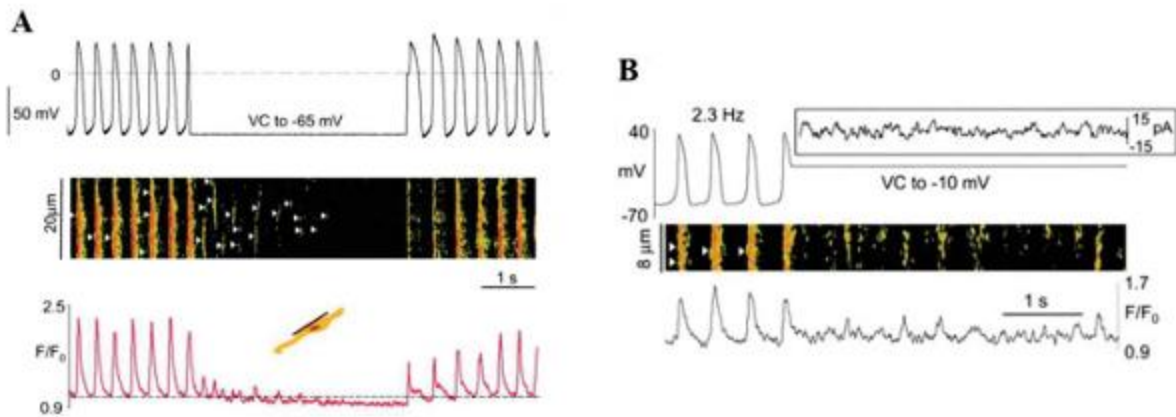


Figure 16- Libération rythmique et périodique indépendamment du voltage des LCR via les RyR2 sur cellules sinusales isolées de lapin. Enregistrement de PA (haut), LCR et transitoire calcique (milieu) et rapport de la fluorescence calcique F/F_0 aux voltages imposés (A) de -65 mV et (B) de -10 mV. (D'après Vinogradova et al., 2004)¹¹³

De plus, un modèle murin inductible exprimant une perte de 50% d'expression de RyR2 a présenté des épisodes de bradycardies et d'arythmies.¹¹⁴ Bien que la libération de Ca^{2+} lors de cette DD soit majoritairement dûe aux RyR2, cette libération est potentialisée par l'activité des canaux $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$. En effet, l'activation de ces canaux conduit à une entrée de Ca^{2+} qui contribue à l'ouverture des RyR2 par mécanisme de CICR.^{55,104} Ces études démontrent bien l'implication du RyR2 dans l'automatisme cardiaque et notamment au sein de l'horloge calcique qui régule l'automatisme du NSA.

II.2.2.2 L'échangeur Na^+ / Ca^{2+} (NCX)

L'échangeur NCX est une protéine située dans la membrane plasmique des cellules et est constitué de 10 segments transmembranaires et notamment d'une boucle intracellulaire entre les segments S5 et S6 dotée de deux sites de liaison du Ca^{2+} (CBD1 et CBD2).^{115,116} L'échangeur NCX est exprimé sous 3 isoformes ; NCX1 exprimé dans le cœur et notamment dans le NSA, NCX2 dans le cerveau et les muscles lisses et NCX3 dans le cerveau et les muscles squelettiques.¹¹⁷

Cette protéine permet l'échange de 3 ions Na^+ par un ion Ca^{2+} entre le compartiment intra- et extra-cellulaire selon deux modes de fonctionnement différents, le mode « forward » et le mode « reverse ».¹¹⁸ Lors du mode « forward », l'entrée de 3 ions Na^+ dans la cellule contre la sortie d'un ion Ca^{2+} induit un courant I_{NCX} entrant, tandis que le mode « reverse » induit un courant I_{NCX} sortant par la sortie de 3 ions Na^+ contre l'entrée d'un ion Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. Ainsi, le mode de fonctionnement du NCX est dépendant des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} et en Na^+ et du voltage.

Dès 1984, l'existence d'un courant I_{NCX} dans les cellules sinusales a été observée.^{119,120} En effet, la substitution du Na^+ extracellulaire par du Lithium (Li^+) a démontré une suppression du courant entrant I_{NCX} sur tissus auriculaires isolées de chat et de l'activité automatique des cellules sinusales de lapin.^{120,121} De même, l'incubation de tissus auriculaires de chat avec une forte dose de ryanodine ($1\mu M$) induit également la suppression du courant I_{NCX} entrant suggérant que le courant I_{NCX} est dépendant des libérations de Ca^{2+} du RS par le RyR2.¹²⁰ En effet, lors de la DD, l'extrusion de Ca^{2+} libéré par les RyR2 induit un courant I_{NCX} entrant dépolarisant qui accélère la phase tardive de la DD jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement du PA.^{59,120}

La contribution de NCX dans l'automatisme cardiaque a notamment été démontré sur un modèle murin déficient en NCX1 et présentant des épisodes d'arythmies sévères et une bradycardie.¹²² En effet, ces arythmies seraient dû à une surcharge en Ca^{2+} intracellulaire altérant la dynamique calcique au sein des cellules sinusales et conduisant à la génération de PA sinusal irréguliers et rapides sous forme de « burst ». ¹²³ Un modèle déficient en NCX spécifiquement dans les cellules atriales aurait également présenté une dysfonction du rythme cardiaque sinusal par l'absence de dépolarisation atriale in vivo et une altération de l'activité automatique des cellules atriales isolées.¹²⁴

L'échange d'ions lui donne également la particularité de maintenir l'homéostasie calcique au sein des cellules. En effet, le retour à l'homéostasie calcique est permis par l'extrusion de Ca^{2+} hors de la cellule par NCX et la recapture du Ca^{2+} vers le RS majoritairement dû à l'activité de SERCA2A. Ce phénomène de recapture est essentiel à la dynamique calcique des cellules sinusales afin de permettre une libération de Ca^{2+} adéquat via les RyR2 lors de la DD.⁵⁴

II.3 Canaux ioniques impliqués lors de la repolarisation du PA sinusal (I_{Kr} , I_{Ks})

Dans les cellules sinusales, plusieurs types de courants potassiques ont été identifiés notamment les courants voltage-dépendants^{125,126} (I_{Kr} , I_{Ks}) impliqués dans la repolarisation du PA sinusal que nous détaillerons dans cette partie. Les courants potassiques qui modulent l'automatisme des cellules sinusales sont détaillés dans la partie suivante.

La dépolarisation du PA sinusal est suivie d'une repolarisation progressive (**phase 2 et 3**) jusqu'au retour au potentiel diastolique maximum par l'activation de canaux K^+ voltage-dépendants.⁵⁴ En effet, cette repolarisation se distingue en deux composantes, une phase rapide (courant I_{Kr}) et une phase lente (courant I_{Ks}). Les canaux responsables de ces courants potassiques induisent une augmentation progressive et tardive d'ions K^+ dans le milieu extracellulaire.¹²⁷

Les canaux du courant I_{Kr} (canaux HERG pour « Human ether-a-go-go related » ou $K_v11.1$) sont codés par les gènes ERG1 à 3 et sont des tétramères constitués de 6 segments transmembranaires.¹²⁸ Leur

nom provient de leur similitude avec le gène ether-a-go-go (EAG) présent chez la drosophile *drosophila melanogaster*.¹²⁹⁻¹³¹ Ces canaux sont activés lors de la phase rapide de la repolarisation du PA sinusal et possède une cinétique d'inactivation rapide.¹³² Les canaux du courant I_{Kr} sont activés à des potentiels plus négatifs (-50 mV) que les canaux du courant I_{Ks} (-40 mV).^{130,131,133,134} Les canaux du courant I_{Ks} (canaux KvLQT1 ou K_v 7.1) possèdent la même structure que les canaux HERG. Ils s'activent après les canaux du courant I_{Kr} et possède une cinétique d'inactivation lente voire absente lorsque le canal est associé à une sous-unité régulatrice MinK.^{134,135}

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents de ces courants et notamment du courant I_{Kr} dans l'automatisme du NSA, des cellules isolées porcines ou murines ont été incubées avec E-4031 un composé expérimental classée comme antiarythmique de classe III, inhibiteur des canaux potassiques du courant I_{Kr} et un inhibiteur sélectif des canaux du courant I_{Ks} (Chromanol 293B). Cependant, une différence inter-espèces a été observé sur différents modèles. En effet, l'inhibiteur sélectif du courant I_{Kr} n'a pas d'effet sur le courant I_K chez le cochon mais ralentit la vitesse de dépolarisation spontanée diastolique des cellules isolées sinusales chez le lapin, la souris et le cochon d'Inde ralentissant ainsi la fréquence des PA et l'automatisme des cellules.¹³⁶⁻¹³⁹ Ces résultats suggèrent alors une prédominance d'activité des canaux du courant I_{Kr} dans l'automatisme cardiaque à l'exception du modèle porcin qui présenterait une prédominance du courant I_{Ks} . Les canaux potassiques voltage-dépendants contribuent ainsi au potentiel diastolique minimum du PA sinusal et favorisent l'hyperpolarisation membranaire des cellules sinusales permettant l'activation du courant I_f dans l'horloge membranaire.

Les canaux du courant I_{to} (« Transients outward »), codés par la famille de gènes K_v1 et K_v4 , sont caractérisés par une activation et une inactivation rapide ainsi qu'une sensibilité à la 4-aminopyridine.^{140,141} A ce jour, leur contribution dans l'automaticité du NSA et de sa conduction reste mal connue et peu documentés.

Concernant le courant rectifiant entrant I_{K1} , il participe au maintien du potentiel de repos dans les cardiomyocytes ventriculaires et est peu présent dans les cellules sinusales murines et humaines voire absent chez le cochon d'Inde, le lapin et le cochon.¹⁴²⁻¹⁴⁴ En effet, le potentiel de membrane des cellules sinusales n'atteint pas de potentiel de membrane de repos stable dû à l'absence de courant I_{K1} .⁶²

II.4 Canaux pouvant être impliqués dans la régulation de l'automatisme

II.4.1 Autres canaux potassiques

D'autres canaux potassiques ont été décrits comme potentiels régulateurs de l'activité du NSA notamment les courants activés par l'acétylcholine (I_{KACH})¹⁴⁵⁻¹⁴⁷, les courants potassiques activés par le Ca^{2+} (I_{KCa})^{54,148,149} et les courants dépendant de l'ATP (I_{KATP})^{150,151}

Courant K^+ activé par l'acétylcholine (I_{KACH})

L'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur du système nerveux parasympathique, ralentit l'activité du NSA par régulation négative des taux en AMPc et par conséquence de l'activité des canaux du courant I_f . L'acétylcholine se lie aux récepteurs muscariniques M2 couplés à la protéine G (RCPG) inhibitrice (G_i). Cette protéine G_i est constituée de 3 sous-unités : α_i , β et γ . L'activation de cette protéine G_i dissocie la sous-unité α_i du complexe $\beta\gamma$. La sous-unité α_i inhibe l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'ATP en AMPc tandis que le complexe $\beta\gamma$ active les canaux K^+ du courant I_{KACH} responsable d'une repolarisation membranaire par efflux d'ions K^+ .^{152,153} De plus, des concentrations en acétylcholine de l'ordre du nanomolaire inhiberaient efficacement le courant I_f dans le NSA.¹⁴⁵ En plus de leur rôle sur les canaux HCN via la réduction des niveaux d'AMPc, il existe des canaux potassiques activés par l'acétylcholine (Kir3.1 à Kir3.4 ou GIRK1 à GIRK4) responsables du courant I_{KACH} et identifiés dans le NSA et le NAV.^{146,147,154} Par ailleurs, l'inhibition de ce courant I_{KACH} réduit significativement les épisodes de dysfonction sinusale des modèles murins déficients en Cav1.3 suggérant ainsi les canaux I_{KACH} comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement du « sick-sinus syndrome ».¹⁵⁵

Courant K^+ activés par le Ca^{2+} cytosolique (I_{KCa})

Les canaux K^+ sensibles au Ca^{2+} cytosolique contribuent également à l'automaticité des cellules sinusales. Ils sont catégorisés en 3 sous familles selon leur conductance ; de faible conductance (canaux SK), de conductance intermédiaire (IK) et de forte conductance (BK).¹⁵⁶

Les canaux SK sont exprimés dans les oreillettes et les ventricules chez l'humain et la souris, et sont exprimés sous 3 isoformes SK1, SK2 et SK3 codant respectivement pour les canaux K_{Ca} 2.1, K_{Ca} 2.2 et K_{Ca} 2.3.^{157,158} Ces canaux participent à la repolarisation du PA des cellules atriales. De plus, des modèles n'exprimant pas les canaux SK2 ont présenté des épisodes de fibrillation atriale in vivo et un prolongement de la durée du PA des cellules atriales.^{159,160} Ces 3 isoformes sont notamment exprimées dans le NSA chez la souris.¹⁶¹ L'inhibition des canaux SK par de l'apamine, un inhibiteur de ces canaux potassiques, sur des cellules sinusales isolées de souris WT a démontré une prolongation du PA sinusal

et un ralentissement de la fréquence de dépolarisation de ces cellules.¹⁶¹ L'inhibition par l'apamine ralentit également l'activité spontanée du NSA isolé, suggérant ainsi la contribution des canaux SK dans la régulation de l'activité du NSA.¹⁶¹

Les canaux BK, appelés les canaux $K_{Ca1.1}$ codés par le gène *Kcnma* sont également exprimés dans le NSA. Ces canaux, en plus d'être sensibles au Ca^{2+} , sont mécano-sensibles et activés par étirement de la paroi de l'oreillette droite et du NSA entraînant une accélération de la fréquence cardiaque.¹⁶² Une étude suggère que l'activation des canaux BK par le Ca^{2+} cytosolique serait notamment facilitée par la colocalisation des canaux $K_{Ca1.1}$ avec les canaux $Ca_v1.3$ et les RyR2. En effet, la libération locale de Ca^{2+} par ces canaux calciques active les canaux $K_{Ca1.1}$ et contribuent à l'hyperpolarisation membranaire nécessaire à l'activation du courant I_f .¹⁶³ En effet, l'inhibition pharmacologique des canaux BK a démontré une diminution de l'automatisme des cellules sinusales de rat suggérant leur rôle dans la génération du PA sinusal.¹⁶⁴ Une prolongation de la DD du PA a été observée sur des cellules sinusales des modèles murins déficients en $K_{Ca1.1}$.¹⁶²

Courant K^+ sensible à la concentration en ATP (I_{KATP})

Le courant I_{KATP} est un courant potassique sortant qui est activé lorsque la concentration intracellulaire d'ATP diminue.¹⁶⁵ Ces canaux appartiennent à la famille des canaux potassiques rectifiant (Kir) et sont des octamères formés de 4 sous-unités qui forment le pore du canal (notamment les canaux Kir6.1 et Kir6.2) et de 4 sous unités régulatrices (notamment SUR1, SUR2A, SUR2B).^{166,167}

Le courant I_{KATP} a notamment été identifié dans les cellules sinusales de lapin et de souris.^{150,151,168} Afin d'étudier le rôle de ces canaux dans le NSA, des agents pharmacologiques sont utilisés afin d'activer (Pinacidil) ou inhiber (Glibenclamide) ces canaux.^{169,170} L'activation de ces canaux par le Pinacidil conduit à un ralentissement significatif de la fréquence de dépolarisation des cellules sinusales et une hyperpolarisation membranaire lors du retour au potentiel diastolique maximum tandis que l'inhibition par le Glibenclamide restaure le rythme physiologique de ces cellules.¹⁵⁰ Une étude sur l'effet de l'hypoxie dans le NSA dans un modèle murin déficient en canaux Kir6.2 du courant I_{KATP} a démontré que l'activation de ces canaux lors de l'hypoxie contribuerait à la régulation de l'automatisme du NSA.¹⁷¹ De plus, un modèle murin déficient en Kir6.1 a présenté des épisodes de bradycardie sinusale et de pauses sinusales in vivo ainsi qu'un ralentissement de la fréquence de dépolarisation et d'une prolongation du PA des cellules sinusales isolées. Ces résultats suggèrent alors le rôle du courant I_{KATP} dans l'automatisme des cellules du NSA.¹⁵¹ Cependant, leur contribution dans sa régulation reste très peu documentée dans la littérature.

II.4.2 Les canaux sodiques voltage-dépendants

Les canaux sodiques voltage-dépendants ont été notamment suggérés comme potentiels régulateurs de l'activité du NSA notamment les canaux du courant I_{Na} et les canaux du courant sodique soutenue I_{st} .

Canaux sodiques responsables du courant I_{Na}

Ces canaux sodiques voltage-dépendants s'activent à -70 mV et appartiennent également à la superfamille des canaux à 6 segments transmembranaires. Ils sont constitués d'une sous-unité α qui forme le pore du canal et de sous-unités β auxiliaires.^{172,173} Chez les mammifères, il existe 9 isoformes de ces canaux ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$).^{174,175} Ces isoformes sont distinguées en deux catégories selon leur sensibilité à la TTX, un inhibiteur des canaux sodiques ; les isoformes sensibles à la TTX ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$) inhibées par des concentrations de TTX de l'ordre du nanomolaire et les isoformes résistants à la TTX ($Na_v1.5$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$) inhibées par des concentrations de l'ordre du micromolaire.^{176,177} Ces isoformes sont pour la majorité exprimés dans le système nerveux à l'exception des canaux $Na_v1.4$ qui sont exprimés dans le muscle squelettique et $Na_v1.5$ et $Na_v1.1$ qui sont exprimés dans le muscle cardiaque.^{177,178}

Les canaux $Na_v1.1$ et $Na_v1.5$ sont notamment exprimés dans le tissu sinusal. En effet, des mutations sur les canaux $Na_v1.5$ ont été identifiées chez des patients atteints de dysfonction sinusale ou « sick-sinus syndrome », maladie caractérisée par des épisodes de bradycardie sinusale, de bloc sinusal ou d'une incompetence chronotrope c'est-à-dire d'une incapacité du NSA à accélérer son automaticité pendant une activité physique.^{179,180} L'inhibition des canaux $Na_v1.1$ induit une diminution de la conduction du NSA avec des épisodes de dysfonction sinusale dans un modèle de rongeur, similaire au « sick-sinus syndrome » chez l'humain. Cependant, l'expression de ces canaux diffèrent au sein du NSA, notamment avec l'expression des canaux $Na_v1.1$ sur l'ensemble du NSA contrairement aux canaux $Na_v1.5$ uniquement en périphérie.^{10,176-178,181} Ainsi, il a été suggéré que ces canaux joueraient un rôle potentiel dans la conduction électrique.

Canaux sodiques responsables du courant I_{st}

Un autre type de courant sodique entrant soutenue ou « sustained » I_{st} a été observé dans des cellules sinusales de lapin, de cochon d'Inde, de souris et de rat.^{62,142,144,182} Ce courant s'active à -70 mV et est dit « soutenu » car ces canaux possèdent une cinétique d'inactivation très lente.¹⁸² Ce courant I_{st} permettant l'influx d'ions Na^+ et résistant à la TTX est significativement réduit en présence d'antagoniste des canaux calciques et dans des modèles déficients en $Ca_v1.3$ suggérant sa potentielle contribution dans l'automaticité du NSA. En effet, ce courant serait activé lors de la DD du PA sinusal à

des potentiels plus négatifs que les LTCC. ^{183,184} Cependant, les mécanismes sous-jacents de ce courant restent encore incertains et nécessitent une recherche plus approfondie.

II.4.3 Les canaux mécano-sensibles au sein du NSA

La fréquence de battement du NSA est également dépendante du degré d'étirement de ce tissu. ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ En effet, l'étude plus approfondie de ces mécanismes sous-jacents suggère l'implication de différents canaux mécano-sensibles, notamment les canaux TRP (« Transients Receptor Potential ») exprimés dans le NSA que nous décrivons succinctement dans cette partie.

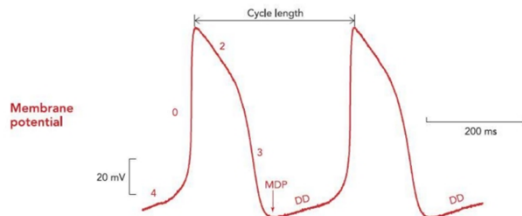
Les canaux TRP sont des canaux cationiques non sélectifs activés par le Ca^{2+} et sont impliqués dans l'homéostasie calcique. ¹⁸⁸ Ces canaux sont également constitués de six domaines transmembranaires dont les segments transmembranaires S5 et S6 forment un pore perméable aux cations. Plusieurs types de canaux TRP ont été identifiés dans le NSA et notamment les canaux TRPC (« Canonical ») et TRPM (« Melastatin »). ¹⁸⁹

Les canaux TRPC subdivisés en 7 isoformes (TRPC1-7) sont activés, soit par déplétion des réservoirs de Ca^{2+} intracellulaire par la voie « Store Operated Ca^{2+} entry » (SOCE) pour les isoformes TRPC1,4 et 5, soit en réponse à une voie de transduction impliquant la phospholipase C (PLC) et la production de diacylglycérol (DAG) à la suite d'une stimulation de divers récepteurs (muscariniques, etc.) pour les isoformes TRPC3, 6 et 7. ¹⁸⁹ L'isoforme TRPC2 n'est pas exprimée chez l'humain mais chez la souris. ¹⁹⁰ En effet, l'ouverture des canaux TRP est dépendante de seconds messagers intracellulaires et de l'activation d'une enzyme : la PLC. La liaison d'un agoniste sur un récepteur aux protéines G (RCPG) active, via les protéines G, la PLC. Cette enzyme hydrolyse un phospholipide membranaire, le phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP2) et produit du DAG et de l'inositol triphosphate (IP3). Le DAG active une protéine kinase C (PKC) qui module l'activité des TRPC, et l'IP3 se fixe sur les récepteurs IP3 et conduit à la libération du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique et à l'activation de la voie SOCE. ^{191,192} Dans le NSA, tous les isoformes des canaux TRPC ont été identifiés sauf l'isoforme TRPC5. ¹⁹³ L'étude de ces isoformes dans l'activité du NSA est peu documentée dans la littérature. Seul les canaux TRPC3 ont fait l'objet d'une étude démontrant qu'une déficience en TRPC3 réduit la survenue d'arythmies atriales induits par stimulation sur cœur perfusé isolé. ¹⁹⁴

Les canaux TRPM activés par la voie PLC/DAG existent également sous plusieurs isoformes dont TRPM4 et TRPM7 qui ont été identifiés dans le NSA et suggérés comme médiateurs de l'automaticité du NSA. ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ L'inhibition pharmacologique spécifique de TRPM4 (9-phenantrol) réduit l'automaticité des cellules atriales de modèles de rongeurs. ¹⁹⁸ Un modèle murin déficient en canaux TRPM7 a présenté des dysfonctions sinusales, un ralentissement de la pente de la DD ainsi qu'une réduction de

l'expression des canaux HCN4, suggérant que ces canaux réguleraient l'automatisme du NSA par régulation de l'expression des canaux HCN4. En effet, ces canaux sont perméables aux ions monovalents et divalents, notamment les ions Ca^{2+} , les ions Na^+ et K^+ .¹⁹⁹

Tableau 1- Tableau récapitulatif des mécanismes de l'automatisme du NSA et des canaux pouvant réguler cette automatisme



Canaux impliqués dans la génération du potentiel d'action (PA) sinusal		
Phases du PA sinusal	Types de canaux	Références
Dépolarisation diastolique (phase 4)	HCN4	53,61,68,75,78
	Ca^{2+} Voltage-dépendants (V-dep) type L ($Ca_v1.3$) et type T ($Ca_v3.1$)	54,55,61,87,93,96,102
	RyR2/NCX	56,57,59,60,61,98, 104 ,112, 114,120-123,161
Phase ascendante (phase 0)	Ca^{2+} V-dep type L ($Ca_v1.2$)	61,101,102,103
Repolarisation (phase 2 et 3)	K^+ V-dep HERG et K_v LQT1	54,135,136-139
Canaux pouvant réguler l'activité électrique du NSA		
Phases du PA sinusal	Types de canaux	Références
Dépolarisation diastolique (phase 4)	K^+ activés par l'Acétylcholine, GIRK (Kir 3.1- Kir3.4)	146, 153,154,155
	K^+ sensible à l'ATP (Kir6.1 et Kir6.2)	150,151, 171
	K^+ activés par le Ca^{2+} (SK et BK)	161-164
	TRP (TRPM7)	197,199
Phase ascendante (phase 0)		
Repolarisation (phase 2 et 3)	K^+ activés par le Ca^{2+} (SK)	161
	K^+ sensible à l'ATP (Kir6.1)	151

II.5 Horloge couplée

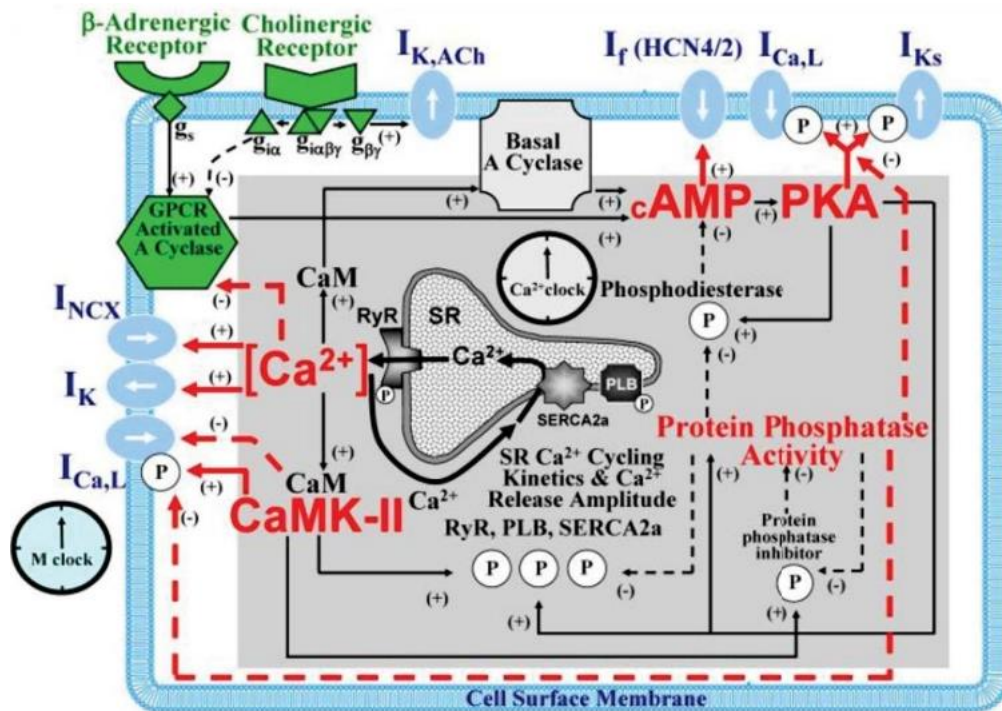


Figure 17- Représentation schématique du concept d'horloge couplée dans les cellules du NSA ; L'horloge membranaire est représentée par la zone périphérique bleue et l'horloge calcique par la zone centrale grise. Les acteurs communs de ces deux horloges sont représentés en rouge. (Lakatta et al., 2010)⁶³

Ce schéma (**Figure 17**) illustre la diversité des acteurs impliqués dans l'automatisme cardiaque et la régulation de l'automatisme du NSA par l'action simultanée de ces deux horloges ; membranaire et calcique. Ce concept d'horloges couplées résulte d'une modélisation numérique de l'activité pacemaker qui soutient que ces horloges sont interdépendantes.^{63,200} Ce couplage d'horloge suggère alors l'activation séquentielle des canaux ioniques lors de la DD et la libération spontanée de Ca²⁺ via le RyR2. De plus, l'inhibition de la protéine Kinase A et de la Calmoduline/Ca²⁺ dépendante Kinase II (PKA et CAMKII respectivement) a notamment démontré une altération de l'automatisme du NSA suggérant le rôle indirect de la phosphorylation des canaux impliqués dans la DD du PA sinusal.^{201,202} En effet, ces deux kinases phosphorylent à la fois les canaux impliqués dans l'horloge membranaire (LTCC, TTCC) et ceux impliqués dans l'horloge calcique (RyR2 et SERCA2A via phospholamban). L'activité des kinases (PKA et CaMKII) est notamment dépendante du Ca²⁺ intracellulaire. En effet, l'activation de la CAMKII est possible par le complexe Ca²⁺-calmoduline et l'activation de la PKA par des adénylates cyclases (AC) Ca²⁺ dépendantes (AC1 et AC8).^{203,204} L'activité de ces kinases est notamment régulée par les phosphodiesterases (PDE) qui dégradent l'AMPc et les protéines phosphatases qui déphosphorylent les canaux impliqués dans ces deux horloges.^{205,206}

Ces horloges sont également régulées par le système nerveux autonome, notamment par le système sympathique et parasympathique, régulant de cette façon le rythme cardiaque.

III. Régulation du rythme cardiaque

III.1 Régulation par le système nerveux autonome

La régulation du rythme cardiaque est majoritairement régie par le système nerveux autonome, notamment par la voie ortho-sympathique (ou tonus sympathique) responsable de l'accélération du rythme cardiaque et par la voie parasympathique (tonus vagal) responsable du ralentissement du rythme cardiaque.²⁰⁷ Cette régulation implique une relation étroite entre le système nerveux central et les ganglions intracardiaques qui forment le système nerveux intracardiaque (SNIC) ou « little brain ».²⁰⁸ Le SNIC est constitué de neurones efférents sympathiques et parasympathiques formant le plexus ganglionnaire qui se trouve principalement dans la région supraventriculaire .²⁰⁹ Ainsi, l'interaction entre le SNC et SNIC régule le système de conduction cardiaque notamment via l'innervation du NSA et du NAV. En effet, les neurones intracardiaques innervant le NSA expriment des enzymes tels que l'ACh transférase, la tyrosine hydroxylase et l'oxyde nitrique synthase responsable respectivement de la synthèse de l'ACh, de catécholamines et de l'oxyde nitrique. Les neurones exprimant ces enzymes sont nommés respectivement les neurones cholinergiques, adrénrgiques et nitrergiques.^{210,211} Le NSA est principalement innervé par les neurones adrénrgiques (tonus sympathique) et cholinergiques (tonus vagal).²¹² Récemment, l'étude approfondie de la cytoarchitecture du NSA par microscopie confocale 3D a permis une meilleure caractérisation du plexus neuronal de ce tissu en démontrant notamment l'hétérogénéité du NSA et la présence d'une nouvelle population de cellules gliales périphériques qui interagiraient avec les cellules sinusales du NSA (**Figure 18**). Ces résultats suggèrent alors que la complexité de structure et l'innervation du NSA s'apparenterait à celle du cerveau humain.²¹³

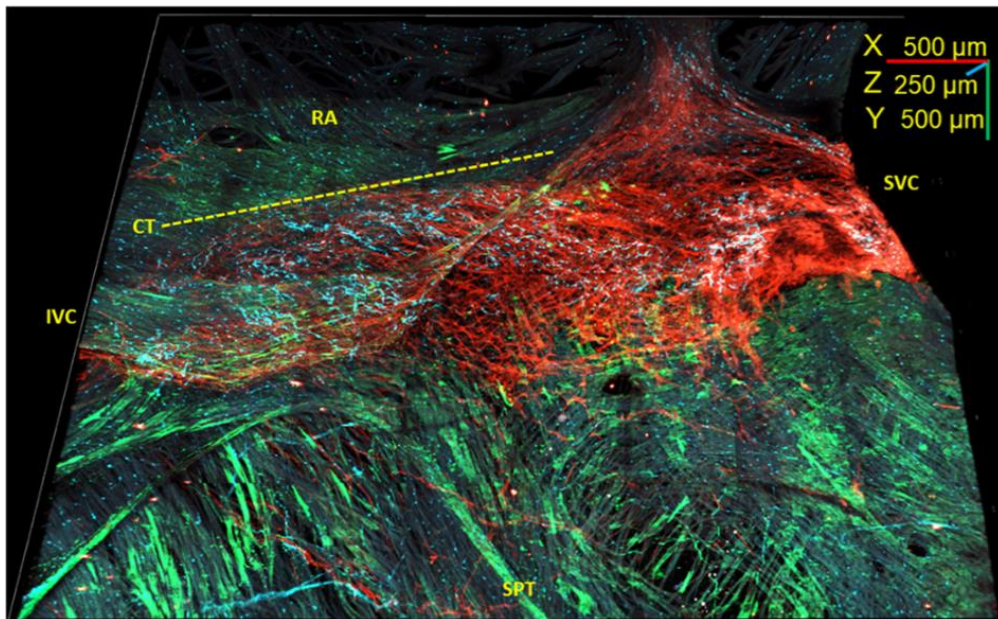


Figure 18- Reconstruction 3D d'un tissu sinusal immunomarké ; Le tissu sinusal est situé entre la veine cave supérieure (SVC), la veine cave inférieure (IVC), le septum (SPT) et l'oreillette droite (RA) bordé par la crista terminalis (CT). La nouvelle population de cellules est marquée au S100B⁺ (**cyan**)/GFAP⁻ (**vert**) au sein du réseau de cellules sinusales marquées au HCN4⁺ (rouge). La ligne en pointillés délimite la CT. (Bychkov et al., 2022)

Cependant, la distribution des neurones sympathiques et cholinergiques du NSA diffère selon les espèces et explique les différences de fréquence cardiaque entre celles-ci. Chez les mammifères, la fréquence cardiaque (FC) en battements par minute (bpm) est inversement proportionnelle à la taille. Les souris ont une prédominance du tonus sympathique (FC normal autour de 500-600 bpm) contre une prédominance parasympathique pour les humains (FC entre 60-100 bpm).^{9,54,214} En effet, la fréquence de battement du NSA isolé de souris est plus lente que la FC in vivo. Cette prédominance par ratio entre le tonus sympathique et parasympathique peut être cependant modulée selon l'adaptation cardiovasculaire de l'individu. En effet, les athlètes de haut niveau présentent une augmentation de leur tonus parasympathique et ainsi une bradycardie au repos potentiellement liée à une diminution de l'expression des canaux HCN4.^{215,216}

III.1.1 Régulation par le système sympathique

Réponse combat ou fuite (ou Fight or flight)

La régulation du rythme cardiaque est un phénomène physiologique essentiel à la survie et notamment face à un stress ou à un danger. Décrit pour la première fois par Walter Cannon, la réponse « combat ou fuite » (« Fight or flight response ») est due à l'activation du système sympathique par la libération de catécholamines (noradrénaline et adrénaline). Cette réponse qui pousse l'individu à soit combattre soit fuir le danger est initiée par l'activation des amygdales dans le cerveau, centre de traitement de la

peur, qui stimulent l'hypothalamus et la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans le sang. C'est au niveau des glandes surrénales que cette hormone stimule à son tour la sécrétion d'adrénaline, initiant ainsi la réponse adaptative au stress.²¹⁷ Cette réponse conduit à des modifications des fonctions physiologiques tels que la dilatation des pupilles, la tension des muscles et notamment l'accélération de la FC (effet chronotrope positif). En plus de cette réponse chronotrope positive, cette réponse sympathique ou adrénergique conduit à une augmentation de la force de contraction myocardique (inotrope positif), de l'excitabilité des cardiomyocytes (bathmotrope positif) et de la vitesse de conduction de l'activité électrique cardiaque (dromotrope positif).

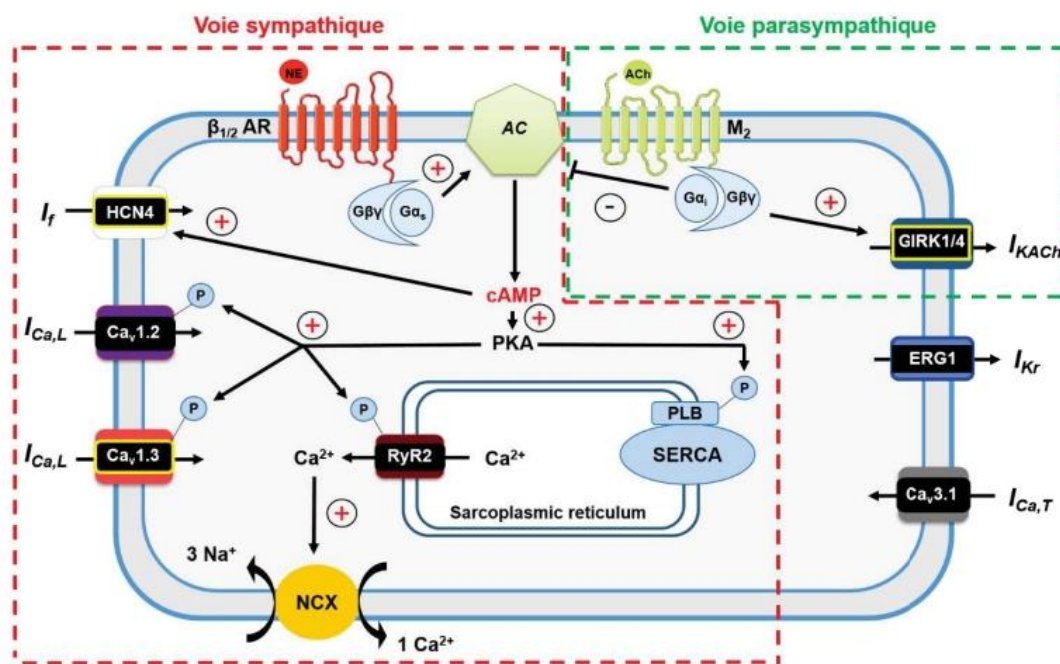


Figure 19- Représentation schématique de la régulation sympathique et parasympathique au sein des cellules sinusales. L'activation des récepteurs β -adrénergiques par les catécholamines active la voie AMPc-PKA (voie sympathique en pointillés rouge) ; activation des canaux HCN4 du courant I_f et phosphorylation PKA dépendante des acteurs de l'horloge membranaire (LTCC $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$) et l'horloge calcique (RyR2, PLB). L'activation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine diminue les taux d'AMPc et active le courant $I_{K_{ACh}}$ repolarisant (voie parasympathique en pointillés verts). (Schéma issue de la thèse de J.Louradour, 2022, « Rôle des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ dans le contrôle de la fréquence cardiaque par les catécholamines » et adapté de Mangoni et Nargeot, 2008)

La réponse adrénergique ou β -adrénergique est la conséquence de l'activation des récepteurs β -adrénergiques (β -AR) par les catécholamines. (Figure 19). Il existe plusieurs types de β -AR exprimés dans le cœur (β_1 -AR, β_2 -AR et β_3 -AR).²¹⁸⁻²²⁰ L'absence de réponse chronotrope et inotrope positive induite par une stimulation sympathique dans un modèle murin déficient en β_1 -AR suggère alors la prédominance de cet isoforme dans la réponse sympathique.²²¹ Les β_1 -AR sont constitués de 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G stimulatrice (Gs) composée de 3 sous-unités (α , β et γ). La fixation de catécholamines sur ces récepteurs active la protéine stimulatrice Gs et l'échange de guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP), dissociant la sous-unité

α s du complexe qui active l'adénylate cyclase (AC). L'AC transforme alors l'ATP en AMPc, messenger secondaire de la réponse β -adrénergique et effecteur de la réponse chronotrope positive via l'activation direct des canaux HCN4 sur leur site de liaison CNBD.^{77,222,223} En effet, de faibles doses d'isoprénaline induisent un décalage de la courbe d'activation de ces canaux vers des potentiels plus positifs et une accélération de la cinétique d'activation du courant I_f , responsable d'une élévation de la fréquence de dépolarisation spontanée des cellules sinusales et donc d'une accélération du rythme cardiaque

L'augmentation des taux d'AMPc intracellulaire lors de la stimulation β -adrénergique est due à l'activité des AC. Chez les mammifères, les AC existent sous 9 isoformes et sont notamment exprimés dans le cœur. Les isoformes AC5 et AC6 sont prédominants dans les ventricules et activés par stimulation β -adrénergique tandis que les isoformes AC1 et AC8 sont exprimés dans le NSA et dépendants des concentrations en Ca^{2+} .^{203,224–226} Une dysfonction sinusale et une réduction de la FC intrinsèque ont été observées sur un modèle murin déficient en AC1 mais aucune altération du rythme cardiaque n'a été identifiée sur un modèle déficient en AC8 démontrant la contribution de l'AC1 dans l'automatisme cardiaque. Cependant, une surexpression en AC8 induit une altération du rythme cardiaque en condition basale.²²⁷ Lors de cette réponse β -adrénergique, les canaux de l'horloge membranaire ($Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$) et de l'horloge calcique (RyR2, PLB) sont sujet à une phosphorylation. Cette phosphorylation est détaillée dans la partie V. Cette phosphorylation est régulée par des phosphatases et les taux en AMPc qui module l'activité des canaux HCN4 sont régulés par les phosphodiésterases (PDE).

Déphosphorylation et régulation par les phosphodiésterases (PDE) et les phosphatases

La dégradation des nucléotides cycliques notamment l'AMPc est possible grâce à l'action de phosphodiésterases (PDE). La structure de ces enzymes est constituée d'un domaine régulateur et d'un domaine catalytique permettant l'hydrolyse de la liaison phosphodiester formant l'AMPc.^{228,229} Les PDE existent sous plusieurs isoformes toutes exprimées dans le cœur et sont subdivisés en 11 familles (PDE1 à PDE11) selon leurs propriétés physico-chimiques et leur affinité pour les nucléotides cycliques.²³⁰ Parmi ces isoformes, seulement 5 ont été reportés dans le NSA (PDE1 à PDE5).

L'inhibition sélective des PDE3 et PDE4 par de la cilostamide et du rolipram respectivement, a démontré une élévation de l'activité automatique des cellules sinusales de lapin avec notamment une augmentation de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ de 60%.²⁰⁵ L'activité des PDE3 sur l'automatisme est notamment majoritaire dans le NSA car l'inhibition sélective de PDE3 par la milrinone accélère l'activité automatique des cellules de 47%.²³¹ De plus, l'inhibition simultanée des PDE3 et PDE4 induit une augmentation de l'activité du NSA associée à une élévation importante de l'activité des RyR2 et des

canaux LTCC.^{205,232} De plus, la PDE4 régule les niveaux d'AMPc en condition basal et β -adrénergique et participe à la réponse inotrope positive cardiaque.²³³ En effet, l'inhibition des PDE4 induit une augmentation des transitoires calciques lors d'une stimulation β -adrénergique et une élévation des taux de phosphorylation des protéines clés du CEC notamment RyR2 et Cav1.2.²³⁴ Une déficience en PDE4D dans des modèles génétiquement modifiés augmente la probabilité d'ouverture des RyR2 favorisant ainsi la libération accrue de Ca^{2+} lors de la réponse β -adrénergique et la survenue d'arythmies.²³⁵ L'inhibition des PDE1 par la nimodipine, un antagoniste calcique, a démontré une réduction de 40% de l'hydrolyse de l'AMPc suggérant également le rôle important des PDE1.²³⁶

Les phosphatases jouent également un rôle dans la régulation de cette réponse sympathique. En effet, ce sont des enzymes constituées de sous-unités catalytiques et régulatrices et sont capables de déphosphoryler les résidus sérines/thréonines des protéines impliquées dans la réponse β -adrénergique. Ils existent sous plusieurs isoformes, notamment les PP1, les PP2A et les PP2B (calcineurine) et sont toutes exprimées dans le cœur.²³⁷ L'inhibition de l'activité des PP2A induit une augmentation de l'activité des canaux LTCC en condition basale et adrénergique suggérant le rôle important des PP2A dans la régulation du courant $I_{Ca,L}$.²³⁸ La déphosphorylation du RyR2 est régulée par les PP1 et PP2A.^{239,240} La régulation de la recapture de Ca^{2+} vers le RS par SERCA2A est possible via la déphosphorylation des résidus sérine 16 (PKA) et thréonine 17 (CAMKII) du phospholamban.²⁴¹

Différences de la réponse sympathique liées au sexe

Les femmes ont moins de risque de développer des maladies cardiovasculaires que les hommes.^{242,243} Cette différence a alors incité les chercheurs à mieux comprendre les différences physiologiques entre mâles et femelles et ainsi étudier les mécanismes sous-jacents. Cette cardioprotection a notamment été démontré sur des modèles expérimentaux et a mis en évidence que la réponse β -adrénergique pouvait différer selon le sexe. En effet, les modèles femelles présentent une réponse β -adrénergique moindre que les mâles, associé à une susceptibilité moindre de développer des arythmies.²⁴⁴ Les taux en AMPc chez les femelles sont moins importants que les mâles et cette différence pouvait être liée en partie à l'expression plus importante des PDE chez les femelles. Cette étude suggère alors qu'une activité plus importante des PDE serait responsable de la différence de réponse β -adrénergique.²⁴⁵ De plus, des rats femelles ayant subi une ovariectomie ont montré des taux en PKA plus important que les rats femelles contrôles suggérant que les œstrogènes modulent la production de l'AMPc.^{246,247} Les taux en AMPc chez les femelles sont notamment hétérogènes au sein du tissu cardiaque et dépendrait des régions cardiaques.²⁴⁸ Les taux élevés d'AMPc chez les mâles seraient dûe à un taux important de testostérone qui inhibe l'activité des PDE.²⁴⁹ Cependant, l'implication des hormones sexuelles sur les différences mâles-femelles dans la fonction cardiaque est encore peu documentée. Néanmoins, une

différence liée au sexe a été observée sur la dynamique calcique des cardiomyocytes ventriculaires. En effet, l'amplitude des transitoires calciques des femelles est plus petite que celles des mâles induisant une contraction des sarcomères moindre mais sans altération du courant $I_{Ca,L}$.²⁵⁰ Les cardiomyocytes de souris femelles présentent une organisation différente des clusters de RyR2 sans altération de l'organisation des tubules T. Ces clusters seraient moins nombreux mais plus larges que ceux des mâles et expliqueraient une fréquence de Ca^{2+} sparks plus importante chez les femelles.²⁵¹ Ces études suggèrent alors que le rythme cardiaque pourrait différer selon le sexe mais les différences mâles-femelles dans le NSA sont encore très peu documentées.

III.1.2 Régulation par le système parasympathique

La régulation du rythme cardiaque implique également un système parasympathique qui permet de maintenir une FC physiologique dit sinusal (70-80 bpm chez l'humain) et contrebalancer les effets des catécholamines. Cette régulation fait suite à l'activation des récepteurs muscariniques par fixation de l'acétylcholine (**Figure 19**). En effet, l'acétylcholine, agoniste cholinergique, induit un effet chronotrope négatif in vivo et ainsi un ralentissement de l'activité automatique des cellules isolées du NSA.^{145,252}

Les récepteurs muscariniques existent sous 5 formes mais seul le récepteur muscarinique de type 2 (M2) est exprimé dans les cellules sinusales. Les récepteurs M2 sont constitués de 7 domaines transmembranaires et sont couplés à une protéine G inhibitrice G_i qui, une fois activée, inhibe l'AC induisant une diminution des taux en AMPc intracellulaire.²⁵³ Cette libération d'acétylcholine active alors les canaux du courant $I_{K_{ACH}}$ responsable d'une repolarisation membranaire. Des concentrations d'acétylcholine de l'ordre du nanomolaire peuvent inhiber le courant I_f .^{252,254,255} La diminution des taux d'AMPc par inhibition de l'AC potentialise l'inhibition du courant I_f et réduit les voies de phosphorylation des protéines impliquées dans l'automatisme cardiaque et ainsi la dynamique calcique. En effet, une concentration d'acétylcholine de l'ordre du micromolaire induit une réduction du courant $I_{Ca,L}$ démontrant que le courant $I_{Ca,L}$ serait régulé par les taux en AMPc.²⁵⁶ De plus, l'acétylcholine conduit à une diminution de l'amplitude et de la fréquence des LCR ainsi qu'une diminution de la recapture du Ca^{2+} par SERCA2A mettant en évidence la régulation parasympathique des RyR2 et de SERCA2A dans l'automatisme cardiaque.²⁵⁷

III.2 Régulation par le système hormonal

Le rythme cardiaque est majoritairement régulé par le système nerveux autonome. Cependant, d'autres acteurs tels que les hormones ou les peptides natriurétiques peuvent influencer ce rythme en conditions physiopathologiques.

Les peptides natriurétiques participent notamment à l'automatisme. En effet, il existe 3 types de peptides chez l'humain ; les peptides natriurétiques atriaux (ANP), natriurétiques cérébraux (BNP) et les type C (CNP). Ces peptides se fixent à leurs récepteurs respectifs NPR-A, NPR-B et NPR-C et sont tous exprimés dans le NSA. Les récepteurs NPR-A et NPR-B sont associés à une guanylate cyclase (GC) qui entraîne l'échange de GTP en GMPc et active la cascade de ce nucléotide cyclique. Le récepteur NPR-C n'est pas lié au GC et son activation induit l'inhibition de l'AC et une diminution des taux en AMPc.²⁵⁸ En mesurant les effets des BNP et CNP sur le NSA de souris, l'administration de ces peptides augmente la FC in vivo et l'activité automatique des cellules sinusales isolées. Cette accélération de l'activité cardiaque est due notamment à une augmentation du courant $I_{Ca,L}$ et du courant I_f .²⁵⁹ Un modèle murin déficient en NPR-B hétérozygote a également présenté une bradycardie sinusale et des pauses sinusales in vivo ainsi qu'une réduction de l'activité du NSA in vitro démontrant le rôle prédominant des NPR-B dans la fonction du NSA.²⁶⁰ De plus, l'expression de ces peptides est augmentée dans l'insuffisance cardiaque. Ainsi, ces peptides sont des marqueurs très utilisés dans le diagnostic de l'insuffisance cardiaque.²⁶¹ Cependant, le rôle des peptides natriurétiques sur la fonction pacemaker dans l'insuffisance cardiaque n'est pas connu à ce jour.

L'hormone thyroïdienne T3 exerce également une influence sur l'activité automatique du NSA. En effet, cette hormone induit une augmentation de la densité du courant I_f dans les cellules sinusales isolées de lapin et expliquerait ainsi l'augmentation de la FC chez les patients atteints d'une hyperthyroïdie.²⁶²

En étudiant les différences mâles-femelles sur la fonction cardiaque, les rats femelles ayant subi une ovariectomie ont montré des taux en PKA plus importants que les rats femelles contrôles suggérant que les œstrogènes modulent l'expression de l'AMPc.^{246,247} En effet, chez la femme enceinte, l'augmentation des sécrétions d'hormones sexuelles telles que les œstrogènes et la progestérone induit une augmentation de la FC.²⁶³ Cette augmentation de la FC est en partie due à l'augmentation du courant $I_{Ca,L}$ observé chez des souris gestantes avec notamment une augmentation de l'expression des canaux $Ca_v1.3$ et des RyR2 uniquement.²⁶⁴

En résumé, depuis la découverte du courant pacemaker dans les années 70 par Di Francesco, de nombreuses études ont mis en évidence la contribution de nombreux canaux ioniques dans l'automatisme cardiaque et notamment la complexité de leurs interactions. Cependant, leur contribution lors de la réponse β -adrénergique soulève encore de nombreuses questions. Il est notamment établi que le RyR2 est phosphorylé lors de cette réponse mais les effets de cette phosphorylation ainsi que le rôle des sites de phosphorylation impliqués restent encore mal compris.

IV. Récepteur à la ryanodine (RyR2)

IV.1 Fonction du RyR

D'abord très étudié sur les muscles squelettiques avant son étude dans le muscle cardiaque, les RyR, permettant la libération de Ca^{2+} du RS vers le cytosol, doivent leur nom à un alcaloïde végétal, la ryanodine, qui se lie spécifiquement à ces récepteurs. La ryanodine, initialement isolée à partir de la plante *Ryania speciosa*, est couramment utilisée afin d'identifier et d'étudier les RyR en raison de sa capacité à moduler leur activité de façon dose-dépendante. A des faibles concentrations (nanomolaire), la ryanodine se lie aux RyR et stabilise le canal dans un état partiellement ouvert dit état de sous-conductance, tandis qu'à des concentrations plus élevées (micromolaire), la ryanodine inhibe les RyR et les maintient dans un état fermé.²⁶⁵⁻²⁶⁷ Cette modulation dose-dépendante de la ryanodine sur les RyR suggère alors la présence d'un site de haute affinité et un site de basse affinité de la ryanodine sur le RyR.²⁶⁸ L'utilisation de ryanodine tritiée par technique de « *Radioactive binding assay* » comme outil pour mesurer l'activité du RyR en présence de Ca^{2+} a permis de déterminer que le site de haute affinité (K_D 1-10 nM) de la ryanodine correspond à l'état ouvert du canal et que le site de faible affinité (K_D 1-10 μM) correspond à l'état fermé.²⁶⁹ La technique d'enregistrement monocanal par incorporation des canaux sur bicouche lipidique (Single channels recordings) a permis de démontrer que ces sites de liaison sont uniquement accessibles par sa face cytosolique et lorsque le canal est ouvert.²⁷⁰

D'autres outils pharmacologiques tels que la tétracaïne et les calcines ont permis de mieux caractériser la fonction de ce canal. La tétracaïne, un anesthésique local, inhibe l'activité du RyR en diminuant sa probabilité d'ouverture et en prolongeant l'état fermé du canal.^{271,272} En effet, l'inhibition du RyR2 par la tétracaïne sur des cardiomyocytes ventriculaires inhibe la contraction des cellules et diminue significativement la libération de Ca^{2+} diastolique via le RyR2 (Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves).^{273,274} Les propriétés inhibitrices de la tétracaïne ont notamment permis de développer des protocoles permettant de mesurer la fuite diastolique de Ca^{2+} via le RyR afin d'évaluer la charge calcique du RS en condition physiopathologique.^{275,276}

Les calcines, toxines extraites de venins de scorpion, sont des peptides modulateurs des RyR. Parmi ces calcines, les deux plus étudiés jusqu'à présent sont l'imperacalcine et la maurocalcine.^{277,278} Les calcines modulent le RyR de manière réversible avec une très grande affinité (valeur de K_d entre 0,3 nM et 376 nM) et spécificité. Elles augmentent la probabilité d'ouverture du RyR et induisent un état de sous-conductance du canal.^{278,279} Du fait de leur nature peptidique et de leur propriétés sur le RyR, les

calcines ont notamment été suggérés comme des outils potentiels permettant de cibler l'acheminement de drogues jusqu'au RyR dans le traitement des pathologies liées aux RyR1 et RyR2.²⁸⁰

La modulation du RyR par la caféine peut également être utilisée comme un indicateur indirect de son activité. En effet, la caféine augmente la sensibilité du canal au Ca^{2+} en augmentant la probabilité d'ouverture du RyR et maintient de façon réversible le canal dans un état ouvert à des concentrations diastoliques de Ca^{2+} . De ce fait, la caféine est utilisée comme un outil afin de vider le RS de son Ca^{2+} pour en estimer le contenu dans les cardiomyocytes.^{281,282} En effet, la libération de Ca^{2+} lors d'un transitoire calcique dépend notamment de la charge calcique du RS. Les libérations fractionnées de Ca^{2+} par le RyR (ou Fractional Ca^{2+} Release) peuvent être quantifiées par le rapport entre l'amplitude des transitoires calciques du RyR sur l'amplitude de la charge calcique du RS.^{283,284}

IV.2 Isoformes du RyR

Les RyR sont des canaux homotétramériques dont chaque tétramère est constitué approximativement de 5000 acides aminés (poids moléculaire de 560 kiloDalton) ce qui fait de ces récepteurs les plus gros canaux ioniques identifiés de nos jours (Total, approx. 2.2 MegaDalton).²⁸⁵⁻²⁸⁷ Chez les mammifères, les trois isoformes du RyR identifiés (RyR1, RyR2, RyR3) sont exprimés différemment selon les tissus. Les gènes codant pour ces isoformes sont respectivement situés sur les chromosomes 19q13.2 (104 exons), 1q43 (102 exons) et 15q13.3-14 (103 exons) chez l'humain et les chromosomes 7A3, 13A2 et 2E4 chez la souris.²⁸⁸

L'isoforme RyR1, première isoforme à avoir été clonée, est majoritairement exprimée dans le muscle squelettique mais également dans le muscle cardiaque, les muscles lisses et les neurones de Purkinje entre autres.^{289,290} L'isoforme RyR2 est la forme prédominante dans le muscle cardiaque mais il est également exprimé dans les neurones de Purkinje et le cortex cérébral (cerebellum) entre autres.^{291,292} L'isoforme RyR3 est notamment exprimé à de faibles taux dans le cerveau, les neurones de Purkinje et les muscles lisses.^{290,292} Ces isoformes partagent 65% de séquences identiques et sont constitués de trois domaines divergents ; D1 entre les résidus 4254-4631 pour le RyR1 et les résidus 4210-4562 pour le RyR2, D2 entre les résidus 1342-1403 pour le RyR1 et les résidus 1353-1397 pour RyR2, et D3 entre les résidus 1872-1923 pour le RyR1 et les résidus 1852-1890 pour le RyR2.²⁹³ Le domaine D1 constitue la région la plus large et la plus variable et le domaine D2 est absent de l'isoforme RyR3. De plus, ces domaines contribuent à l'interaction entre le RyR, le Ca^{2+} cytosolique et les protéines régulatrices de RyR. En effet, le domaine D2 de l'isoforme RyR1 participe à l'interaction entre le RyR et les canaux $\text{Ca}_v1.1$ notamment lors du CEC et des mutations de ce domaine altèrent la sensibilité du RyR1 au Ca^{2+}

et à la caféine.^{294,295} Le domaine D3 de ce récepteur contient notamment des sites d'inactivation du RyR Ca^{2+} -dépendants.²⁹⁶

L'expression du RyR ne se limite pas qu'aux mammifères puisqu'il a été également identifié chez les oiseaux, les amphibiens et les reptiles. Ces vertébrés expriment 3 isoformes de RyR (RyR α , RyR β et une forme cardiaque) qui s'apparenteraient respectivement à RyR1, RyR3 et RyR2 chez les mammifères.^{297,298}

IV.3 Structure, perméabilité aux ions et organisation du RyR2

Grâce à la cryomicroscopie électronique (cryo-EM), une meilleure visualisation et compréhension de la structure du RyR a pu être établie. Le RyR est décrit alors comme une structure en forme de champignon avec une large proéminence localisée dans la partie cytosolique et le « pied » dans la membrane du RS (partie luminale).²⁹⁹ Les trois isoformes du RyR présentent la même structure générale.³⁰⁰ Chaque tétramère est donc constitué d'une partie cytosolique (270x270x100 Angstrom (Å)) et d'une partie transmembranaire (120x120x60 Å) (**Figure 20**). Afin de faciliter sa description, les termes de « pinces » (clamp), de « poignées » (handle) et de pore central (central rim) sont utilisés. Les pinces sont reliées aux poignées qui entourent le pore central.²⁸⁷

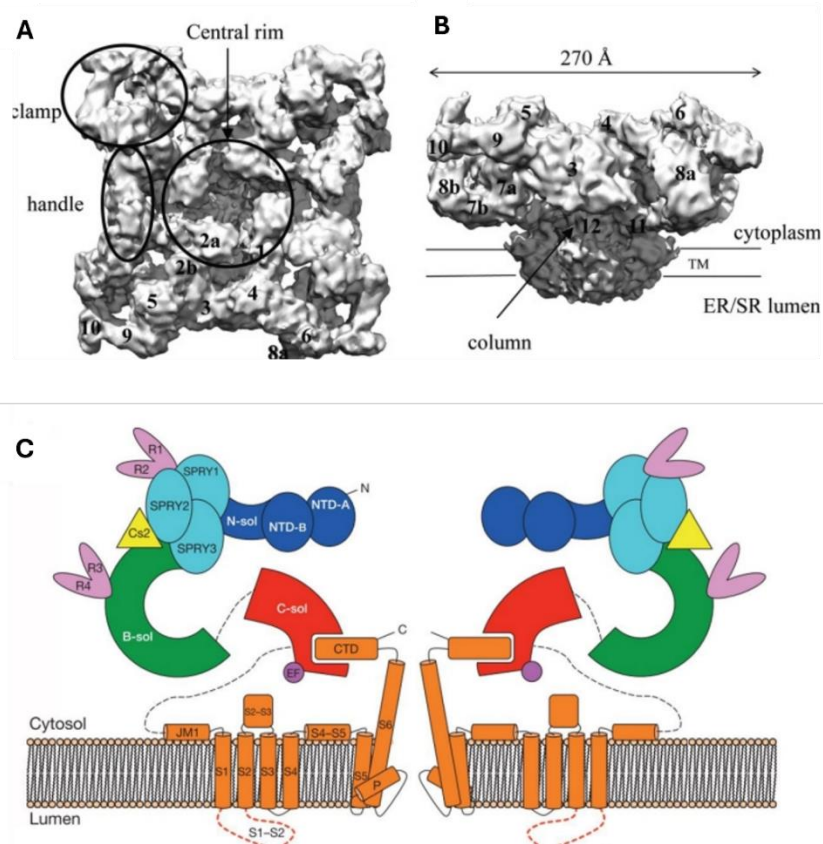


Figure 20-Structure du récepteur à la ryanodine (RyR) ; (A) Reconstruction par cryo-EM du RyR, vue cytosolique, **(B)** vue de profil (Van Petegem, 2012), **(C)** Structure générale du RYR avec sa partie N-terminale (NTD A et B) en bleu foncé, les domaines SPRY1 SPRY2 et SPRY3 en bleu clair, les pinces (R1, R2, R3, R4) en rose foncé, la castalbine

(Cs2) ou FKBP12.6 en jaune, le core solénoïde C-sol en rouge relié à la partie cytosolique par le pont solénoïde B-sol en vert, et à la partie transmembranaire par le domaine C-terminal (CTD) en orange. Domaines de liaison au Ca^{2+} en violet (EF). (Zalk et al.,2015)

Ce récepteur est constitué d'un domaine N-terminal (NTD) distinct en 3 domaines ; A (résidus 10-223), B (résidus 224-408) et C (résidus 409-544). Ce domaine N-terminal interagit avec le domaine central du RyR par mécanisme de « zipping ». Cette interaction stabilise l'état inactif (fermé) du RyR. En effet, l'altération de cette interaction conduit à des fuites de Ca^{2+} du RyR délétères dans l'insuffisance cardiaque qui serait notamment facilitée par la dissociation de FKBP12.6, une protéine stabilisatrice du RyR.³⁰¹ Ce modèle hypothétique a notamment été proposé comme mécanisme sous-jacent potentiel de la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique (CPVT), maladie génétique associée majoritairement à des mutations du RyR2 et caractérisée par des épisodes d'arythmies ventriculaires sévères pouvant causer une mort subite lors d'un stress émotionnel ou après un effort physique.^{302,303} En effet, des mutations localisées dans le domaine N-terminal du RyR sont responsables de maladies génétiques potentiellement mortelles tels la CPVT (RyR2) et l'hyperthermie maligne associée à une mutation du RyR1 dans le muscle squelettique caractérisée par une réaction sévère à certains anesthésiques.^{290,304-306}

Ce récepteur est également composé de domaines SPRY qui lient la FKBP12.6, du pont solénoïde (B-sol) qui contient les sites de phosphorylation PKA et CAMKII dépendants, du domaine central solénoïde (C-sol) avec des domaines de liaison au Ca^{2+} (EF), d'un domaine transmembranaire qui forme le pore du RyR et facilite la diffusion des ions Ca^{2+} et d'un domaine C-terminal (CTD) (**Figure 20**). Chacune de ces sous-unités est composée de 6 segments transmembranaires (S1-S6) dont les segments S5 et S6 forment le pore du canal. La région JM1 lié au segment S1 permet le maintien du récepteur dans une configuration plane à la surface cytosolique de la membrane sarcoplasmique. Ces RyR interagissent notamment via les domaines SPRY1 et sont organisés en groupe ou clusters.³⁰⁷ La proximité des RyR participent à leur organisation en unités de libération calcique ou Ca^{2+} Release Units (CRU).³⁰⁸ Ces clusters peuvent être visualisés par microscopie électronique à haute résolution et sont organisés selon plusieurs schémas ; côte-à-côte (side by side), échiquier (checkboard) et isolés (**Figure 21**).^{309,310}

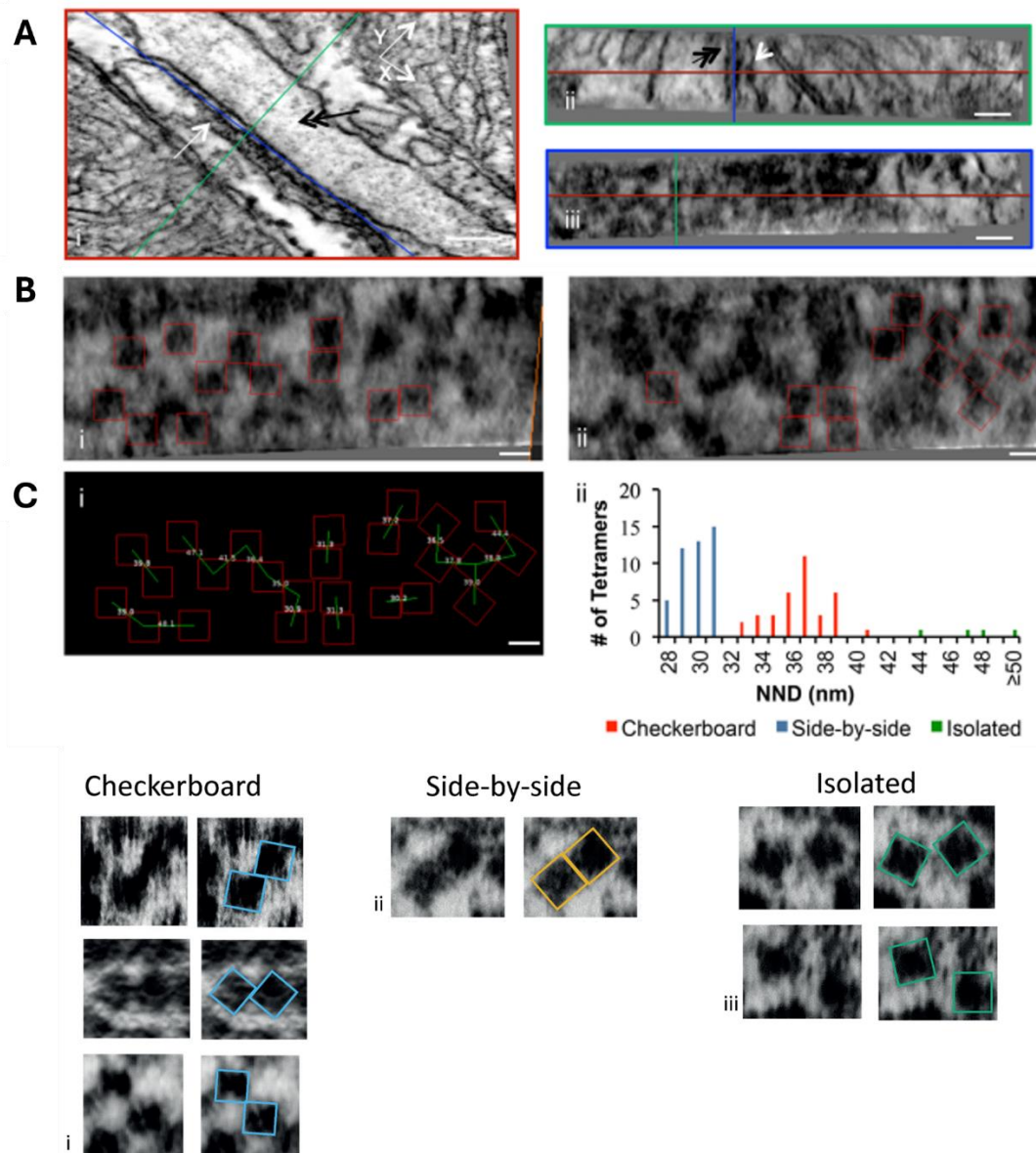


Figure 21-Arrangements des clusters de RyR2 en microscopie électronique haute résolution sur cardiomyocyte ventriculaire humain. (A) Vue orthogonale d'une dyade, (i)XY, (ii) YZ, (iii)XZ, épaisseur 1nm. Les doubles flèches indiquent les tubules T et les simples flèches le réticulum sarcoplasmique. Echelle 60 nm. (B) Position et orientation des tétramères du RyR2 (carré rouge), (C)(i) Visualisation des tétramères de RyR2 (carré rouge) et la distance entre deux RyR2 (ligne verte) exprimées en nm. (ii) Histogramme exprimant le nombre de tétramères identifiés et leurs arrangements N=5 patients, n=84 tétramères (organisés selon plusieurs schémas ; côte-à-côte (side by side), échiquier (checkboard) et isolés (isolated)). (Adapté de Ashgari et al., 2014 et Ashgari et al.,2024)

L'organisation et l'agencement de ces CRU est modulé selon l'état de la phosphorylation PKA et CaMKII-dépendante.³¹⁰⁻³¹² En effet, une dispersion de ces clusters a été observé lors d'une réponse β -adrénergique prolongée.³¹³ Cette dispersion serait d'autant plus importante dans des modèles pathologiques tels que l'insuffisance cardiaque et la fibrillation atriale par la fragmentation des clusters de RyR2 en plus petits groupes sans changement de leur nombre.^{314,315} L'altération de l'arrangement et l'organisation des clusters du RyR2 sont liées à une libération asynchrone de Ca^{2+} sparks pouvant favoriser la survenue d'arythmies.^{314,316} Ces libérations de Ca^{2+} sont possibles via le changement

conformationnel du domaine transmembranaire du RyR lors de l'ouverture et la fermeture du canal (**Figure 22**). Le segment S6 détermine l'état d'ouverture du canal par sa position.³¹⁷ Les segments S2 et S3 à proximité des sites de liaisons du Ca^{2+} (EF) sont impliqués dans ces changements conformationnels.

111

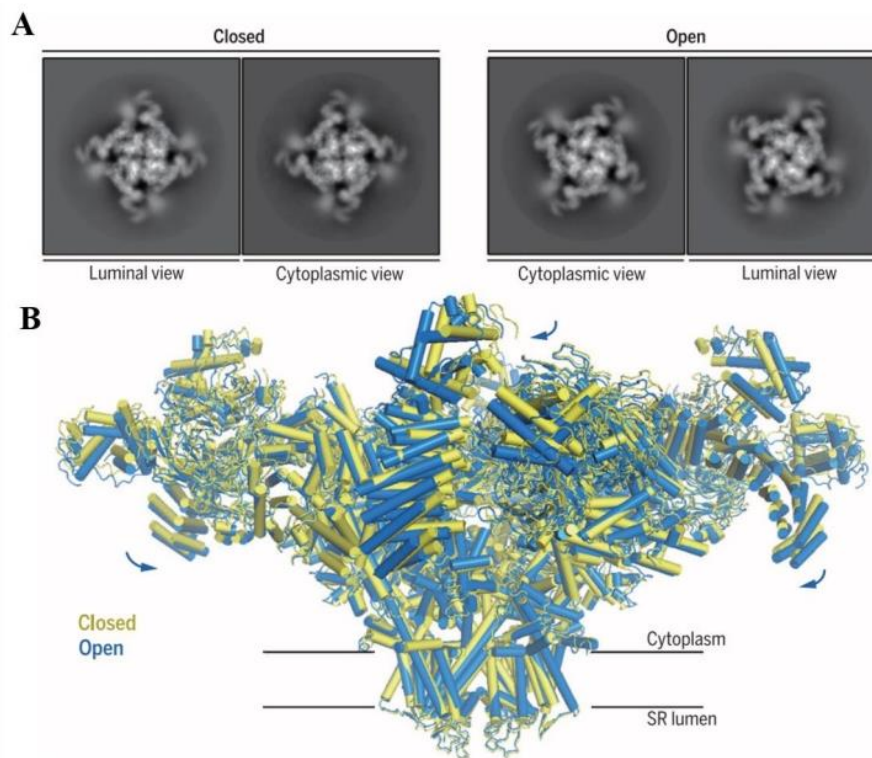


Figure 22-Structure du RyR2 en état ouvert et fermé ; (A) Modélisation 2D par cryo-EM de l'état fermé et ouvert du RyR d'un pont de vue cytosolique et luminale. **(B)** Superposition des structures du RyR2 en position ouvert (bleu) et fermé (jaune). La flèche bleue indique le déplacement de la partie cytosolique de son état fermé à son état ouvert. SR, réticulum sarcoplasmique (Peng et al., 2016)

Il a notamment été démontré que les changements conformationnels du RyR ne pouvaient se limiter à sa simple ouverture et fermeture mais que ce canal pouvait également s'ouvrir de manière partielle par l'existence d'un état conformationnel intermédiaire (« primed ») en présence de Ca^{2+} . Cet état intermédiaire évolue vers un état actif ou ouvert en présence d'ATP ou de caféine et vers un état fermé ou inactif en présence d'une forte concentration en ryanodine.³¹⁸ En effet, la seule présence de Ca^{2+} induit un état de sous-conductance du canal tandis que l'ajout d'ATP et de caféine augmente la probabilité d'ouverture du canal ainsi que sa durée moyenne d'ouverture (**Figure 23**).

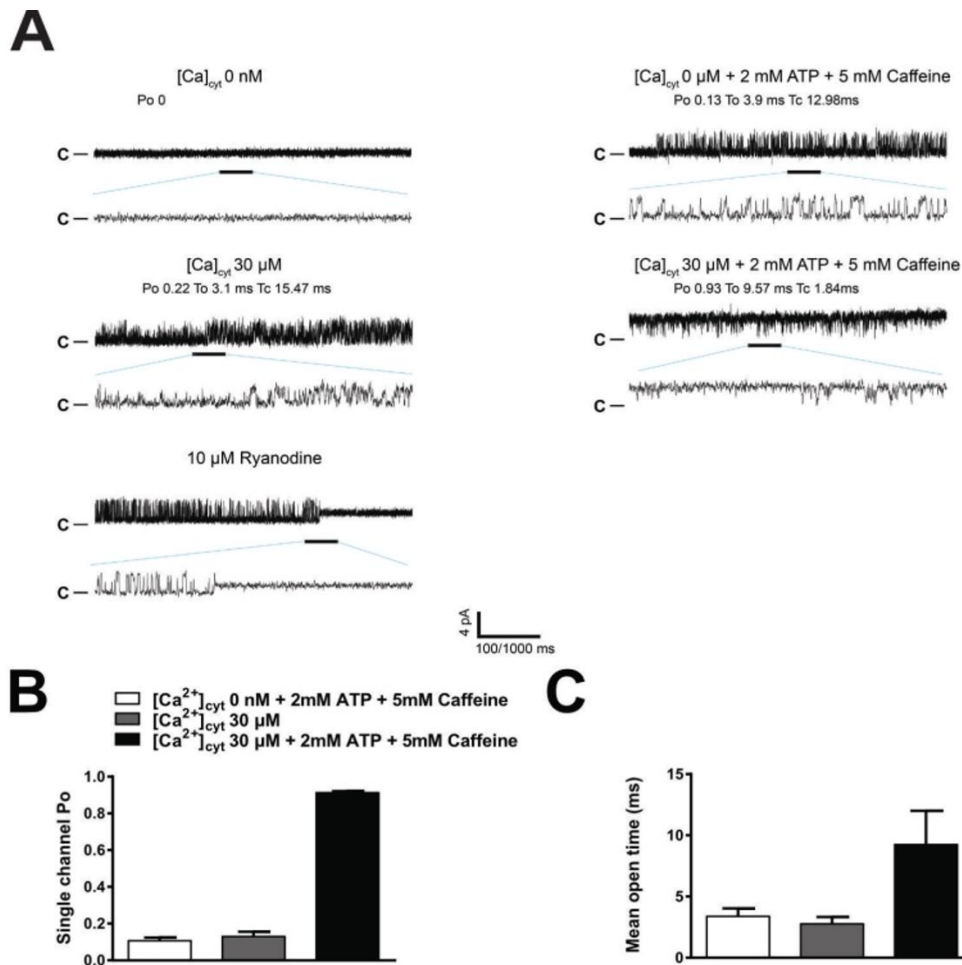


Figure 23- Figure illustrant les différents états de conductance de RyR1 par enregistrement monocanal par bicouche lipidique ; (A) Représentation des tracés d’enregistrement des RyR1 purifiés dans divers conditions cytosoliques (chambre cis) : sans Ca²⁺, avec 30 μM de Ca²⁺, avec 10 μM de ryanodine, avec 2mM ATP et 5 mM de caféine sans Ca²⁺ et avec 30 μM Ca²⁺, 2mM ATP et 5 mM caféine. L’état fermé du canal est identifié ici par la lettre C (closed). **(B)** Probabilité d’ouverture (Po) du canal en fonction des conditions cytosoliques. **(C)** Moyenne de la durée d’ouverture du canal (ms) en fonction des conditions cytosoliques. (Adapté de Des Georges et al.,2016)

La modélisation par cryo-EM de la structure du RyR n’a pas montré de différences majeures structurales entre les isoformes RyR1 et RyR2 mais a cependant permis de mieux comprendre les mécanismes de diffusion et de perméabilité des ions à travers ce canal.³¹⁷ En effet, la séquence primaire codant pour le pore du canal est très similaire entre les isoformes du RyR (90% de similitudes).³¹⁹ La boucle P entre les segments S5-S6 de la partie transmembranaire du canal est constitué d’une séquence d’acides aminés chargés négativement (GGGIGD) et impliqués dans la sélectivité et la perméabilité du canal aux cations monovalents et divalents.¹¹¹

La sélectivité et la perméabilité des RyR aux ions a été définie par la technique d’enregistrement monocanal par incorporation des canaux sur bicouche lipidique et est similaire entre les isoformes.^{320,321} Ces récepteurs, une fois ouverts, sont notamment perméables à divers cations monovalents (K⁺, Na⁺, etc.) et divalents (Ca²⁺, Mg²⁺, etc.).^{320,321} Cependant, les RyR ne libèrent que les

ions Ca^{2+} du SR vers le cytosol du fait de leur gradient de concentration élevée entre les compartiments cytosoliques ($[\text{Ca}^{2+}]_i$: 100 nM) et lumenales ($[\text{Ca}^{2+}]_l$: 1 mM).³²² En effet, les concentrations des ions K^+ (150 mM) et des ions Mg^{2+} (1 mM) entre les compartiments cytosoliques et lumenales par exemple sont similaires et ainsi ne permettent pas la libération de ces ions via les RyR par gradient électrochimique.³²³

IV.4 Pathologie associée aux mutations du RyR2, la CPVT

La CPVT est une maladie génétique héréditaire responsable de mort subite fréquemment identifiée chez les patients jeunes lors d'un stress physique ou émotionnel intense.³²⁴ Les patients atteints de cette maladie ne présentent pas d'anomalies morphologiques cardiaques ou de signes avant-coureurs. Les épisodes de syncopes font suite à des tachycardies ventriculaires pouvant évoluer vers des fibrillations ventriculaires causant la mort subite.³²⁴ C'est en 1960 que le cardiologue norvégien Knut Berg publie un article sur 3 sœurs victimes de syncopes pendant un exercice physique ou un stress émotionnel reconnu comme la manifestation de symptômes que l'on peut attribuer de nos jours à la CPVT. Il faudra attendre 1995 pour que les tachycardies ventriculaires bidirectionnelles ne soient associées à cette maladie aboutissant au terme médical actuel de « Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) » en anglais et « Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique (TVPC) » en français (**Figure 24**).^{325–327}

Les patients atteints de CPVT doivent respecter une hygiène de vie limitant les risques de développer des arythmies létales et se soumettre aux recommandations générales admises par la société européenne de cardiologie. Ces recommandations requièrent que les patients atteints de CPVT évitent toute compétition sportive, exercice physique extrême ou quelconque exposition à un environnement stressant pouvant conduire à une réponse β -adrénergique intense. En plus de cette hygiène de vie, des traitements sont prescrits à ces patients afin de limiter l'apparition des arythmies, notamment des β -bloquants en première intention, de la flécaïnide en deuxième intention voire un défibrillateur implantable.³²⁸ Ces traitements n'étant pas efficaces pour tous les patients, l'étude et la caractérisation de ces mutations a permis de mieux comprendre les mécanismes pathologiques de la CPVT afin d'adopter une meilleure démarche thérapeutique dans le futur.

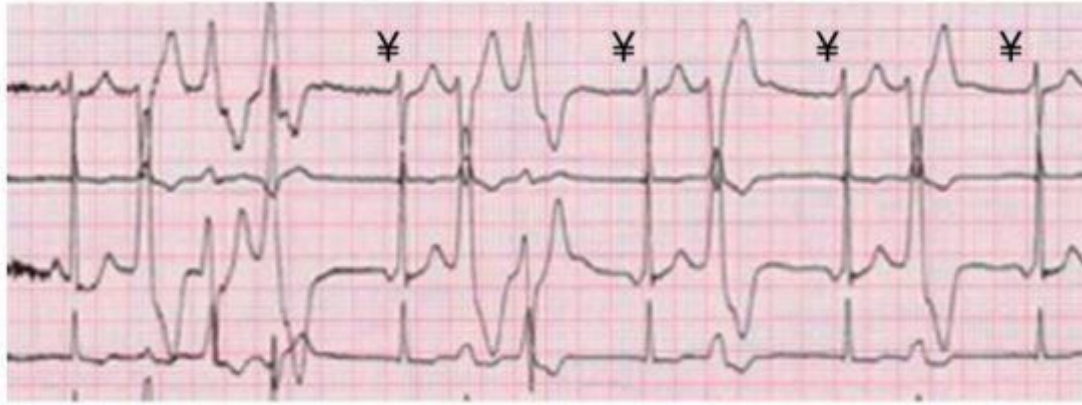


Figure 24- Exemple de tracé ECG d'un patient atteint de CPVT (RyR2 R420Q) ; Des arythmies tels que des contractions prématurées, des tachycardies bidirectionnelles polymorphes, des bigémisés et ectopies atriales sont présents chez ce patient (Domingo et al., 2015)³²⁹

La première mutation associée à la CPVT a été identifiée sur le chromosome 1q42-q43 et caractérisée comme un variant du RyR2.^{330,331} Ainsi, le diagnostic de cette mutation repose sur l'historique d'antécédents familiaux, un électrocardiogramme après effort physique et un test génétique.³³² En effet, 60% des cas identifiés de CPVT sont liés à une mutation du RyR2 mais d'autres gènes ont été identifiés notamment la calsequestrine 2 et la CaM entre autres responsable respectivement des formes CPVT2 et CPVT4 (**Figure 25**).^{333,334} Ces protéines sont détaillées dans la section suivante.

Type	MIM*	Gene	Protein	Genetic Locus	Frequency	Inheritance
CPVT 1	604772	<i>RYR2</i>	Ryanodine receptor 2	1q42.1-q43	50%–60%	AD
CPVT 2	611938	<i>CASQ2</i>	Calsequestrin 2	1p13.1	Rare	AR
CPVT 3	614021	<i>TECRL</i>	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	7p22-p14	Rare	AR
CPVT 4	614916	<i>CALM1</i>	Calmodulin 1	14q31-q32	Rare	AD
CPVT 5	603283	<i>TRDN</i>	Triadin	6q22.31	Rare	AR

AD indicates autosomal dominant; AR, autosomal recessive; and CPVT, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.
*Phenotype MIM number.

Figure 25-Recensement des différentes mutations liées à la CPVT ; (Landstrom, et al.,2017)³³⁵

La CPVT compte désormais plus de 200 mutations associées au RyR2, responsable d'une forme autosomique dominante de la CPVT (CPVT1), dont une grande partie se trouve sur le domaine N-terminal.³³⁶ En effet, ces mutations sont localisées sur les 3 domaines du RyR2 ; N-terminal (résidus 77-466), le domaine central (résidus 2246-2534) et C-terminal (résidus 3778-4959) (**Figure 26**).

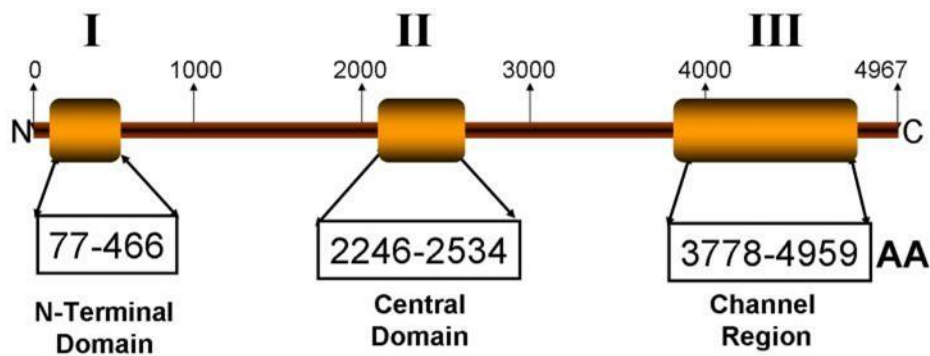


Figure 26- Régions des mutations du RyR2 catégorisées en 3 domaines (I : N-terminal, II : central et III : C-terminal), AA : nombre d'acides aminés estimés pour chaque région (D'après Medeiros-Domingo et al.,2009)³³⁷

Les mutations du RyR2 dans la CPVT1 peuvent induire un gain ou une perte de fonction du canal. L'étude et la caractérisation de ces mutations sont possibles à l'aide de modèles *in vitro* (cellules HEK) et de modèles murins génétiquement modifiés portant la mutation précédemment identifiée chez des patients atteints de CPVT. Certaines de ces mutations entraînent, entre autres, une modification de l'état d'ouverture du canal favorisant des libérations spontanées diastoliques de Ca^{2+} et la survenue d'arythmies lors d'une réponse sympathique.³³⁸

Par exemple, la mutation RyR2 ^{R4496C}, une mutation gain de fonction située sur le domaine C-terminal, conduit à des vagues calciques via l'ouverture spontanée du RyR2 lors de la diastole dans les cardiomyocytes ventriculaires isolés et induit des tachycardies ventriculaires bidirectionnelles après stress pharmacologique (Epinéphrine et caféine) chez la souris exprimant cette mutation.^{339,340} Ces libérations de Ca^{2+} diastolique sont notamment dû à une augmentation de la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} cytosolique.³³⁹ Ces vagues calciques lors de la phase diastolique sont extrudés hors de la cellule par NCX qui induit un courant dépolarisant et peut conduire à des post-dépolarisations membranaires retardées (DAD) qui favorisent la survenue d'arythmies ventriculaires.³⁴⁰

Une autre mutation également située sur le domaine C-terminal (RyR2^{A4860G}) conduit à une perte de fonction du canal. Cette mutation conduit à une diminution de l'amplitude des transitoires calciques dans des cardiomyocytes murins isolés, augmentant graduellement la concentration en Ca^{2+} du RS. Cette surcharge du RS en Ca^{2+} cause des libérations prolongées, brutales et aléatoires de Ca^{2+} via le RyR2 qui activent l'échangeur NCX et déclenchent des post-dépolarisations précoces (EAD).³⁴¹ Il a notamment été proposé que la libération de Ca^{2+} induite par surcharge calcique du RS (ou Store-overload-induced Ca^{2+} release, SOICR) comme un des mécanismes sous-jacents potentiels de la CPVT.^{342,343}

Par ailleurs, le domaine central du RyR2 interagit avec le domaine N-terminal par mécanisme de « zipping ». Cette interaction stabilise l'état inactif (fermé) du RyR2. L'étude d'une mutation du RyR2

identifiée sur le domaine central (RyR2^{R24745}) a notamment démontré une altération de cette interaction favorisant l'ouverture spontanée du canal.³⁰³ En effet, les cardiomyocytes ventriculaires isolés d'un modèle murin exprimant cette mutation présentent une augmentation de la libération de Ca²⁺ sparks via le RyR2 avant et après stimulation β -adrénergique.³⁴⁴

Le domaine N-terminal du RyR2 est constitué de trois domaines (A, B, et C) qui interagissent entre eux.³⁰⁵ Cette interaction serait possible par la présence d'ions chlorure. Cependant, ce domaine anionique a été observé chez la souris mais pas chez l'humain.³⁴⁵ Ces ions chlorure chargés négativement interagissent avec des acides aminés des domaines B et C chargés positivement et notamment, des arginines (R) R420, R298 et R276 (**Figure 27**).³⁴⁵

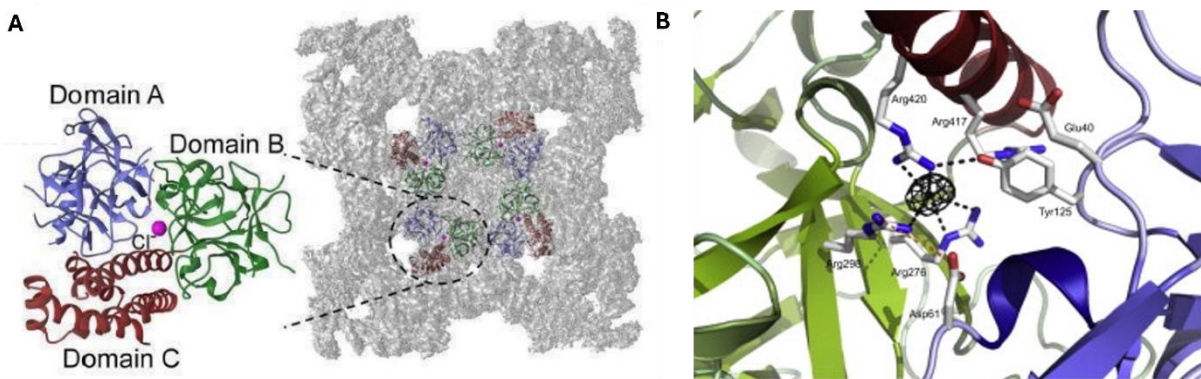


Figure 27- Modélisation 3D du domaine N-terminal du RyR2 ; (A) Vue de dessus du RyR2 et modélisation du domaine N-terminal composé des domaines A (bleu), B (vert) et C (rouge) interagissant par des ions chlorure (rose). (Xiao et al.,2015) **(B)** Modélisation 3D du domaine N-terminal du RyR2 illustrant l'interaction des acides aminés avec les ions chlorure et la liaison hydrogène entre l'arginine 420 et la tyrosine 125 (lignes pointillées noires) (Kimlicka et al.,2013)

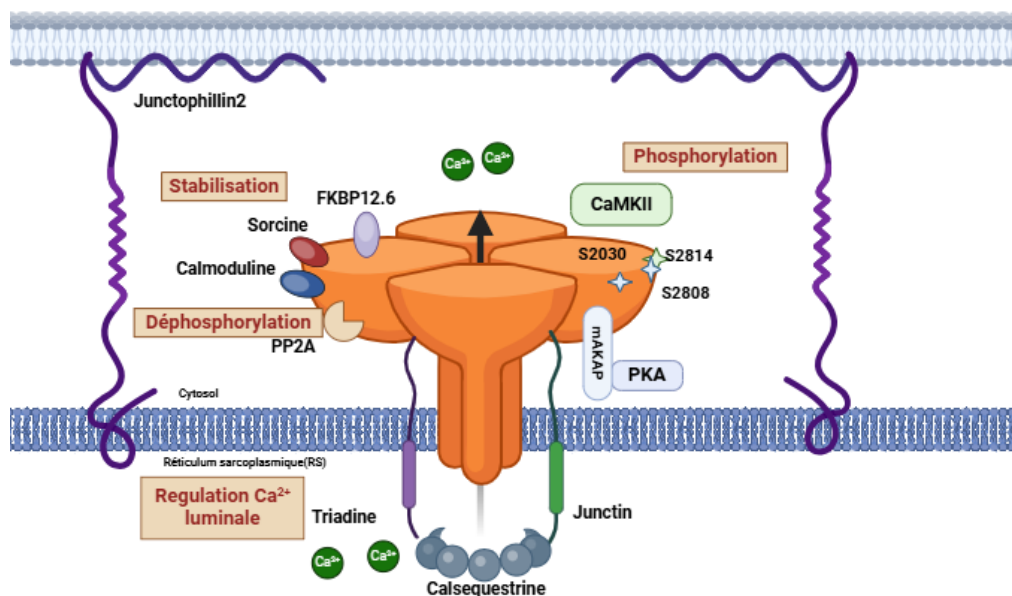
L'arginine (R) 420 serait notamment essentiel à l'interaction entre ces trois domaines. En effet, deux mutations ont été reportées sur cet acide aminé, R420W (substitution d'une arginine par un tryptophane) et R420Q (substitution d'une arginine par une glutamine). L'étude de la mutation R420W a notamment démontré des changements conformationnels du pore du canal ainsi qu'une élévation de la libération de Ca²⁺ fractionnée par RyR2.^{305,346} D'autres études suggèrent alors que la mutation R420W augmente la probabilité d'ouverture du RyR2, favorise la survenue d'arythmies *in vivo* dans un modèle murin et serait potentiellement responsable de CPVT.^{347,348} Cependant, aucune preuve substantielle n'a démontré un lien évident entre cette mutation et la CPVT puisque le patient présentant cette mutation a été diagnostiqué post-mortem à la suite d'une mort subite et sans antécédents familiaux.³⁴⁹

Une autre mutation, R420Q, a été identifiée chez une famille atteinte de CPVT avec antécédents de mort subite.³²⁹ En effet, la mutation R420Q, entraîne une modification de l'état d'ouverture du canal favorisant des libérations spontanées diastoliques de Ca²⁺ dans les cardiomyocytes ventriculaires et la

génération de post-dépolarisations retardées responsables d'arythmies.³³⁸ En effet, une augmentation des libérations spontanées diastoliques de Ca^{2+} a été observée sur des cellules HEK (cellules embryonnaires hépatiques humaines) et sur des cardiomyocytes ventriculaires de souris portant la mutation R420Q.^{329,350} Ces libérations diastoliques favorisent la survenue d'évènements pro-arythmiques et sont notamment liées à une altération de l'interaction entre une protéine associée au RS jonctionnel, la junctophilin2 et des RyR2. Ainsi, cette altération entraîne des remaniements structurels des dyades et de la distribution des RyR2 sur le RS jonctionnel.³⁵⁰ En effet, chaque sous-unité du RyR2 est associée à des protéines régulatrices qui jouent un rôle déterminant sur l'activité du récepteur. Ces protéines, en plus d'autres effecteurs (Ca^{2+} , ATP, etc.), régulent l'activité du récepteur.

IV.5 Régulation du RyR2

L'activité du RyR2 est notamment régulée par des effecteurs endogènes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP), par des protéines cytosoliques (FKBP12.6, CaM, sorcine, Junctophilin2) et luminales (Calsequestrine, Junctin et Triadine) associées au RyR2 et par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, oxydation et nitrosylation). Concernant les modifications post-traductionnelles, seule la phosphorylation sera détaillée dans cette thèse.



Created in BioRender.com

Figure 28- Représentation schématique simplifié des effecteurs et protéines régulatrices du RyR2 ; Créée avec Biorender.com et adapté de Bers, 2004 et Steinberg et al.,2023.

Chacune des sous-unités du RyR2 est associée à des protéines qui interagissent directement ou indirectement avec la partie cytosolique. La diversité et la nature de ces protéines démontrent la complexité des interactions protéines-protéines impliquées dans la régulation du RyR2. Parmi eux, on note des protéines cytosoliques favorisant la stabilisation du RyR2 dans un état fermé (FKBP12.6, CaM, Sorcine), dans l'organisation des RyR2 sur le RS jonctionnel (Junctophilin2), dans la phosphorylation/déphosphorylation du récepteur (PKA, CaMKII, SPEG et PP2A) mais également des protéines lumineales formant un complexe macromoléculaire impliqué dans la régulation de l'activité du RyR2 (**Figure 28**).

Une altération de l'interaction entre ces protéines et le RyR2 peut conduire à des libérations de Ca^{2+} importantes. L'interaction de la FKBP12.6 avec le RyR2 stabilise l'état fermé du canal et sa dissociation augmente la probabilité d'ouverture du RyR2.^{351,352} La FKBP12.6 est une protéine qui se fixe sur chaque monomère du RyR2 avec une forte affinité. En effet, une altération de l'affinité de la FKBP12.6 pour le RyR2 conduit à un changement conformationnel du RyR2 et favorise les fuites calciques. Ces libérations de Ca^{2+} conduisent à une dysfonction diastolique et systolique pouvant être à l'origine des mécanismes pathologiques de l'insuffisance cardiaque.³⁵³ La CaM, une protéine ubiquitaire à haute affinité pour le Ca^{2+} qui exerce une action inhibitrice sur le RyR2.^{354,355} Dans un modèle CPVT murin, la perte d'affinité de la CaM pour le RyR2 favorise les fuites calciques diastoliques du RyR2 et ainsi favorise la survenue d'arythmies létales.³⁵⁶ La sorcine est également une protéine cytosolique liée au RyR2 et à haute affinité pour le Ca^{2+} .^{357,358} Elle exerce également une action inhibitrice sur le RyR2 mais cet effet est réduit lors de la phosphorylation de la sorcine par la PKA.³⁵⁹

Lors de la réponse β -adrénergique, le RyR2 est phosphorylé par des kinases, la PKA et la CAMKII sur des sites de sérines (S2808, S2030 et S2814).³⁶⁰ La déphosphorylation du RyR2 se fait par des phosphatases de type 1 et 2 (PP1 et PP2A) qui sont maintenues à proximité du RyR2 via des protéines d'ancrages respectivement la spinophiline et la PR130 et des phosphodiesterases.^{240,361} La Triadine 1 et la junctine sont des protéines transmembranaires formant un complexe avec le RyR2 et la calséquestrine.³⁶²⁻³⁶⁴ Le complexe macromoléculaire triadine-junctine-calséquestrine a été caractérisé comme modulateur de l'activité du RyR2 régulant la concentration calcique du compartiment luminal.³⁶⁵ Dans cette partie, nous détaillerons les protéines et les effecteurs impliqués dans cette régulation.

IV.5.1 Régulation par des effecteurs endogènes (Ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et ATP)

Le Ca^{2+} cytosolique et lumenale

Les trois isoformes des RyR sont activés par le Ca^{2+} et leur cinétique d'activation est dépendante des concentrations cytosoliques en ions Ca^{2+} . En effet, les RyR sont activés à des faibles concentrations calciques cytosoliques (1-10 μM) mais inhibés à des concentrations plus élevées (1-10 mM).^{366,367} Cependant, une concentration jusqu'à 10 mM est nécessaire pour partiellement inhiber les isoformes RyR2 et 3 contrairement à l'isoforme RyR1 qui est complètement inhibé à une concentration de 1 mM.^{368,369} L'étude des cinétiques rapides d'activation et d'inactivation des RyR2 a permis de mieux caractériser ce récepteur et de suggérer notamment qu'il serait composé de 4 sites de liaison aux ions Ca^{2+} dont 3 cytosoliques et un lumenal (**Figure 29**).³⁷⁰⁻³⁷²

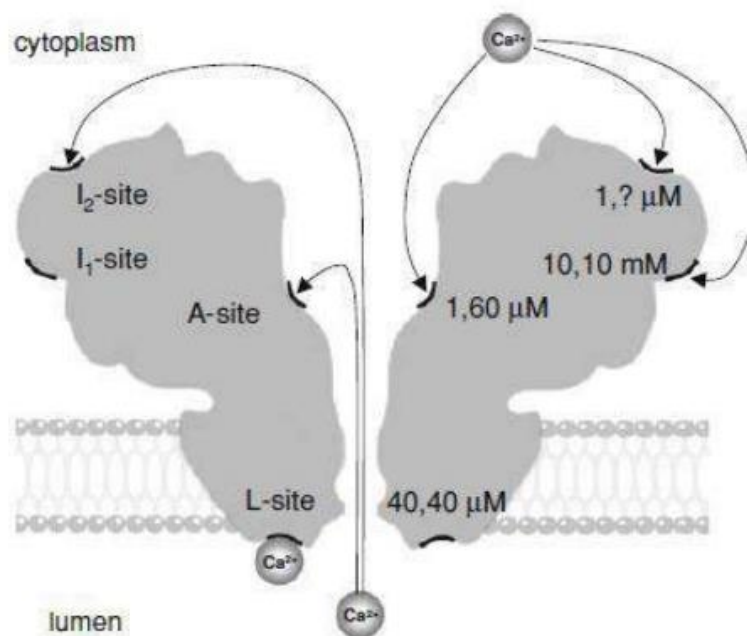


Figure 29-Modèle hypothétique des sites de régulation du RyR2 par les ions $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; Les 3 sites de régulation cytosolique (A, I1 et I2) et le site de régulation lumenale (L-site) sont représentés à gauche et les concentrations en ions $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ d'affinité du récepteur à droite. La concentration d'ions Mg^{2+} d'affinité pour le site I2 n'est pas connue (?). Les flèches noires illustrent les sites de fixation des ions Ca^{2+} au RyR2 (Laver et al.,2009)

Le modèle proposé (**Figure 29**) serait constitué du site d'activation A de forte affinité (1 μM) pour les ions Ca^{2+} , du site d'activation I1 de faible affinité (10 mM) et d'un site d'inactivation I2 de forte affinité (1 μM).³⁷³ Il a été suggéré que les sites A et I1 seraient majoritairement responsable du changement conformationnel du RyR2 lors de son ouverture mais la localisation précise de ces sites reste encore inconnue.³⁷² Cependant, la modélisation 3D du RyR a permis une meilleure compréhension des interactions fonctionnelles et structurales du récepteur aux ions Ca^{2+} et a mis en évidence des sites de liaison aux Ca^{2+} (EF) localisés sur le domaine central (**Figure 20**). Ainsi, il a été finalement suggéré que

le récepteur RyR n'est en fait composé que deux sites de liaison au Ca^{2+} ; un de faible affinité (site L, $40\mu\text{M}$) et un de forte affinité (site A, $1\mu\text{M}$).³⁷⁴ Ces sites de liaison seraient adjacents aux segments S2 et S3 et participeraient aux changements conformationnels du RyR, notamment lors du mécanisme de CICR.^{111,375} Lors de conditions pathologiques, les changements de concentrations en Ca^{2+} cytosolique peuvent néanmoins modifier l'activité du RyR. En effet, la caractérisation d'une mutation du RyR2 (RyR2^{R4496C}) associée à la CPVT a permis de mettre en évidence qu'une libération accrue de Ca^{2+} diastolique dans ce modèle est notamment dû à une augmentation de la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} cytosolique, démontrant ainsi la régulation du RyR2 par le Ca^{2+} cytosolique.³³⁹

De plus, une étude portant sur le rôle des domaines EF sur le RyR2 a démontré que la délétion de ces sites n'altère pas l'activation du récepteur par le Ca^{2+} cytosolique mais luminale.³⁷⁶ En effet, le Ca^{2+} luminal régule l'activité du RyR2 via des sites luminaux de régulation.^{377,378} Dans un modèle de CPVT1, il a été suggéré que la libération importante de Ca^{2+} du RS dans ce modèle serait lié à une augmentation de la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} luminal dû à une pression exercée par la charge en Ca^{2+} du RS (SOICR). Cette mutation réduirait ainsi le seuil de libération de Ca^{2+} par surcharge du RS et favoriserait le développement d'arythmies.^{343,379} Cependant, cette hypothèse ne fait pas l'unanimité mais suggérerait que la modulation de l'activité du RyR2 par le Ca^{2+} luminal met en jeu des protéines régulatrices associées tels que la calséquestrine, la triadine, etc.

Les ions magnésium (Mg^{2+})

La concentration des ions Mg^{2+} dans les compartiments cytosoliques et lumenales est de 1mM . Les ions Mg^{2+} régule l'activité du RyR2 en favorisant son état fermé.^{380,381} En effet, la liaison réversible et compétitive des ions Mg^{2+} sur les sites d'affinité (site A et L) (**Figure 29**) du Ca^{2+} sur le RyR2 inhibe l'ouverture de celui-ci.³⁸² En effet, lors de la phase diastolique, l'occupation des sites d'activations cytosoliques (site A, affinité de $60\mu\text{M}$ au Mg^{2+}) du RyR2 par les ions Mg^{2+} empêche la fixation des ions Ca^{2+} cytosoliques et prévient l'ouverture du RyR2 par mécanisme de CICR lorsque les concentrations en Ca^{2+} sont élevées.³⁸³ Les ions Mg^{2+} se fixent également sur des sites lumenales du RyR2 (site L, affinité de $40\mu\text{M}$ au Mg^{2+}) de forte affinité au Ca^{2+} ($40\mu\text{M}$) par compétition au vu de leur affinité similaire et favorise l'état fermé du canal.^{383,384} Ainsi, la régulation du RyR2 par les ions Mg^{2+} se relève nécessaire à la fonction physiologique du RyR2 dans la fonction cardiaque.

L'Adénosine triphosphate (ATP)

L'adénosine triphosphate (ATP) est un nucléotide dont l'hydrolyse sous forme d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate est nécessaire à la production d'énergie essentiel aux fonctions cellulaires entre autres. L'ATP est également un substrat de l'adénylate cyclase qui produit à son tour de l'AMPc, messenger secondaire essentiel aux fonctions cellulaires et notamment lors de la réponse β -

adrénergique.³⁸⁵ L'ATP régule notamment l'activité du RyR2 mais uniquement en présence de Ca^{2+} .³⁸⁰ En effet, la seule présence de Ca^{2+} induit un état de sous-conductance du canal tandis que l'ajout d'ATP et de caféine augmentent la probabilité d'ouverture du canal ainsi que sa durée moyenne d'ouverture (**Figure 23**).³¹⁸

IV.5.2 Régulation du RyR2 par les protéines cytosoliques associées

IV.5.2.1 Les protéines FKBP « FK506 Binding Proteins »

Les FKBP sont des protéines appartenant à la famille des immunophilines qui se lient à des immunosuppresseurs tels que le Tacrolimus (FK506) ou le Sirolimus (rapamycine), traitements utilisés dans le traitement post-opérationnel des transplantations d'organes ou des patients atteints de maladies auto-immunes.^{386,387} Deux de ces protéines sont notamment distinguées par leur poids moléculaire (FKBP12 et FKBP12.6) et leurs séquences partagent 85% d'homologie entre elles.³⁵² La FKBP12.6, également appelée castalbine 2, est la forme avec la plus haute affinité pour le RyR2 bien que l'expression de FKBP12 soit plus importante.^{352,388,389} L'interaction de ces protéines avec le RyR2 stabilise l'état fermé de celui-ci.³⁹⁰ En effet, la dissociation des FKBP12.6 du RyR2 par incubation de FK506 ou rapamycine ou l'ablation génétique de FKBP12.6 dans un modèle murin augmente la probabilité et la durée d'ouverture du récepteur.^{351,352,391} Un modèle murin exprimant une déficience en FKBP12.6 a notamment développé des épisodes de fibrillation atriale.³⁹² De plus, la surexpression de FKBP12.6 dans un modèle de souris prévient le développement de tachycardie ventriculaire *in vivo* par réduction de fuite de Ca^{2+} diastolique du RS.³⁹³ La surexpression de FKBP12.6 dans un modèle de rat diminue la libération spontanée de Ca^{2+} sparks et induit une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques, démontrant ainsi une charge en Ca^{2+} du RS plus importante et une amélioration du CEC.³⁹⁴ La modélisation 3D du RyR2 a permis de mieux localiser les sites de liaison des FKBP situés sur les domaines SPRY1.³⁹⁵ En effet, des mutations du domaine N-terminal (RyR2^{G230C}) et du domaine central (RyR2^{R2474S} et RyR2^{P2328S}) du RyR2 associées à la CPVT ont démontré une réduction de l'affinité de la FKBP12.6 pour le RyR2.³⁹⁶⁻³⁹⁸ Par ailleurs, l'inhibition de FKBP12.6 sur des cardiomyocytes augmente la sensibilité des RyR2 au Ca^{2+} entrant par les LTCC lors du CEC, démontrant une fois de plus le rôle stabilisateur des FKBP12.6 du RyR2.³⁹⁹ L'étude des effets inhibiteurs du dantrolène sur le RyR2 a démontré que cet effet inhibiteur dépendait de FKBP12.6. Le dantrolène est un inhibiteur du RyR et est utilisé comme myorelaxant dans le traitement de la spasticité musculaire. En effet, l'incubation de dantrolène en association avec de la rapamycine, un dissociateur de la FKBP12.6, diminue l'inhibition du dantrolène, démontrant ainsi que l'inhibition du RyR2 par le dantrolène nécessite la présence de FKBP12.6. De plus, l'effet inhibiteur du dantrolène serait également dépendant de la CaM.^{400,401}

IV.5.2.2 La calmoduline (CaM)

La CaM est une protéine ubiquitaire qui se lie au Ca^{2+} formant le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ qui régule, entre autres, le RyR en se fixant sur des domaines de liaison « CaM Binding Domains » (CaMBD).⁴⁰² Ces domaines de liaison sur le RyR2 sont au nombre de 4 (CaMBD1a, -1b, -2, -3). Cette protéine se lie aux trois isoformes du RyR selon une conformation à de faibles concentrations en Ca^{2+} (Apo-CaM) et lié au Ca^{2+} (Ca/CaM). Cependant, l'effet de ces formes de CaM est différent selon l'isoforme du RyR. La forme Ca/CaM inhibe tous les isoformes du RyR tandis que la forme ApoCaM n'a pas d'effet sur RyR2.^{354,403,404} La forme Ca/CaM se lie au RyR2 sur le domaine de liaison CaMBD2 et stabilise l'état fermé du récepteur en augmentant les concentrations en Ca^{2+} cytosolique.³⁵⁴ En effet, cette liaison sature le RyR2 en Ca^{2+} et modifie sa sensibilité au Ca^{2+} cytosolique.^{405,406}

Par ailleurs, il a été démontré que le mécanisme pathologique d'une mutation du RyR2 (RyR2^{R2474S}) associée à la CPVT est lié à la réduction de l'affinité du RyR2 pour la CaM entraînant des libérations spontanées de Ca^{2+} et favorisant l'apparition d'arythmies sévères.^{356,407} Des mutations sur la CaM sont également responsables de CPVT (CPVT4).⁴⁰⁸ En effet, les mutations N53I ou N97S sur la CaM sont responsables d'une augmentation des libérations de Ca^{2+} du RyR2, conséquence d'une augmentation de la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} luminale par SOICR.^{343,409} Par ailleurs, la CaM régule indirectement l'activité du RyR2. En effet, le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ active la CaMKII qui phosphoryle le RyR2 lors d'une réponse β -adrénergique.⁴¹⁰

IV.5.2.3 La sorcine

La sorcine est une protéine ubiquitaire qui se lie au Ca^{2+} et stabilise l'état fermé du RyR2 en diminuant sa probabilité d'ouverture.^{357,358} Cette protéine soluble n'interagit avec le RyR2 que lorsque les concentrations cytosoliques en Ca^{2+} sont élevées (Concentration d'efficacité médiane EC_{50} de 200 μM de Ca^{2+}) suggérant le rôle stabilisateur du RyR2. En effet, la sorcine réduit la fréquence de Ca^{2+} sparks dans des cardiomyocytes quiescents perméabilisés et réduit l'amplitude des transitoires calciques lors du CEC, suggérant que la sorcine inhibe à la fois les libérations spontanées et induites lors du CICR des RyR2.^{359,411}

Cependant, cette diminution de l'activité du RyR2 n'induit pas une surcharge en Ca^{2+} du RS. La surexpression de sorcine par transfection d'adénovirus dans un modèle de lapin induit une réduction de l'amplitude des transitoires calciques et de la charge calcique du RS.⁴¹² L'explication la plus plausible serait que la sorcine interagisse étroitement avec NCX et SERCA2A et que cette interaction entrainerait une accélération de l'extrusion et de la recapture du Ca^{2+} .^{413,414} Cependant, la surexpression de sorcine in vivo de modèles murins conduirait à des conclusions contradictoires. En effet, Meyers et al., aurait

observé des résultats cohérents avec le modèle *in vitro* tandis que Frank et al., aurait démontré une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques, de la charge calcique du RS et de la contractilité des cardiomyocytes.^{357,415,416}

Par ailleurs, l'altération de l'expression de la sorcine pourrait être lié à des altérations de la fonction cardiaque. L'étude d'une mutation de la sorcine (F112L) exprimée dans un modèle murin a démontré une réduction de taille des cardiomyocytes isolés, une fréquence de Ca^{2+} sparks plus importante et une augmentation de l'activité de NCX, suggérant le rôle régulateur de la sorcine dans le CEC.⁴¹⁷ En effet, cette mutation a été décelée chez des patients présentant une hypertrophie cardiaque et une hypertension artérielle. Cependant, les modèles murins ne présentent aucune anomalie de la fonction cardiaque et artérielle, suggérant que d'autres facteurs en plus de la sorcine sont impliqués dans cette régulation.⁴¹⁷ L'ablation de la sorcine sur des modèles murins induit des arythmies ventriculaires *in vivo* sévères allant jusqu'à la mort subite. Ces arythmies seraient la conséquence de l'élévation de libérations spontanées diastoliques de Ca^{2+} , suggérant le rôle essentiel de la sorcine dans le maintien de l'homéostasie calcique.⁴¹⁸

IV.5.2.4 La Junctophiline 2 (JPH2)

La Junctophiline est une protéine du RS et existe sous trois isoformes majoritaire ; JPH1, JPH2 et JPH3 respectivement identifiée dans le muscle squelettique, le muscle cardiaque, le cerveau.⁴¹⁹ Cette protéine est impliquée dans l'organisation des dyades et le maintien d'une distance physiologique entre la membrane du RS et la membrane plasmique. En effet, une réduction de l'expression de JPH2 à l'aide d'un modèle murin a démontré un remodelage de l'organisation des tubules T dans des modèles d'insuffisance cardiaque et une altération de la dynamique calcique, suggérant le rôle potentiel de la JPH2 dans le processus du CEC.⁴²⁰⁻⁴²³ En effet, la JPH2 est colocalisée avec le RyR2 et interagit avec celui-ci via son domaine C-terminal.⁴²⁴ La surexpression de JPH2 dans un modèle murin conduit à une augmentation de la taille des clusters de RyR2 mais à une diminution de la fréquence de Ca^{2+} sparks, suggérant le rôle inhibiteur de la JPH2 sur RyR2.⁴²⁵ Par ailleurs, l'étude d'une mutation du RyR2 associée à la CPVT (RyR2^{R420Q}) a démontré une réduction de l'interaction entre la JPH2 et le RyR2 et un remodelage des dyades. Cette altération structurelle a pour conséquence une augmentation des libérations de Ca^{2+} diastolique sous forme de Ca^{2+} sparks et waves, favorisant la survenue d'arythmies dans ce modèle.³⁵⁰ Etant donné le rôle de cette protéine dans le CEC, des chercheurs se sont également intéressés à son implication dans l'activité automatique du NSA. Un modèle inductible murin déficient en JPH2 a développé des tachycardies sinusales en condition basale et une réponse β -adrénergique altérée *in vivo*. Les cellules sinusales isolées de ces modèles présentent une altération de la dynamique calcique via une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques et de la fréquence des Ca^{2+}

sparks.⁴²⁶ Cependant, l'étude de la JPH2 dans le NSA est très peu documentée à ce jour. Ces résultats démontrent ainsi le rôle majeur de la JPH2 dans la régulation du RyR2 et dans le maintien d'une fonction cardiaque physiologique.

IV.5.3 Régulation du RyR2 par les protéines luminales associées

Le complexe triadine-junctine-calséquéstrine

La calséquéstrine (CSQ) est une protéine du RS qui se lie au Ca^{2+} avec une grande capacité. En effet, la CSQ est un chélateur de Ca^{2+} majeur dans la lumière du RS. Cette liaison au Ca^{2+} induit un changement conformationnel et une polymérisation de la CSQ lorsque les concentrations en Ca^{2+} sont élevées (1mM).⁴²⁷ Cette protéine existe sous deux isoformes (CSQ1 et CSQ2) exprimées majoritairement dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque respectivement et qui partagent plus de 85% d'homologie entre elles.⁴²⁸ Des différences ont été observées entre ces isoformes, notamment sur leur capacité de liaison au Ca^{2+} et leur interaction avec le RyR2. En effet, la capacité de liaison au Ca^{2+} de la CSQ1 est nettement supérieure à celle de la CSQ2 mais conduit à une réduction de l'activité du RyR1 contrairement à la CSQ2 qui augmente la probabilité d'ouverture du RyR2, en fonctionnant comme un senseur de Ca^{2+} .⁴²⁸ Par ailleurs, des mutations de la CSQ2 ont été identifiées chez des patients atteints d'une forme autosomique récessive de CPVT, appelée CPVT2.⁴²⁹ Les mutations sur le gène codant pour la CSQ et associées à la CPVT sont des mutations entraînant une diminution significative voire une perte d'expression de la CSQ.^{334,430} En effet, l'absence d'expression de la CSQ2 dans un modèle murin induit une forme sévère d'arythmies ventriculaires polymorphes *in vivo* après effort lié à des fuites importante de Ca^{2+} du RS sur cardiomyocytes isolés.⁴³¹ Des dysfonctions sinusales ont été également décelés chez les patients atteints de CPVT2 et les modèles murins n'exprimant pas la CSQ2.^{432,433} En effet, les modèles murins présentent une altération de la réponse β -adrénergique et de la conduction de l'activité électrique du NSA.⁴³³ Cependant, une surexpression de CSQ2 n'est pas protectrice mais induit une élévation de l'amplitude des transitoires calciques et des Ca^{2+} sparks dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris.⁴³⁴ De plus, les modèles murins surexprimant la CSQ2 ont notamment présenté une fonction cardiaque diminuée et une hypertrophie cardiaque.⁴³⁵⁻⁴³⁷ Par ailleurs, la probabilité d'ouverture du RyR2 est inhibée par la CSQ2 à des concentrations faibles en Ca^{2+} luminaire mais cette inhibition est levée lorsque les concentrations en Ca^{2+} luminaire augmentent.³⁶⁵ Ces études démontrent ainsi le rôle essentiel de la CSQ2 dans la fonction et le rythme cardiaque et sur la régulation de l'activité du RyR2 par le Ca^{2+} luminaire.

Bien que la CSQ2 interagisse directement avec le RyR2, cette régulation peut dépendre également de l'interaction entre la CSQ2 et deux protéines luminales, la triadine et la junctine, situées sur le RS

jonctionnel et exprimées dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque.^{362,438,439} Ces protéines forment un complexe macromoléculaire avec la CSQ2 via leur domaine C-terminal et interagissent de manière Ca^{2+} dépendante avec le RyR2.⁴⁴⁰ L'ablation de la triadine dans un modèle murin conduit notamment à une altération de l'organisation et de la structure des CRU, une réduction d'expression des protéines du CEC (RyR2, CSQ2, JPH2) sans modification de l'expression des LTCC et de SERCA2A favorisant la survenue d'arythmies ventriculaires via la surcharge en Ca^{2+} du RS.⁴⁴¹ En effet, une forme autosomique récessive de CPVT (CPVT5) a été identifiée chez des familles de patients exprimant des mutations sur la triadine et présentant des épisodes de syncopes ou de mort subite après stress sans mutations du RyR2 et de la CSQ2.⁴⁴² Par ailleurs, un nouveau syndrome lié à des mutations de la triadine (TKOS pour Triadine Knock Out Syndrome) a été diagnostiqué chez des patients atteints de syncope et d'arrêt cardiaque débutant à un très jeune âge (≤ 3 ans).⁴⁴³ L'étude de ce syndrome sur des cellules humaines pluripotentes induites provenant de patients a démontré une réduction significative de l'expression de la CSQ2, une prolongation de la durée du PA et des épisodes de post-dépolarisations retardées (DAD) pouvant favoriser la survenue d'arythmies.⁴⁴⁴ La contribution de la junctine est cependant très peu documentée.

V. La phosphorylation lors de la réponse β -adrénergique et régulation du RyR2

V.1 Différentes voies de phosphorylation lors de la réponse β -adrénergique

La réponse β -adrénergique est induite par fixation de catécholamines sur les β -AR lors d'un stress émotionnel ou un effort physique entraînant, entre autres, l'accélération du rythme cardiaque (effet chronotrope positif) et l'augmentation de la force de contraction du cœur (effet inotrope positif). Cette réponse physiologique est induite par l'activation des récepteurs β -adrénergiques qui accélère *in fine* le courant I_f au niveau du NSA via l'activation des canaux HCN4 par l'AMPc responsable de l'effet chronotrope positif et accélère le CEC dans les ventricules, responsable de l'effet inotrope positif.

Cette réponse induit l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire des cardiomyocytes. En effet, l'épinéphrine induit une augmentation du courant calcique et de l'amplitude des transitoires calciques dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat, suggérant que cette stimulation β -adrénergique induit une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire provenant entre autres du RS via le RyR2.⁴⁴⁵ De plus, la stimulation β -adrénergique des cellules sinusales induit une augmentation de l'amplitude et de la fréquence de LCR via le RyR2, et par conséquent, augmente le courant I_{NCX} qui

contribue à la DD du PA sinusal.⁴⁴⁶ De plus, l'inhibition du RyR2 par la ryanodine réduit la fréquence de génération des PA sinusaux en modifiant les caractéristiques de ces PA et la réponse chronotrope positive après incubation avec de l'isoprénaline, un agoniste β -adrénergique.⁴⁴⁷ Ainsi, ces résultats démontrent le rôle essentiel des libérations de Ca^{2+} du RyR2 lors de la réponse au stress.

Lors de cette réponse β -adrénergique, l'AMPc active directement une kinase, la PKA et indirectement une autre kinase, la CaMKII (**Figure 30**). Ces kinases ont été identifiées comme modulatrices de l'activité du RyR2.⁴⁴⁸ C'est en 1989 que Takasago et al., démontrent que la phosphorylation AMPc-dépendante du RyR2 par des kinases conduit à une augmentation de l'activité du RyR2 à la suite de l'augmentation de la fixation de ryanodine tritiée utilisée en technique de Radiobinding assay.⁴⁴⁹ En effet, la ryanodine se fixe sur le RyR2 lorsque celui-ci est ouvert. La kinase CaM-dépendante (CaMKII) augmente notamment l'activité du RyR2 via la phosphorylation du site sérine (S) présent sur le RyR2, S2809.⁴⁵⁰ Ce site est également phosphorylé par la PKA et cette phosphorylation PKA dépendante augmente la probabilité d'ouverture du RyR2.⁴⁵¹ De plus, l'altération de la libération de LCR et de l'automatisme des cellules isolées de lapin en présence d'un inhibiteur de la PKA (PKI) démontrent que l'activité automatique des cellules sinusales est bien dépendante de la phosphorylation de PKA.²⁰² La phosphorylation du RyR2 par la PKA et par la CaMKII sont détaillées dans la section suivante.

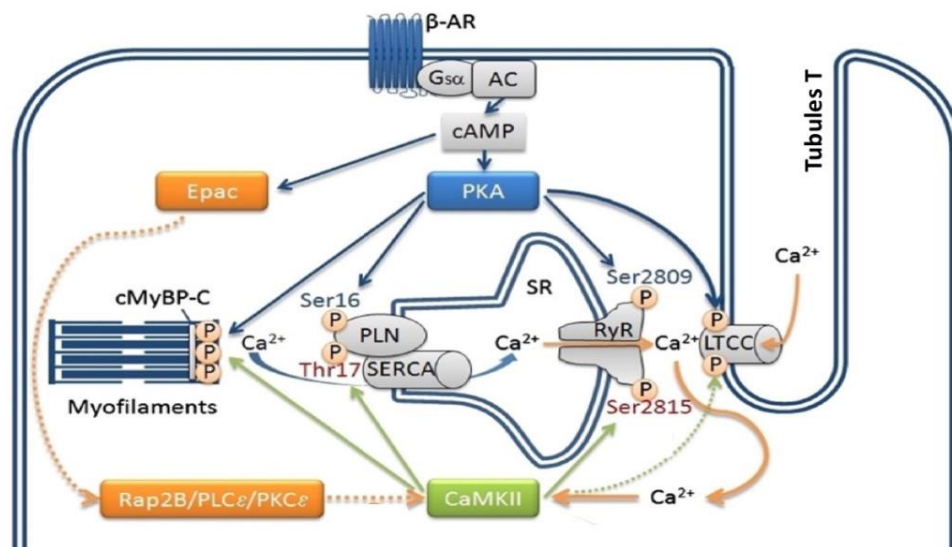


Figure 30-Cascade de phosphorylation dans les cardiomyocytes ventriculaires lors de la réponse β -adrénergique. β -AR, récepteur β -adrénergique; LTCC, canaux calciques de type L; G_{α} , sous-unité α de la protéine G_s ; AC, adénylate cyclase; cAMP, adénylate cyclique; PKA, protéine kinase A; Epac, Protéine d'échange activée par l'AMPc; SR, réticulum sarcoplasmique; PLN, phospholamban; SERCA, Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique; RyR, récepteur à la ryanodine; CaMKII, Kinase Ca^{2+} et calmoduline-dépendante II; cMyBP-C, protéine de liaison à la myosine; Rap2B, protéine RAS-related GTP-binding protein; PLC ϵ , phospholipase C ϵ ; PKC ϵ , protéine kinase C ϵ . (Grimm et al., 2010)⁴⁵²

Voie de phosphorylation PKA-dépendante

Cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire lors de la réponse β -adrénergique est également dépendante de la phosphorylation PKA dépendante des canaux calciques voltage-dépendants qui induit une augmentation du courant $I_{Ca,L}$.⁴⁵³ En effet, l'inhibition de la voie AMPc-PKA via un antagoniste spécifique compétitif Rp-AMPC sur des cellules sinusales de lapin démontre notamment une réduction significative du courant $I_{Ca,L}$.⁴⁵⁴ La phosphorylation des canaux LTCC par la PKA a lieu sur les sous unités $\alpha 1$ (Serine1928) et $\beta 2$ (Sérines478 et 479) des LTCC et est ensuite régulé par déphosphorylation rapide par des phosphatases PP1 et PP2A.^{455,456} De plus, la protéine G (Rad) inhibe les canaux LTCC et la phosphorylation PKA dépendante de cette protéine lève cette inhibition.^{457,458}

L'augmentation de l'amplitude des transitoires calciques et des LCR lors de la réponse β -adrénergique est notamment dûe à la phosphorylation par la PKA et la CaMKII du phospholamban (PLB), inhibiteur de l'activité de la pompe SERCA2A. La phosphorylation de PKA sur des résidus sérine 16 et de CaMKII sur des résidus thréonine 17 du PLB augmente l'activité de la SERCA2A et accélère la recapture du Ca^{2+} vers le RS permettant ainsi le remplissage des réserves en Ca^{2+} .^{202,459} Il a été proposé que le NCX soit également sujet à une phosphorylation par la PKA et la CaMKII compte tenu des sites de phosphorylation présent dans sa structure.⁴⁶⁰ Cependant, les effets de la phosphorylation de NCX dans la réponse β -adrénergique sont controversés.⁴⁶¹

Voie de phosphorylation CaMKII-dépendante

En plus de la contribution de la voie de phosphorylation PKA-dépendante, la stimulation β -adrénergique nécessite également l'activation de la voie de phosphorylation CaMKII-dépendante (**Figure 30**).⁴⁵² En effet, un rythme cardiaque plus lent après stimulation β -adrénergique a été observé sur un modèle murin dont la CaMKII a été inhibée par expression transgénique d'un peptide inhibiteur (AC3-I). L'inhibition de CaMKII réduit l'effet β -adrénergique de l'ISO en altérant la dynamique calcique notamment la charge calcique du RS et la fréquence de Ca^{2+} sparks, nécessaire à l'accélération de la DD lors de cette réponse.⁴⁶² L'activation Ca^{2+} dépendante de la CAMKII est également indirectement dûe à une protéine appelée Epac (Exchange Protein directly Activated by cAMP). Epac est un facteur d'échange des petites protéines G de la famille Ras, Rap1 et Rap2. En effet, l'activation d'Epac par l'AMPC induit l'activation des protéines kinases C et la libération de Ca^{2+} par les récepteurs IP3 qui activent indirectement la CaMKII.⁴⁶³

La CaMKII régule également les protéines impliquées dans l'horloge membranaire (canaux calciques, sodiques et potassiques voltage-dépendants) et l'horloge calcique (RyR2, SERCA2A). L'inhibition pharmacologique de la CaMKII (KN-93 et autocalmitide 2) diminue l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$, la

fréquence et l'amplitude des PA des cellules sinusales.²⁰¹ La CaMKII phosphoryle les LTCC sur les sous-unités α_1 et β .^{464,465} Les canaux Kv4.3 du courant I_{to} sont également modulés par CaMKII via la phosphorylation d'une sérine 550 induisant un ralentissement de l'inactivation de ces canaux et une modification de leur expression dans des cardiomyocytes ventriculaires.⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁸ La phosphorylation par CaMKII des canaux Na^+ augmente l'amplitude du courant I_{Na} induisant une augmentation d'ions Na^+ intracellulaire et une prolongation du PA dans les cardiomyocytes ventriculaires.⁴⁶⁹

V.2 La phosphorylation du RyR2

Le RyR2 contient plusieurs sites de sérines (S) et thréonines (T) bien conservés entre les espèces qui sont phosphorylés lors d'une réponse β -adrénergique par la PKA et la CaMKII.^{360,410} Le site S2808 chez l'humain (S2809 chez le lapin) a été identifié comme PKA et CaMKII dépendant, le site S2814 chez l'humain (S2815 chez le lapin) comme CaMKII-dépendant uniquement et le site S2030 chez l'humain (2031 chez le lapin) comme PKA-dépendant.^{360,450,470-473} Afin de comprendre le rôle de la phosphorylation du RyR2 dans la fonction cardiaque et notamment lors de la réponse β -adrénergique, à l'aide de modèles murins génétiquement modifiés, des modifications de ces sites par substitution de la sérine (S) par une alanine (A) ont été induites afin d'empêcher la phosphorylation du site. Afin de mieux comparer les rôles de ces sites lorsqu'ils sont phosphorylés, des modèles génétiquement modifiés ont été induits par substitution de la sérine (S) par un acide aspartique (D) afin de mimer constitutivement la phosphorylation du site.

V.2.1 Phosphorylation du RyR2 par la PKA

La PKA est une kinase de structure hétérotétramérique composée de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) et est ancrée à la membrane plasmique par une protéine d'ancrage (AKAP) (**Figure 31**). Les sous-unités R possèdent deux sites de liaison à l'AMPc, qui une fois liés, entraîne un changement de conformation et libère les sous-unités C qui phosphoryle les protéines cibles sur des résidus sérine/thréonine.⁴⁷⁴ Les sous-unités R existent sous les isoformes RI α , RI β , RII α et RII β dont les isoformes α sont majoritairement exprimés dans le cœur et les sous-unités C existent sous les isoformes C α , C β et C γ . Ainsi, deux types de PKA sont prédominants dans le cœur ; la PKA de type I (RI α C α) qui représente la moitié de l'activité totale de la PKA et qui possède une affinité plus importante que la PKA de type II (RII α C α).^{475,476} La déphosphorylation du RyR2 est régulée par les PP1 et PP2A.^{239,240}

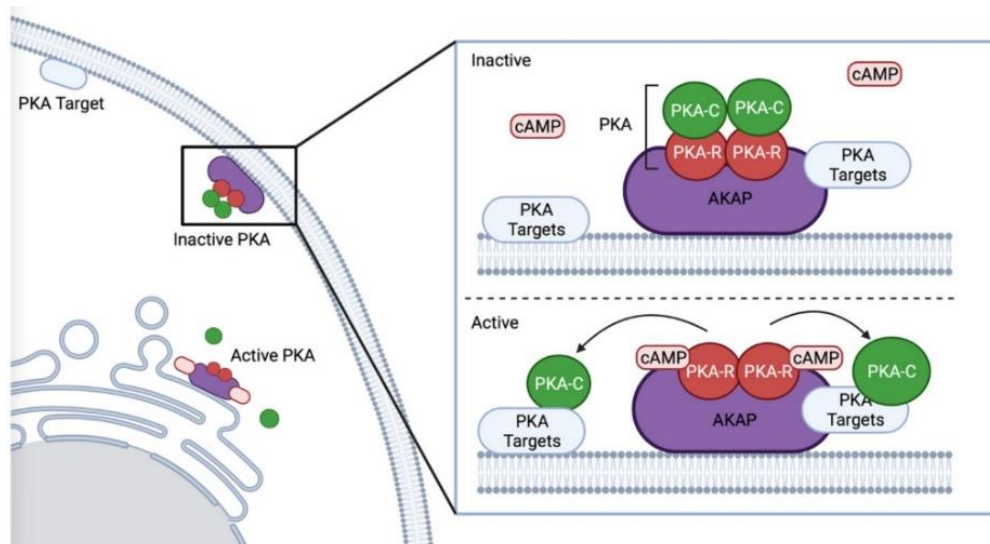


Figure 31- Représentation schématique de la protéine kinase A sous sa forme active et inactive ; La PKA est composée de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) et est ancrée sur la membrane plasmique par une protéine d'ancrage (AKAP). Les sous-unités R possèdent deux sites de liaison à l'AMPc, qui une fois liés, entraîne un changement de conformation et libère les sous-unités C qui phosphoryle les protéines cibles sur des résidus sérine/thréonine (Illustration de Sadeghian et al., 2022)⁴⁷⁷

Un site de phosphorylation PKA-dépendant sur le RyR2 sur une sérine 2808 a été identifié. Cependant, l'effet de cette phosphorylation sur le RyR2 est sujet à controverse.

Dans les années 2000, Marks et al. ont attesté que la phosphorylation du site S2808 induit une augmentation de l'activité du RyR2 et notamment de sa probabilité d'ouverture par dissociation de FKBP12.6, protéine stabilisatrice du RyR2 qui induit ainsi une fuite importante de Ca^{2+} du RS.⁴⁷⁸ De plus, ils soutiennent l'hypothèse que la phosphorylation de S2808 est notamment plus importante dans un modèle d'insuffisance cardiaque suggérant que l'hyperphosphorylation de S2808 est responsable de l'altération de la contractilité des cardiomyocytes dans l'IC et que la phosphorylation de S2808 est critique dans la fonction cardiaque.^{478,479} En effet, ils ont observé que les souris S2808A présentent moins de fuite de Ca^{2+} après stimulation β -adrénergique dû à l'interaction maintenue entre la FKBP12.6 et le RyR2 et que ces modèles S2808A démontrent également une fonction cardiaque préservée après induction d'un infarctus du myocarde par ligation de l'artère coronaire descendante gauche.⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹ Ils en viennent même à suggérer que la prévention de l'hyperphosphorylation de S2808 constituerait une approche thérapeutique majeur dans l'IC. Cependant, le rôle de la phosphorylation sur S2808 dans la fonction cardiaque et notamment dans la réponse β -adrénergique ne font pas l'unanimité. En effet, il est reconnu que la phosphorylation AMPc dépendante lors de la réponse β -adrénergique augmente l'activité du RyR2 et notamment la libération de Ca^{2+} sparks via RyR2.^{202,449,451} Cette libération de Ca^{2+} est notamment possible via l'augmentation de la charge calcique du RS à la suite de la recapture du Ca^{2+} par SERCA2A. Cette recapture est induite après désinhibition de SERCA2A par phosphorylation de PLB sur un résidu sérine 16 (PKA) et thréonine 17 (CaMKII). Dans un modèle murin n'exprimant pas le

PLB ou exprimant des mutations sur les sites de phosphorylation S16 et T17, la fréquence et les caractéristiques des Ca^{2+} sparks restent inchangées malgré la phosphorylation de S2808, démontrant ainsi que la phosphorylation du RyR2 sur S2808 ne peut expliquer à elle-seule l'augmentation de l'activité du RyR2.⁴⁸² De plus, à l'état basal, le site S2808 est phosphorylé à hauteur de 75% de sa capacité de phosphorylation maximale contrairement au site CaMKII dépendant S2814 qui est moins phosphorylé, mettant en doute l'hyperphosphorylation potentielle de S2808 dans l'IC.⁴⁸³ En effet, des études sur des modèles murins S2808A ont démontrés une fonction cardiaque et une réponse β -adrénergique préservée comparé aux WT démontrant que la phosphorylation du site S2808 n'est pas impliquée dans la réponse β -adrénergique et notamment dans les dysfonctions cardiaques, et ce quel que soit le fond génétique du modèle.⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁸ En effet, un modèle murin S2808A a été générés par le groupe de Marks et al. et un autre modèle S2808A a été généré par le groupe de Valdivia et al. Par ailleurs, plusieurs autres groupes de recherche utilisant le modèle murin du groupe de Valdivia et al. réfutent l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de S2808 modifierait l'activité du RyR2 par dissociation de FKBP12.6 mais admettent une réduction de l'expression de FKBP12.6 dans l'insuffisance cardiaque indépendamment des niveaux de phosphorylation du RyR2.⁴⁸⁹⁻⁴⁹³ En effet, la modélisation structurelle de RyR2 par cristallographie ne démontre pas d'interaction significative entre le FKBP12.6 et le site de phosphorylation S2808 suggérant alors la contribution mineure de ce site dans la dissociation de FKBP12.6.⁴⁹⁴

Un autre site PKA-dépendant a été identifié (S2030).⁴⁹⁵ Contrairement au site S2808, le site S2030 est peu phosphorylé à l'état basal mais très sensible à une stimulation β -adrénergique proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration de la PKA uniquement.⁴⁹⁵ De plus, cette phosphorylation est significativement inhibée par la PKI, un inhibiteur spécifique de la PKA.⁴⁷² Des souris S2030A (non phosphorylable sur le site S2030) ont été développées afin de comprendre l'implication de ce site dans la fonction cardiaque et notamment dans la réponse β -adrénergique. L'étude de la dynamique calcique sur les cardiomyocytes issues de ces modèles a démontré une diminution du CEC et une réduction de libérations diastoliques spontanées (Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves) après ISO par rapport aux WT démontrant ainsi l'importance de la phosphorylation de S2030 dans la réponse β -adrénergique.⁴⁷³ Par ailleurs, les cardiomyocytes ventriculaires issus des modèles S2030A ne présentent pas d'élargissement des dyades après ISO contrairement aux modèles S2808A, S2814A et WT, suggérant un lien potentiel direct entre la phosphorylation du RyR2 sur S2030 et la microarchitecture des cardiomyocytes lors de la réponse β -adrénergique.³¹² Le rôle de la phosphorylation de S2030 dans la dysfonction cardiaque n'est pas documenté à l'exception d'une potentielle hyperphosphorylation de S2030 dans un modèle de cardiomyopathie.⁴⁹⁶

V.2.2 Phosphorylation du RyR2 par la CaMKII

La CaMKII est une kinase dépendante du complexe Ca^{2+} /Calmoduline (Ca^{2+} /CaM) qui phosphoryle les protéines sur des résidus sérine/thréonine. Cette kinase est une enzyme décimérique (douze unités). Chaque monomère comporte un domaine catalytique (N-terminal), un domaine associatif (C-terminal) et un domaine autorégulateur Ca^{2+} /CaM Ca^{2+} dépendant.^{497,498} Dans sa forme inactive ou auto-inhibée, les domaines catalytiques sont inhibés par le domaine autorégulateur. L'activation de la CaMKII par la fixation du complexe Ca^{2+} /CaM sur le domaine autorégulateur induit un changement conformationnel de l'enzyme afin d'activer les domaines catalytiques (**Figure 32**). Cette kinase sous sa forme CaMKII δ est notamment capable de s'autophosphoryler sur une thréonine (T286) permettant un maintien de son activité après dissociation du complexe Ca^{2+} /CaM.^{499,500} Cette autophosphorylation permet également d'accroître la stabilité de la CaM au complexe et ainsi de maintenir une activité de la CaMKII dans des conditions faibles en Ca^{2+} .⁵⁰¹ L'inactivation de la CaMKII est induite par déphosphorylation par les PP1 et PP2A.⁵⁰² La CaMKII existe sous plusieurs isoformes (α , β , γ , δ) et leur expression diffère selon leur localisation. Les formes α et β sont prédominantes dans les neurones et les formes γ et δ dans le cœur avec une expression plus importante de δ (2.5 fois supérieur à γ).^{503,504}

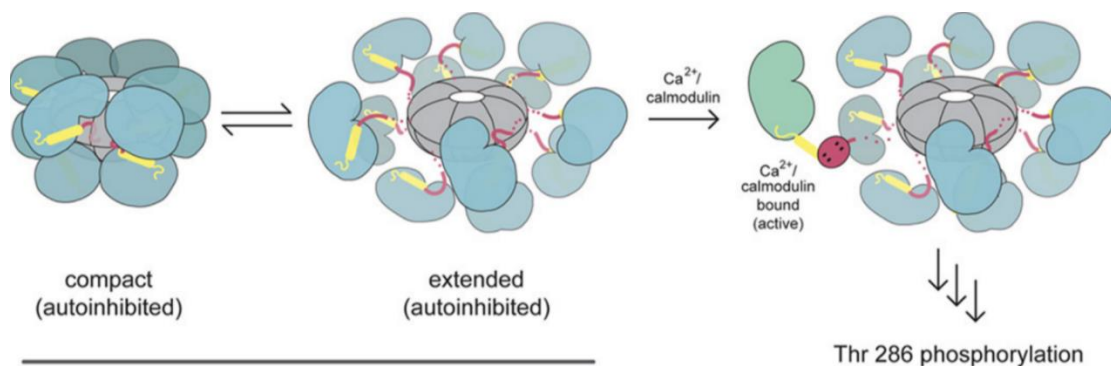


Figure 32- Représentation schématique de la structure de la CaMKII (Chao et al.,2011)

La CaMKII phosphoryle également le RyR2 notamment sur les sérines S2808 et S2814.⁴⁹⁴ La phosphorylation de ce récepteur induit l'ouverture prolongée du RyR2 et conduit ainsi à des fuites importantes de Ca^{2+} du RS.^{505,506} L'inhibition pharmacologique de la CaMKII réduit significativement l'activité du RyR2 en réduisant la fréquence de Ca^{2+} sparks dans des cardiomyocytes ventriculaires.^{505,507} Ainsi, la génération d'un modèle murin ne pouvant être phosphorylé sur le site S2814 (S2814A) a permis l'étude de l'implication de la CaMKII dans l'activité automatique du NSA et de la réponse β -adrénergique. Cependant, l'ablation de cette phosphorylation n'altère pas la réponse β -adrénergique in vivo ainsi que l'activité automatique des cellules sinusales.⁵⁰⁸

Contrairement au site S2808, le site S2814 contribue notablement au mécanisme pathologique de l'IC.⁵⁰⁹ Le rôle prépondérant de la CaMKII dans l'IC a notamment été mis en évidence à l'aide de modèles de lapin déficients en CaMKII et de modèles murins S2814A soumis à une constriction transverse aortique (TAC). En effet, la phosphorylation de S2814 augmente la probabilité d'ouverture du RyR2 conduisant à une augmentation des libérations de Ca^{2+} diastoliques du RyR2 et ainsi à une réduction de la charge Ca^{2+} du RS.⁵¹⁰ En effet, ces modèles S2814A ne démontrent pas d'altération de la charge Ca^{2+} du RS et sont donc protégés des conséquences liées à une IC.^{511,512} Cette augmentation de l'activité du RyR2 par phosphorylation CaMKII-dépendante est notamment dû à une réduction de l'affinité de la CaM pour le RyR2 et conduit à un changement conformationnel du canal favorisant les libérations diastoliques de Ca^{2+} .⁵¹³ La phosphorylation de S2814 contribue ainsi à l'apparition d'épisodes d'arythmies ventriculaires. En effet, des modèles murins S2814D ont démontré des tachycardies ventriculaires soutenues voire des épisodes de mort subite à la suite d'une stimulation β -adrénergique (Epinéphrine/caféine) ou électrique.⁵¹² Par ailleurs, un élargissement des dyades et une réorganisation des clusters de RyR2 sur des cardiomyocytes ventriculaires isolés de modèles S2814D suggère un lien direct entre la phosphorylation du RyR2 et sa microarchitecture.³¹²

V.2.3 Autres sites de phosphorylation du RyR2 et concept de « phosphorylation hotspot »

Malgré les avancées scientifiques concernant la phosphorylation du RyR2, l'implication des différents sites de phosphorylation dans la fonction cardiaque et notamment dans la réponse β -adrénergique n'est cependant pas clairement élucidé. L'existence d'autres sites de phosphorylation non identifiés à ce jour est à prendre en considération afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la phosphorylation du RyR2 et de son activité. En effet, un nouveau site de phosphorylation sur le RyR2 récemment identifié (S2367) est notamment impliquée dans la fibrillation atriale et est phosphorylé par une kinase retrouvée dans les muscles striés (SPEG) pour « striated muscle preferentially expressed protein kinase ». ⁵¹⁴ Cependant, la phosphorylation du RyR2 sur ce site diminue son activité, contrairement aux autres sites cités auparavant. De plus, les patients atteints de fibrillation atriale présentent une réduction des taux de phosphorylation sur S2367 et les modèles murins S2367A démontrent une susceptibilité accrue à développer des fibrillations atriales.⁵¹⁴ Il existerait également un autre site de phosphorylation (S2811), entre les sites S2808 et S2814, phosphorylé par la PKA et la CaMKII mais les mécanismes sous-jacents de ce site restent peu documentés.^{494,515}

Par ailleurs, la modification des taux de phosphorylation des sites voisins dans des modèles murins phosphomutés pourrait mettre en évidence la notion selon laquelle ces sites pourraient interagir entre eux sous la forme d'un « hotspot » de phosphorylation et seraient interdépendants (**Figure 33**).^{516,517} En effet, l'ablation de la phosphorylation de S2808 dans un modèle murin (S2808A) conduit à

l'augmentation significative des taux de phosphorylation de S2030 et S2815 après stimulation β -adrénergique de manière Ca^{2+} -dépendante.⁴⁸⁴ De même, l'ablation de la phosphorylation de S2030 dans un modèle murin (S2030A) induit l'augmentation significative des taux de phosphorylation de S2808 et S2814 à l'état basal uniquement.⁴⁷³

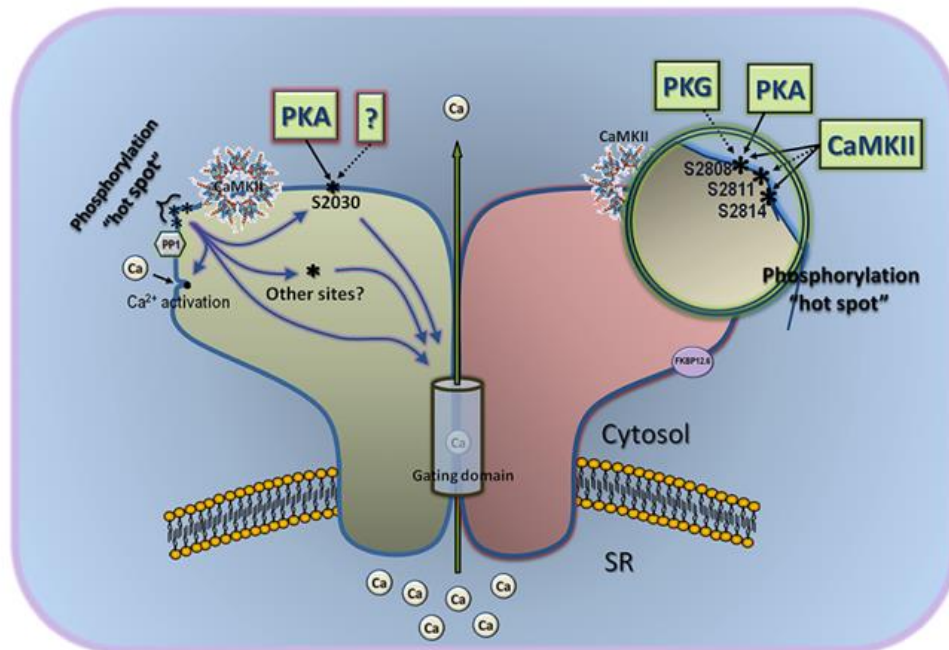


Figure 33- Modèle hypothétique de phosphorylation du RyR2 ; Ce modèle décrit la position et les potentielles interactions entre les sites de phosphorylation identifiés à ce jour. Les sites S2808 et S2814 seraient localisés sur la partie proéminente du RyR2 au sein du « hotspot » et seraient sujet à divers kinases. La phosphorylation de ce hotspot mettrait en évidence un effet à l'unisson de ces sites sur l'activité du RyR2 et notamment sur son domaine centrale formant le pore du canal. Ce modèle prendrait également en compte l'existence d'autres sites de phosphorylation, notamment le site S2030 et d'autres sites non identifiés à ce jour. L'interaction entre les kinases et les sites de phosphorylation sont identifiés par des flèches noires selon les modèles utilisés ; in vivo (flèche pleine) et in vitro (flèche en pointillés). (Camors, Valdivia, 2014)

La co-dépendance de ces sites de phosphorylation peut être notamment étudié à l'aide de modèles génétiquement modifiés sur plusieurs sites de phosphorylation. En effet, dans une étude très récente, un modèle murin ne pouvant être phosphorylable à la fois sur le site S2808 par la PKA et sur le site S2814 par la CaMKII (Double Knock In S2808A/S2814A, DKI) a été généré afin de comprendre le rôle des sites S2808 et S2814 sur la réponse β -adrénergique et notamment l'interdépendance de ces sites avec le site S2030.⁵¹⁸ En effet, ce modèle permet également d'étudier la contribution de la phosphorylation du site S2030 dans la réponse β -adrénergique. Ce modèle DKI ne présente pas d'anomalies morphologiques ou structurelles cardiaques. Cependant, les souris DKI sont plus susceptibles de développer des arythmies ventriculaires que les WT lors d'une réponse β -adrénergique. En effet, les cardiomyocytes ventriculaires isolés des souris DKI présentent une augmentation de libérations spontanées de Ca^{2+} du RyR2 sous forme de Ca^{2+} sparks et waves en condition basale et β -adrénergique.⁵¹⁸ Par ailleurs, ce modèle DKI présente une FC basale plus élevée

que celle des WT, de même en condition β -adrénergique. Ainsi, ces résultats démontrent une interdépendance entre ces sites étant donné que la non-phosphorylation de ces deux sites entraîne des conséquences sur l'activité du RyR2 et induit potentiellement des phénomènes de compensation via la phosphorylation de S2030 ou d'autres sites potentiels non identifiés à ce jour. En effet, la réponse β -adrénergique intact de ce mutant suggère que la phosphorylation sur S2030 est suffisante à une réponse β -adrénergique physiologique.

Cependant, les études sur la phosphorylation du RyR2 concernent majoritairement des modèles de cardiomyocytes ventriculaires issues de modèles murins. En effet, peu d'études ont étudié les effets de ces sites sur le NSA. Il a été démontré que les sites S2808 et S2814 ne sont pas impliqués dans la réponse β -adrénergique du NSA. En effet, les modèles murins S2808A et S2814A présentent une fréquence cardiaque in vivo et une fréquence de battement du NSA similaire aux WT après réponse β -adrénergique suggérant l'implication d'autres sites de phosphorylation.⁵⁰⁸

OBJECTIFS DE LA THESE

L'automatisme des cellules du NSA est régulée par un système de deux horloges couplées : l'horloge dite membranaire qui dépend principalement du courant I_f et l'horloge dite calcique qui dépend principalement des libérations de Ca^{2+} du RyR2. Lors d'une réponse β -adrénergique, l'augmentation des taux en AMPc régule directement les canaux HCN du courant I_f . L'activation plus rapide de ces canaux conduit à l'accélération du rythme cardiaque lors d'un stress, dit effet chronotrope positif de la réponse sympathique. L'augmentation des taux en AMPc active également la PKA qui phosphoryle les canaux impliqués dans l'automatisme des cellules du NSA dont notamment le RyR2. Ainsi, il est reconnu que le RyR2 est phosphorylé par la PKA lors de la réponse β -adrénergique mais les effets de cette phosphorylation restent encore mal compris. Le RyR2 est phosphorylé sur différentes sérines (S) identifiées à ce jour tels que les S2808 et S2030 qui sont des sites PKA-dépendants, et la S2814 qui est un site CaMKII-dépendant. Les sites de phosphorylation S2808 et S2814 ont largement été étudiés dans la littérature et notamment dans les dysfonctions cardiaques mais peu d'études portent sur le site S2030. Mon projet de thèse vise à comprendre les mécanismes de régulation du RyR2 par la phosphorylation sur le site S2030 PKA-dépendant lors de la réponse β -adrénergique.

Mon premier objectif est d'étudier l'effet de la phosphorylation de S2030 lors de la réponse β -adrénergique dans le pacemaker cardiaque et notamment sur le rythme cardiaque dit sinusal. Dans le cadre d'une collaboration financée par la National Institute of Health (NIH) avec l'équipe du Dr. Hector Valdivia à l'université du Wisconsin aux Etats-Unis, j'utilise des modèles murins génétiquement modifiés dont le site S2030 n'est pas phosphorylable par la PKA (S2030A) ou mimétiquement phosphorylé (S2030D) et les modèles contrôles (WT).

Mon deuxième objectif est d'étudier l'effet de la phosphorylation de S2030 dans un modèle arythmique. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Ernst Niggli et Dr. Marcel Egger à l'université de Berne en Suisse, nous nous sommes intéressés à l'effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 dans un modèle murin exprimant une mutation responsable de CPVT (RyR2^{R420Q}). Le modèle utilisé (Souris RyR2^{R420Q/S2030A}) est issu du croisement des souris S2030A avec les souris CPVT RyR2^{R420Q} et ce modèle est comparé avec les souris CPVT RyR2^{R420Q}. En effet, les cardiomyocytes ventriculaires isolés de souris S2030A présentent moins de libérations diastoliques spontanées sous forme de Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves que les souris WT lors d'une réponse β -adrénergique.⁴⁷³ Ces résultats suggèrent ainsi que la phosphorylation de S2030 module la réponse β -adrénergique et que sa réduction pourrait potentiellement réduire les libérations diastoliques spontanées de Ca^{2+} et protéger les modèles CPVT de la survenue d'arythmies ventriculaires lors d'un stress.

Chapitre 2 MATERIELS ET METHODES

I. Conception des modèles génétiquement modifiés

Afin de comprendre le rôle de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 dans la fonction cardiaque et notamment lors de la réponse β -adrénergique, nous avons utilisé des modèles murins génétiquement modifiés générés par l'université du Wisconsin dans le cadre d'une collaboration franco-américaine financée par la National Institute of Health (NIH). Afin de déterminer l'implication du site Sérine 2030, deux lignées de modèles murins ont été générées par recombinaison homologue soit par substitution de la sérine (S) par une alanine (A) afin d'empêcher la phosphorylation du site, soit par substitution de la sérine (S) par un acide aspartique (D) afin de mimer constitutivement sa phosphorylation. La recombinaison homologue est une technique de biotechnologie permettant d'introduire des modifications précises dans le génome d'un organisme. Cela consiste premièrement à la conception d'un vecteur de recombinaison conçu pour contenir la séquence génétique d'intérêt et des marqueurs de sélection qui reconnaîtront les cellules à intégrer. Ce vecteur est ensuite introduit dans les cellules embryonnaires de l'animal par électroporation ou micro-injection. Ces cellules sont ensuite cultivées et sélectionnées selon l'expression de la modification génétique souhaitée. Les cellules embryonnaires sélectionnées sont enfin injectées dans des embryons en développement (blastocytes) qui seront implantés dans des femelles porteuses.

Afin de générer ces lignées, une séquence génétique contenant le gène RYR2 est dérivée d'une lignée de souris Sv129/Sv et modifiée afin de substituer la sérine (S) par une alanine (A) ou un acide aspartique (D) afin de générer les lignées S2030A et S2030D respectivement. La séquence génétique modifiée et le marqueur de sélection résistant à la néomycine, un antibiotique de la famille des aminosides (cassette NEO) est ensuite incorporé dans un plasmide par recombinaison homologue. Le plasmide est ensuite introduit par électroporation dans des cellules embryonnaires murines. Les cellules sont cultivées puis sélectionnées par incubation avec de la néomycine afin de sélectionner les cellules résistantes à la néomycine. Les cellules exprimant la mutation d'intérêt préalablement identifiées par Southern Blot sont ensuite injectées dans des blastocytes de souris C57BL/6 qui sont implantés dans des femelles porteuses. Les souris hétérozygotes, issue du croisement des chimères avec des souris C57BL/6, sont ensuite croisées avec des souris 129Sv WT afin de maintenir les lignées.

Dans ce projet, les animaux homozygotes S2030A et S2030D mâles et femelles âgées de 3-6 mois sont utilisés et comparés avec les souris WT issues des mêmes lignées. Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique local (Apafis #44242). Toutes les expériences sont réalisées conformément à la

directive européenne 2010/63 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et à sa transposition dans le droit français (décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1^{er} février 2013). Les autorisations nécessaires sont délivrées par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur après avis du comité d'éthique local (CEEA n°26). Les souris sont hébergées au sein de la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » (AnimEx) de l'IPSIT (Faculté de pharmacie, Orsay), plateforme agréée par le ministère de l'Agriculture (Numéro agrément N° B91-471-109). Les souris sont hébergées en cycle non inversé jour/nuit de 12h, respectivement de 7h à 19h et de 19h à 7h et ont un accès *ad libitum* à la nourriture et de l'eau.

II. Génotypage des lignées S2030A et S2030D

Afin d'identifier les génotypes de ces modèles, nous utilisons les surplus de tissus après identification des souris par poinçonnage d'oreilles. Les 3 principes de cette technique (extraction d'ADN, amplification de l'ADN réaction de polymérisation en chaîne et électrophorèse) sont détaillés ci-dessous.

Afin d'extraire l'ADN, les tissus sont incubées séparément dans 300 µL d'une solution d'hydroxyde de soude (NaOH) à une concentration de 50 mM à 95°C pendant 1h. Afin de stopper la réaction chimique, 25 µL de trisaminométhane chlorhydrate (TrisHCl) à une concentration de 1 M au pH ajusté à 8 sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13 200 rpm à 4°C pendant 5 minutes et l'ADN extrait réside dans le surnageant.

Les doubles brins d'ADN sont composés de paires de bases Adénine-Thymine (A-T) et Guanine-Cytosine (G-C) stabilisés entre eux par des liaisons hydrogènes. Afin d'amplifier l'ADN, nous utilisons une technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette technique permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie et est composée de 3 grandes étapes : dénaturation, hybridation et élongation de l'ADN.

Lors de la dénaturation, les liaisons hydrogènes sont rompues et les brins d'ADN se séparent à une température élevée (80-95°C). Ainsi, cette séparation des doubles brins d'ADN en simples brins permet, à une température plus basse (50-65°C), la fixation des amorces aux fragments d'ADN, étape dite d'hybridation. Ces amorces sont composées d'une séquence d'acides nucléiques spécifiques à la séquence d'ADN d'intérêt. Afin de synthétiser une nouvelle séquence d'ADN, l'ADN polymérase contenue dans le mélange de réactifs se fixe aux amorces et assemble les nucléotides complémentaires à une température d'élongation de 72°C. Ainsi, il faut plus de 20 cycles afin d'obtenir une amplification importante de la séquence d'ADN cible.

Dans cette réaction, chaque échantillon d'ADN (1 µL pour chaque échantillon) est incubé dans un mélange réactionnel contenant un tampon de PCR Dream Taq Green Buffer, Thermo Scientific contenant l'ADN polymérase (Taq Polymérase) et les bases nucléiques libres (dNTP), les amorces spécifiques (**Tableau 4**) et de l'eau ultrapure. Le tampon de PCR est composé de chlorure de magnésium à une concentration de 20 mM afin d'optimiser l'activité de l'ADN polymérase en stabilisant le complexe catalytique de cette enzyme. Ce tampon inclut également un réactif de densité permettant le chargement direct de produits PCR sur un gel et de deux colorants de suivi afin de suivre la progression de l'électrophorèse (un colorant bleu qui migre avec des fragments d'ADN de 10 paires de base (bp) dans du gel agarose de 1% et un colorant jaune qui migre plus rapidement que les fragments d'ADN de 10 bp dans du gel agarose de 1%).

Les volumes des mélanges réactionnels des lignées S2030A et S2030D diffèrent et sont détaillés ci-dessous (**Tableau 2 et 3**) :

Tableau 2-Composition du mélange réactionnel de PCR des lignées S2030A (Volume final 20 µL)

Solutions	Volumes (µL)
Dream Taq Green Buffer	10
Eau Ultrapure	8.6
Amorce Forward (2030-for-2)	0.2
Amorce Reverse (2030-rev-2)	0.2

Tableau 3-Composition du mélange réactionnel de PCR des lignées S2030D (Volume final 20µL)

Solutions	Volumes (µL)
Dream Taq Green Buffer	10
Eau Ultrapure	8.8
Amorce Forward (ex40.F.1.6N.ILTS)	0.1
Amorce Reverse (ex40.R.1.ILTS)	0.1

Tableau 4-Séquence des amorces pour le génotypage des lignées WT, S2030A et S2030D

S2030A	Amorce Forward (2030-for-2)	5'GTT CCC AGC TAT GTA CTG 3'
	Amorce Reverse (2030-rev-2)	5' GCA TTG ACT TAA GAA GCT TAT CC 3'
S2030D	Amorce Forward (ex40.F.1.6N.ILTS)	5' AGG TGC TTG AGG CTT CTC TGG 3'
	Amorce Reverse (ex40.R.1.ILTS)	5' CCT CCA CAG CAC AGC TAC CTC TC 3'

Afin d'éviter l'amplification de séquences non spécifiques, nous avons optimisés les conditions d'amplification des lignées S2030A et S2030D détaillés ci-dessous (**Tableau 5 et 6**) :

Tableau 5-Programme PCR pour la lignée S2030A

Température	Temps	Cycles
95°C	5 min	1
95°C	30s	34
55°C	45s	34
72°C	45s	34
72°C	7min	1

Afin d'identifier les génotypes de la lignée S2030A, un programme de PCR classique est utilisé (**Tableau 5**). Ce programme est constitué de 5 étapes (initiation, dénaturation, hybridation, élongation, élongation finale) répétés pendant 34 cycles. Détaillés ci-dessous :

1) Initiation. Cette étape est nécessaire à l'activation de l'ADN polymérase et la température et durée de cette étape est dépendante de l'enzyme utilisée. Ici, nos échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes.

2) Dénaturation. Elle intervient à chaque début de cycle. En soumettant les échantillons à une température élevée (80-95°C), la rupture des liaisons hydrogènes permet la séparation des doubles brins d'ADN en simples brins. Ici, les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 30 secondes.

3) Hybridation. La fixation des amorces sur les séquences d'ADN d'intérêt lors de cette étape dépend de la température et est compris entre 50-65°C. En effet, la température d'hybridation doit être assez

basse pour permettre la fixation des amorces mais assez élevée pour former des séquences répliquées assez stable. Ici, les échantillons sont soumis à une température de 55°C pendant 45 secondes.

4) Elongation. Cette étape permet à l'ADN polymérase de synthétiser la séquence d'ADN cible selon une température comprise entre 72-80°C dépendante de l'enzyme utilisée. Dans notre cas, nous utilisons la Taq polymérase active à une température de 72°C pendant 45 secondes.

5) Elongation finale. Cette étape permet de s'assurer que les brins d'ADN sont conformément répliqués et sous forme de doubles hélices. Les échantillons sont soumis à une température de 72°C pendant 7 minutes.

Après avoir testé le même protocole pour la lignée S2030D, l'apparition de bandes non spécifiques nous a conduits à optimiser le programme d'amplification d'ADN de la lignée S2030D. Afin d'identifier les géotypes de la lignée S2030D, un programme de PCR par essai dit « Touchdown » est utilisé.

La PCR par essais est un protocole qui vise à augmenter la spécificité des amorces pour les séquences d'ADN cible lors de la phase d'hybridation précédemment décrite. Les grandes étapes restent les mêmes mais la particularité de ce programme réside dans la phase d'hybridation. Une fois que la séquence d'intérêt devient majoritaire vis-à-vis de ses compétiteurs, la température d'hybridation est progressivement abaissée afin d'assurer une meilleure efficacité de PCR. Dans notre cas, la température d'hybridation initiale est de 70°C et est réduite d'un degré Celsius à chaque cycle (17 cycles). A la suite de l'élongation, un programme de PCR classique est induit afin de permettre l'amplification des séquences d'ADN cible en quantité suffisante. Les détails de ce programme sont décrits ci-dessous (**Tableau 6**) :

Tableau 6-Programme PCR pour la lignée S2030D

Température	Temps	Cycles
95°C	5 min	1
95°C	30s	17
70°C (-1°C à chaque cycle)	30s	17
72°C	45s	17
95°C	30s	34
52°C	45s	34
72°C	45s	34
72°C	7 min	1

A la suite de la PCR, les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose (Euromedex) à 1% dans du tampon de migration TAE 1X afin de vérifier uniquement l'amplification des séquences d'ADN. En effet, les échantillons seront ensuite soumis à une digestion enzymatique spécifique afin de distinguer les souris Wild-type, les hétérozygotes et homozygotes de ces mêmes lignées. Afin de visualiser les fragments d'ADN, un colorant fluorescent, GelRed (0.02%) est ajouté dans le mélange préalablement chauffé aux micro-ondes jusqu'à obtenir un mélange homogène et transparent. Le tampon de migration TAE permet une meilleure migration de l'ADN du fait de sa composition en Tris-acétate (maintien d'un pH constant), d'acide acétique et d'EDTA (chélateurs de cations divalents ; précipitation de l'ADN). Une fois le gel constitué et solidifié à température ambiante, il est placé dans un système de bain d'électrophorèse immergé dans du TAE 1X. Un marqueur de taille de 100 bp (ThermoScientific) est déposé dans le premier puit.

Seulement 9 μ L d'échantillons sont chargés dans le gel afin d'obtenir une quantité restante suffisante à la digestion enzymatique des échantillons. L'électrophorèse est réalisée à 150V pendant 1h30. Les bandes sont ensuite visualisées par transmission UV. Une fois la confirmation de la bonne amplification de notre échantillon par la présence d'une seule bande, le volume restant est incubé avec une enzyme de restriction issue de E.Coli (BsmAI 5000 u/mL, R0529S, NEB manufacturer) afin de d'identifier les souris non-mutés (WT) des souris mutés (hétérozygotes et homozygotes). Cette enzyme de restriction est associée à un tampon rCutSmart 10X. Les échantillons sont ensuite incubés à 55°C pendant 12h afin d'optimiser l'activité enzymatique puis 85°C pendant 20 minutes afin de stopper la réaction enzymatique. La composition du mélange enzymatique pour les lignées S2030A et S2030D (volume final de 30 μ L) est décrit ci-dessous (**Tableau 7**) :

Tableau 7-Composition du mélange enzymatique des lignées S2030A et S2030D (Volume final 30 μ L)

Solutions	Volumes (μL)
Eau ultrapure	15
Enzyme de restriction (BsmAI)	1
Tampon de restriction (rCutSmart) 10x	3
ADN amplifié	11

A la suite de la digestion enzymatique, les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose (Euromedex®) à 1% dans du tampon de migration TAE 1X afin cette fois d'identifier les géotypes des lignées. Le procédé de migration et de révélation des bandes est décrit précédemment. Pour la lignée S2030A, les

souris WT sont identifiées par deux bandes de 186 bp et 140 bp, les hétérozygotes par trois bandes de 326 bp, 140 bp et 186 bp et les homozygotes par une bande de 326 bp. Pour la lignée S2030D, les souris WT sont identifiées par deux bandes de 256 bp et 201 bp, les hétérozygotes par trois bandes de 457 bp, 256 bp et 201 bp et les homozygotes par une bande de 457 bp.

III. Exploration fonctionnelle *in vivo* par télémétrie des modèles WT, S2030A et S2030D

L'électrocardiogramme (ECG) est enregistré par technique de télémétrie sur souris conscientes afin d'étudier le rôle de la phosphorylation sur S2030 du RyR2 sur le rythme cardiaque dit sinusal, sur la réponse β -adrénergique ainsi que la susceptibilité de ces modèles à présenter des arythmies.

III.1. Implantation des capteurs de télémétrie et protocoles d'enregistrement

Afin d'enregistrer l'ECG sur souris libres de mouvement et conscientes, les animaux sont implantés d'un capteur sous-cutané (ETA F-10, Data Science International). Ces capteurs reçoivent et transmettent les informations par fréquence radio à une plateforme réceptrice située sous la cage qui, à son tour, transmet le signal à un logiciel (Ponemah[®], Data Science International). Cette matrice convertit le signal analogue en signal digital. Ce système permet l'enregistrement des ECG en continu.

Avant l'implantation des capteurs de télémétrie, ceux-ci sont stérilisés en amont. Les appareils sont immergés pour un temps minimum de 4h dans une solution détergente enzymatique (Tergazyme[®], Sigma Aldrich) à température ambiante afin d'éliminer tous résidus de tissus issus de souris précédemment implantés. Puis les appareils sont rincés à l'eau ultrapure et immergés dans une solution stérilisante à froid (Actril[®]) pour temps minimum de 6h à température ambiante. Une fois les capteurs rincés dans une solution saline trois fois, les résidus d'Actril[®] sont détectés à l'aide de bandelettes utilisées pour la détection semi quantitative de l'acide péricétique contenue dans l'Actril[®]. Les capteurs sont ensuite séchés à l'air libre dans un environnement stérile.

24h avant l'implantation des capteurs, une solution d'antalgique dans l'eau de boisson (Ibuprofène, 0.5 ml pour 100 ml d'eau, 5 mg/kg) est administrée à des souris mâles et femelles âgées de 4 à 6 mois afin de limiter la douleur causée par la chirurgie. L'implantation se fait sous anesthésie générale (2.5% d'isoflurane dans 1L/min d'oxygène pour l'induction de l'anesthésie puis 1.5 % d'isoflurane dans 1L/min d'oxygène pour le maintien de cette anesthésie). Afin de maintenir une température stable lors de la chirurgie, l'animal est placé sur une plaque chauffée en continue à 37°C et sa température corporelle est surveillée à l'aide d'une sonde thermomètre rectale. Un gel ophtalmique (Ocrygel[®], TVM) est appliqué sur les yeux de l'animal afin de limiter l'inconfort oculaire lié à l'anesthésie générale.

Après épilation, le capteur de télémétrie (DSI PhysioTel, ETA-F10) stérile est introduit en sous cutané après incision de la peau entre les deux scapulas de l'animal. Le capteur est implanté sur la face dorsale et deux autres incisions sont réalisées sur la face thoracique de l'animal afin de suturer l'électrode négative du capteur au muscle pectoral de l'animal et l'électrode positive à 1 cm de l'appendice xiphoïde du sternum par du fil résorbable 7.0 (**Figure 34**). Les trois incisions cutanées sont ensuite suturées par du fil de soie 6.0 et de la bétadine est appliquée afin de désinfecter les cicatrices. La procédure chirurgicale dure en moyenne 30-40 minutes par animal. A la fin de la procédure, les animaux sont surveillés quotidiennement et une solution d'anti-inflammatoire dans l'eau de boisson (Ibuprofène, 0.5 ml pour 100 ml d'eau, 5 mg/kg) est administré 24h post-opération.

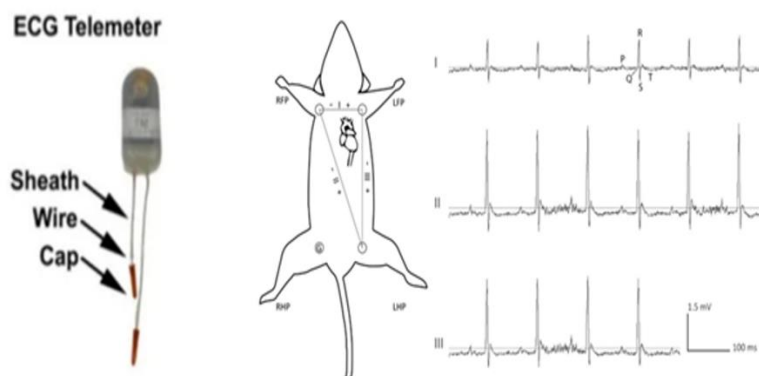


Figure 34-Implantation de capteurs de télémétrie sur souris et exemples de tracés ECG ; à gauche implant de télémétrie (Sheath: gaine, Wire: câble, Cap: embout), à droite localisation sous-cutanée des deux électrodes (négative sur muscle pectoral et positive à 1cm de l'appendice xiphoïde du sternum) et correspondance des tracés ECG selon la dérivation du triangle d'Einthoven. (Adapté de McCauley et Wehrens, 2010 et Steijns et al., 2020)

Après une période minimale d'une semaine post-chirurgie, les animaux sont placés sur les plateformes de télémétrie afin de procéder aux enregistrements ECG. Afin d'étudier les effets de la phosphorylation du RyR2-S2030 sur le rythme cardiaque sinusal, le rythme cardiaque est enregistré pendant 24h. Les animaux sont soumis à un cycle jour/nuit (12 heures de lumière de 8h-20h et 12 heures sans lumière). Les données sont ensuite analysées de sorte de distinguer le rythme cardiaque le jour lors de leur période de repos et la nuit lors de leur période d'activité car ce sont des animaux nocturnes. Lors de l'analyse, la première heure des périodes jour et nuit n'est pas analysée afin de réduire la variabilité du rythme cardiaque lors de leur adaptation jour/nuit.

La fréquence cardiaque intrinsèque est également enregistrée en inhibant le système nerveux autonome par inhibition simultanée du système parasympathique par injection d'atropine (2 mg/kg,

intra-péritonéal), un inhibiteur compétitif des récepteurs muscariniques, et par inhibition du système sympathique par injection de propranolol (2 mg/kg, intra-péritonéal), un antagoniste β -adrénergique non cardiosélectif.

Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation du RyR2-S2030 sur la réponse β -adrénergique, les animaux sont soumis à une stimulation sympathique par injection d'Isoprénaline (ISO) (2 mg/kg, intra-péritonéal), un agoniste β -adrénergique non-sélectif. Afin de déterminer si la phosphorylation du RyR2-S2030 favoriserait les arythmies et celles-ci étant difficile à induire avec l'ISO dans ces modèles, une injection intra-péritonéale d'épinéphrine (2mg/kg) et de caféine (120 mg/kg) est administrée. Avant chaque nouveau protocole, les animaux sont soumis à un temps de repos minimum de 48h afin d'éliminer tout agent pharmacologique précédemment injecté et ainsi réduire toute possibilité d'interactions pharmacologiques. Chaque administration d'agent pharmacologique est précédée d'un enregistrement de l'ECG basal pendant 1h suivie d'un enregistrement continue post-injection de minimum deux heures.

III.2 Analyse des tracés ECG



Figure 35-Tracé représentatif d'un ECG de souris WT en condition basale avec les intervalles PR, RR, QRS et QT

L'activité électrique déclenchée par le nœud sinusal se propage dans les oreillettes droites et gauches et induit la dépolarisation atriale représentée par l'onde P (**Figure 35**). Cette activité se propage ensuite vers le nœud atrio-ventriculaire puis vers les ventricules. L'intervalle PR représente ainsi la durée entre le début de la dépolarisation atriale et la dépolarisation ventriculaire. Cette dépolarisation des ventricules est représentée par le complexe QRS. Enfin, la repolarisation des ventricules est représentée par l'onde T. La fréquence cardiaque (en battements par minutes), les intervalles RR, PR et

QT (en ms) sont mesurées avec le logiciel ecgAUTO (EMKA technologies). Les effets des agents pharmacologiques ont été quantifiés sur l'effet maximal en supprimant le stress lié à la présence de l'expérimentateur ou à l'injection (environ 5 minutes après l'injection).

IV. Exploration fonctionnelle *ex vivo* des modèles WT, S2030A et S2030D

IV.1 Dissection du nœud sinusal

Les souris mâles et femelles âgées de 4 à 8 mois sont anesthésiées par injection i.p de Dolethal (pentobarbital, 100 mg/kg) et de 50U/ml d'héparine pour empêcher la formation de caillots sanguins. Après perte de conscience de l'animal et vérification de réponse aux réflexes, le cœur est rapidement prélevé et placé dans une solution de Tyrode (mM) à 37°C : NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂.H₂O 1,0, MgCl₂ 6H₂O 1.0, HEPES 5, D-glucose 5.5, pH 7.4. La solution de Tyrode est largement utilisée et décrite comme un milieu reproduisant les conditions extracellulaires et intracellulaires afin de mimer la composition ionique et le pH du sang. Le cœur est ensuite placé en position postérieure dans une boîte de pétri à fond siliconé fait maison. Après dissection des ventricules, l'ouverture par incision de l'oreillette droite et des veines caves supérieure et inférieure permettent de mettre en évidence le nœud sinusal (**Figure 36**). Le nœud sinusal est identifié comme un tissu transparent et fin délimité par la crista terminalis et les veines caves. Le nœud sinusal est ensuite nettoyé d'éventuels tissus adipeux afin de mieux visualiser les cellules en microscopie confocale ou de mieux enregistrer l'activité électrique car les tissus adipeux sont des isolants électriques. ⁵¹⁹Pendant toute la procédure, le tissu est régulièrement irrigué avec une solution de Tyrode préalablement chauffé à 37°C afin de maintenir le tissu fonctionnel et battant. Le tissu est ensuite placé dans une chambre optique à fond de verre pour les expériences de microscopie confocale.

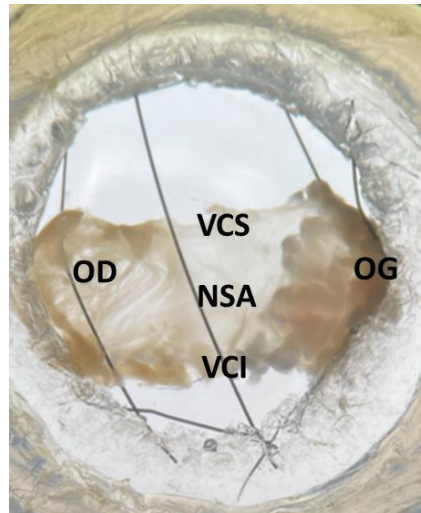


Figure 36-Photo du nœud sino-atrial de souris. OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; NSA : nœud sino-atrial ; VCS : veine cave supérieur ; VCI : veine cave inférieur

IV.2 Etude de la dynamique calcique dans le NSA par microscopie confocale

Afin d'étudier la dynamique calcique dans les cellules du NSA, le NSA est isolé et chargé à l'aide d'une sonde fluorescente calcique Fluo-4-AM (ThermoFischer Scientific) sensible aux ions Ca^{2+} et utilisé afin de visualiser les variations intracellulaires de Ca^{2+} dans la cellule. Le complexe acétoxyméthyl ester (AM) de cette sonde permet au Fluo-4 de traverser la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur, les estérases clivent ce complexe AM et libère le Fluo-4. Une fois le Ca^{2+} lié au Fluo-4, la sonde devient fluorescente à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et émet de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission entre 500 et 650 nm. Le nœud isolé est ainsi chargé avec du Fluo-4-AM dilué dans du DMSO et 20% d'acide pluronique à une concentration de 20 μ M dans du Tyrode. L'acide pluronique permet de limiter l'agrégation du Fluo-4-AM et de mieux faciliter sa perméabilisation dans la cellule. Après incubation pendant 1h sous 37°C, le tissu est placé dans une solution de Tyrode (sans Fluo-4-AM) avec 5 μ M de Blebbistatine (Sigma), un inhibiteur de myosine afin de limiter la contraction du tissu et améliorer l'acquisition des images. Les variations calciques intracellulaires sont acquises par microscopie confocale.

La microscopie confocale est un type de microscopie à fluorescence utilisant un laser pour exciter les fluorophores utilisés pour l'imagerie des cellules ou tissus. Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger un faisceau laser sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Dans ce système, la source lumineuse d'excitation provient d'un laser (Hélium-Néon ou Argon) et est dirigée sur un point précis de l'échantillon. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, une ouverture de filtrage appelée

pinhole (« diaphragme ») est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal. Ainsi, seule la fluorescence du plan focal est captée par le détecteur. (**Figure 37**)

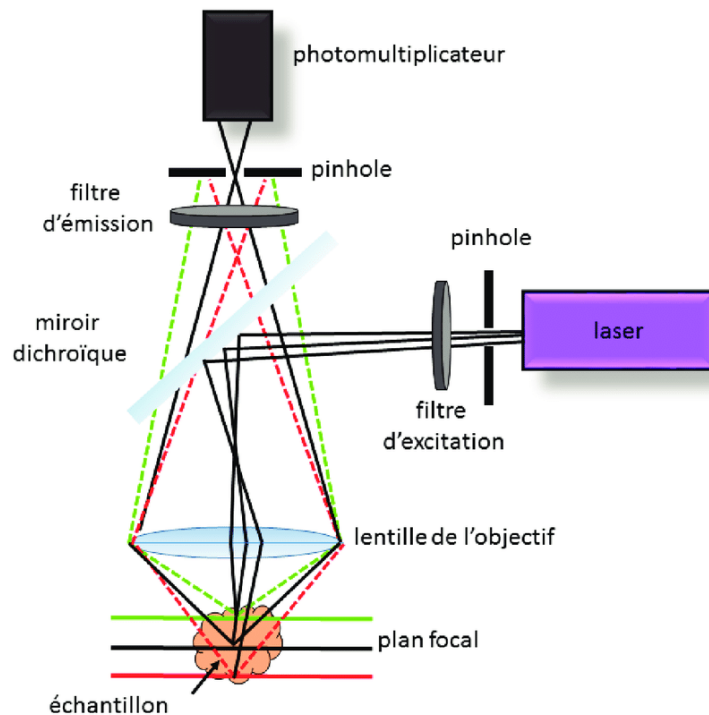


Figure 37-Schéma illustrant le principe d'un microscope confocal à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur et la présence d'une ouverture de filtrage (pinhole) élimine la fluorescence parasite.

Ces images considérées comme des « coupes optiques » peuvent être obtenues à différents niveaux dans l'épaisseur d'un échantillon. L'élément unitaire de l'image confocale est ainsi représenté par le "voxel" (équivalent du pixel en 3D) ; la taille du voxel (X, Y, Z) définit la résolution spatiale de l'image plan (X, Y) et son épaisseur (Z).

Un microscope confocale (Leica SP5 et ZEISS) équipé d'un miroir à vitesse de balayage résonant (8000 Hertz) et d'un laser à lumière blanche fixée à une longueur d'onde d'excitation de 500 nm sont utilisés afin d'acquérir des images des cellules du NSA. Les images des cellules du NSA sont acquises par mode « line scan », c'est-à-dire une ligne de la cellule au cours du temps pendant 20s, en condition basale puis pendant la perfusion d'ISO 20 nM. Les acquisitions en mode « Line scan » permettent d'enregistrer les variations de Ca^{2+} intracellulaires (transitoires, sparks et waves calciques) et de déterminer leurs paramètres caractéristiques. Ces acquisitions se déroulent sous température régulée de 36°C (35-37°C).

IV.3 Analyse de la dynamique calcique dans le NSA

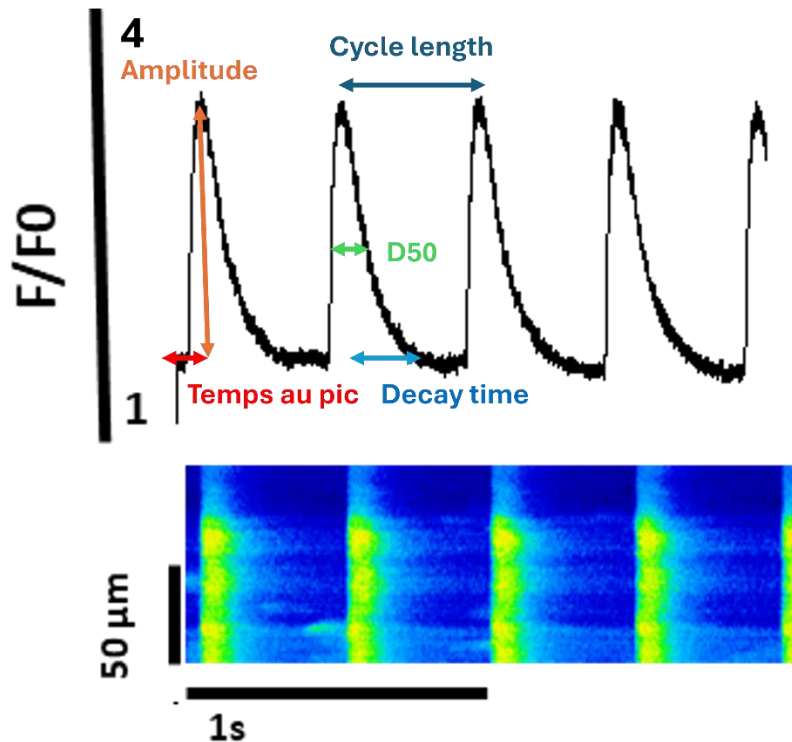


Figure 38- Mesure des caractéristiques des transitoires calciques des cellules sinusales ; Au-dessus de l'image illustrant des transitoires calciques enregistrés sur cellules sinusales se trouve le rapport de fluorescence F/F_0 de ces transitoires et l'illustration des mesures des caractéristiques des transitoires ; l'amplitude (en orange), le temps au pic (en rouge), le cycle length (en bleu foncé), la durée à 50% du pic (D50) (en vert) et le temps de décroissance du transitoire (Decay time) (en bleu clair).

Les images acquises sont ensuite quantifiées via le logiciel IDL à l'aide de programmes élaborées par Ana M Gomez puis les données sont traitées via Origin (version). Les caractéristiques suivantes des transitoires sont quantifiées (**Figure 38**) ; le cycle length (CL, durée entre deux pics de transitoires calciques spontanées, en ms) représentant la fréquence de battement du NSA ; le pic du transitoire dit amplitude F/F_0 (rapport entre F maximale la fluorescence du signal et F_0 la fluorescence sur la période diastolique) correspondant à la libération de Ca^{2+} globale dans la cellule ; le temps au pic (ms) ; la durée à 50% du pic (D50, en ms). Le temps de décroissance du transitoire (decay time, en ms) est également mesuré par ajustement à une fonction exponentielle simple et correspond au retour à l'homéostasie calcique par extrusion du Ca^{2+} hors de la cellule par NCX et recapture calcique vers le RS par SERCA2A entres autres.

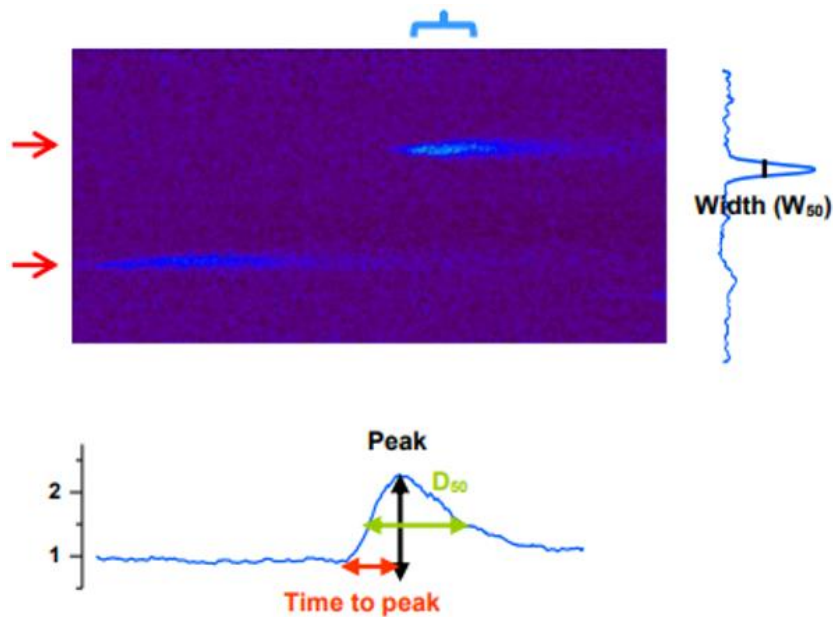


Figure 39- Mesure des caractéristiques des Ca²⁺ sparks ; En haut se trouve une image enregistrée par microscopie confocale illustrant un Ca²⁺ spark. A droite de l'image est représenté le profil de fluorescence du Ca²⁺ spark et la largeur maximale à 50 % du pic (W50). En dessous de l'image se trouve le même profil de fluorescence et les mesures de l'amplitude (peak), du temps au pic en rouge (Time to peak) et de la durée maximale à 50% du pic en vert (D50) (Images issues de la thèse de Y. WANG, 2016 « Ca²⁺ handling in a mice model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, 2016)

Les libérations spontanées diastoliques nommées « Ca²⁺ sparks » sont également enregistrées et les paramètres suivants sont quantifiés (**Figure 39**) ; la fréquence de sparks (nombre de sparks/s/100µm) représentant une estimation de la probabilité d'ouverture de RyR2 ; la largeur maximale à 50% du pic (W50, µm) ; le temps au pic (ms) et la durée maximale à 50% du pic (D50, en ms).

V. Méthodes de biologie et biochimie moléculaire

V.1 Mesure du taux d'expression des protéines des modèles WT, S2030A et S2030D

Afin de mesurer les taux d'expression des protéines d'intérêt, celles-ci sont extraites à partir des NSA et des ventricules des souris mâles et femelles âgées entre 4 à 6 mois puis quantifiées par technique de Western Blot. Les tissus sont prélevés et incubés soit en condition basale (avec seulement du Tyrode) soit en présence d'un agoniste β -adrénergique (ISO 20 nM pour le NSA et 100 nM pour les ventricules) afin de déterminer si les mutations sur le RyR2 altèrent l'expression des protéines d'intérêt lors de la réponse β -adrénergique. Les tissus sont homogénéisés dans un tampon de lyse RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) afin de faciliter l'extraction des protéines et à empêcher la dégradation de celles-ci. Ce tampon de lyse est composé de Tris HCl Ph8, NaCl, NP-40 (Nonidet P-40), SDS (Sodium Dodecylsulfate), DOC (acide sodium deoxycholate), EDTA, d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (**Tableau 8**).

Tableau 8-Composition du tampon de lyse RIPA

	Ci	Cf	Volume final 1mL	Volume final 5 mL
Tris HCl pH 8	1M	50mM	50µL	250µL
NaCl	3M	150mM	50µL	250µL
Inhibiteur de protéases 100X Cocktail Set V, EDTA-Free – Calbiochem n°539137, MERCK	1/100 dilution		10 uL	50uL
Inhibiteur de phosphatases100X Cocktail inhibiteur de phosphatase Halt™, ThermoFischer Scientific	1/100 dilution		10 uL	50 uL
NP40	100%	1%	10µL	50µL
DOC (Sodium deoxycholate acid)	10%	0,50%	50µL	250µL
SDS	10%	0,10%	10µL	50µL
EDTA	0.5 M	2 mM	4 uL	20 uL
H₂O			851 µL	4070 mL

Le Tris HCl permet de mimer les conditions extracellulaires et intracellulaires et de maintenir la stabilité des protéines. Le NaCl contribue aux propriétés ioniques du milieu, facilite la dissolution des membranes et ainsi à l'extraction protéique. Les inhibiteurs de phosphatases et de protéases sont utilisés afin d'empêcher la dégradation des protéines et notamment la déphosphorylation du RyR2 par les phosphoprotéines des sérines / thréonines phosphatases ainsi que les protéines tyrosines phosphatases (PTP) lors de la lyse protéique. Le cocktail d'inhibiteurs de phosphatases contient un mélange de quatre inhibiteurs à spécificité large, dont le fluorure de sodium, l'orthovanadate de sodium, le pyrophosphate de sodium et le bêta-glycérophosphate. Le NP-40 et le DOC sont des détergents non ioniques qui permettent d'isoler les protéines membranaires et de les solubiliser notamment en dissolvant les lipides de la membrane plasmique. Le SDS est un détergent ionique qui rompt les liaisons non covalentes des protéines facilitant ainsi leur dénaturation. L'EDTA est un chélateur de cations qui réduit l'hydrolyse des protéines.

Les tissus sont placés dans des tubes de Bertin avec des billes et du tampon de lyse (50-75 µL pour chaque échantillon) et homogénéisés dans un appareil de Bertin (programme à 6500 rpm, 2*10 secs, 4°C) puis centrifugés à 4°C, 3000 rpm pendant 1 minute.

La concentration des protéines totales des échantillons est mesurée par un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique ou BCA (bicinchoninic acid assay) (Kit de dosage protéique Pierce™ BCA (#23225), Thermo Fisher Scientific™). En milieu alcalin, les protéines contenant trois résidus d'acides aminés ou plus réduisent les ions Cuivres²⁺ en ions Cuivre⁺ au niveau des liaisons peptidiques (réaction de biuret) et conduisent à la formation d'un complexe de couleur bleu pâle. L'acide bicinchoninique

possède la propriété de lier les ions Cu^+ , la liaison de deux molécules de BCA à un ion Cu^+ va alors former un complexe de couleur pourpre à haute température (37 à 60°C) ayant une absorbance à 562 nm. L'absorbance lue par spectrophotométrie est alors proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les échantillons. La concentration exacte est finalement déterminée par rapport à une gamme de dilution en duplicata utilisant du sérum d'albumine bovine (BSA) à différentes concentrations (0 / 1.25 / 2.5 / 5 / 10 / 15 / 20 μg de BSA). Chaque échantillon (2 μL) est dilué dans 98 μL d'eau ultrapure et 100 μL de BCA. Les échantillons sont faits en triplicata. La plaque d'échantillons est ensuite couverte de papier aluminium, incubée à 60 °C pendant 20-30 minutes puis placée dans un spectrophotomètre pour lecture et quantification des échantillons. Une droite est tracée en prenant en compte l'absorbance de chaque concentration de la gamme en ordonnée et leur concentration en abscisse. Puis, via l'équation de la droite, la concentration de chaque échantillon est obtenue grâce à l'absorbance mesurée pour chacun. Une concentration comprise entre 10-20 μg de protéines est utilisée pour quantifier l'expression de nos protéines d'intérêt par technique de western blot.

Cette technique permet la séparation de protéines selon leur poids moléculaire et est constituée de différentes étapes ; la migration des protéines par électrophorèse, le transfert des protéines sur une membrane et enfin la révélation des protéines après marquage par des anticorps spécifiques. Les échantillons sont préparés dans un tampon dénaturant composée de LDS (Lithium dodecylsulfate) et de β -mercaptoéthanol permettant la dénaturation des protéines par coupure des ponts disulfures. De plus, les anions du LDS confèrent à la protéine une charge négative proportionnelle à la taille et permettant ainsi la séparation de ces protéines par électrophorèse. Le tampon de LDS est notamment composé de bleu de Coomassie G250 et du rouge phénol, des colorants permettant de suivre la migration des protéines, et du glycérol afin d'augmenter la densité de l'échantillon et faciliter son dépôt dans le gel d'électrophorèse. Afin de faciliter la dénaturation des protéines, les échantillons peuvent être chauffés. Cependant, la température et sa durée dépendent de la nature de la protéine. Le marquage du RyR2 et des sites de phosphorylations ne nécessitent pas de dénaturation par chaleur des échantillons car la chaleur perturbe la structure tridimensionnelle du RyR2 et altère sa fonction. Le marquage de NCX, SERCA2A et PKA nécessite une dénaturation des protéines à 37°C pendant 10 minutes.

Les échantillons sont ensuite déposés dans un gel d'électrophorèse pré-moulé de polyacrylamide immergé dans un tampon de migration adapté selon le type protéines marqué (NuPAGE™ 3 à 8 % d'acrylamide dans un tampon de migration Tris-acétate ou Novex™ WedgeWell™ 4 à 20 % d'acrylamide dans un tampon de migration Tris-Glycine). Un marqueur de poids moléculaire migre en même temps que les échantillons (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Fisher Scientific™) et sert de référence pour déterminer la taille des protéines d'intérêts. Les protéines

migrent sous l'action d'un champ électrique de 100 volts (V) pendant deux heures. A l'issue de cette migration, les protéines présentes dans le gel sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène) (iBlot™ 2 PVDF Mini Stacks référence IB24002, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™). Cette étape de transfert consiste à l'application d'un courant électrique afin que les protéines du gel se lient à la membrane par des interactions hydrophobes. Le transfert est effectué à l'aide d'un système de transfert à sec (Dispositif de transfert de gel iBlot™ 2 Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™) en 7 minutes sous l'action d'un champ électrique de 20 V (1 min), 23 V (4 min) et 25 V (2 min). Pour vérifier le bon transfert des protéines vers la membrane et pour normaliser l'expression des protéines d'intérêt en fonction de la quantité déposée, une coloration est réalisée pour marquer transitoirement toutes les protéines présentes sur la membrane avec un agent fluorescent à 700 nm (Revert™ 700 Total Protein Stain, Li-Cor®). Cet agent fluorescent peut ensuite être détecté à l'aide d'un système d'imagerie de fluorescence proche de l'infrarouge. La membrane est ensuite rincée dans de l'eau ultrapure puis saturée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente dans une solution contenant 5% de BSA ou de lait écrémé en poudre, selon la protéine d'intérêt, et dans du tampon TBS (Tris Buffered Saline 1X) -Tween 20 (0.1%). En effet, on évitera de saturer les membranes de marquage des sites de phosphorylation du RyR2 avec du lait afin d'éviter toutes interactions avec la caséine kinase.⁵²⁰ Le Tween 20 agit comme un détergent limitant les interactions protéines-protéines non spécifiques. La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps primaires (**Tableau 9**) dirigés contre la protéine d'intérêt, préalablement dilués dans le même tampon de saturation utilisée, pendant la nuit à 4°C sous agitation lente puis rincée avec du tampon TBS-T et incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante sous agitation lente.

Tableau 9-Liste des anticorps primaires et secondaires en western blot

Anticorps primaires	Hôte	Référence	Dilution
RyR2 total	Souris	MA3-916	1/1000 (3% BSA)
RyR2 P-Ser2808	Lapin	A010-30AP	1/2000 (3% BSA)
RyR2 P-Ser2814	Lapin	A010-31AP	1/2000 (3% BSA)
RyR2 P-Ser2030	Lapin	A010-32AP	1/1000 (3% BSA)
SPEG	Lapin	Sino biological 12472-T16	1/500 (3% lait)
NCX	Souris	Swant, R3F1	1/1000 (3% lait)
SERCA2A	Souris	SC-376235, Santa Cruz	1/1000 (3% lait)

Anticorps secondaires	Hôte	Référence	Dilution
IgG anti-lapin	Chèvre	31460 Invitrogen	1/30 000
IgG anti-souris	Chèvre	31430 Invitrogen	1/30 000

L'immunodétection indirecte est basée sur l'utilisation successive de deux anticorps : le premier anticorps primaire reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt via sa partie variable (Fab). Le second anticorps secondaire est lui dirigé contre la partie constante (Fc) de l'anticorps primaire. C'est notamment l'anticorps secondaire qui nous permet de visualiser notre protéine d'intérêt car il est couplé à une enzyme HRP (Horseradish peroxidase) qui produit une réaction lorsque le substrat adéquat est ajouté. Les protéines d'intérêt sont alors révélées après incubation des membranes avec un substrat de la HRP (contenant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du luminol) ; Kit SuperSignal™ West Pico Thermo Fisher Scientific™ pour des protéines exprimées de l'ordre du femtogramme élevé, Kit SuperSignal™ West Dura Thermo Fisher Scientific™ pour des protéines de l'ordre du femtogramme moyen et Kit SuperSignal™ West Femto Thermo Fisher Scientific™ pour des protéines de l'ordre du femtogramme faible). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, le substrat oxydé par la peroxydase émet ainsi un signal lumineux (réaction de chimioluminescence) proportionnel à la quantité de protéines, qui est détecté par un imageur numérique (iBright™ FL1000 Imaging System Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™). Afin de visualiser d'autres protéines d'intérêt sur la même membrane, celle-ci est incubée avec un tampon de déshybridation (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher) pendant 10 minutes à température ambiante puis saturée et incubé avec les anticorps primaires et secondaires comme décrit précédemment. Ce tampon de déshybridation permet de retirer les anticorps secondaires et primaires fixés aux membranes. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel Image J et les données sont traitées sur OriginPro.

V.2 Mesure de l'activité du RyR2 par technique de Radiobinding assay des modèles WT, S2030A et S2030D

La technique de Radiobinding assay permet d'étudier les interactions entre le RyR2 et différents ligands, notamment la ryanodine en fonction des concentrations en Ca²⁺. Cette méthode a été décrite pour la première fois dans les années 60 afin de caractériser les récepteurs hormonaux. Un ligand est marqué avec un isotope radioactif qui est ensuite incubé avec l'échantillon contenant le récepteur cible. Les complexes formés entre le ligand et la cible sont séparés des ligands non liés par filtration et la radioactivité des complexes liés est mesurée à l'aide d'un scintillateur. L'intensité de la radioactivité est ensuite quantifiée et est proportionnelle à la quantité de cible présente dans l'échantillon. Les données

obtenues permettent la caractérisation de paramètres cinétiques et dynamiques tels que la constante de dissociation (Kd) et la capacité de liaison maximale (Bmax).

Afin d'étudier la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} , je mesure les propriétés d'affinité de la ryanodine au RyR2 à partir d'homogénats de cœurs entiers en couplant la ryanodine (ligand naturel du RyR2) avec du tritium radioactif (H^3). La ryanodine tritiée se lie au RyR2 ouvert, et l'ouverture de ces récepteurs dépend de la concentration en Ca^{2+} présent dans le milieu. Plus il y a de Ca^{2+} dans la solution, plus les récepteurs s'ouvrent et se lient à la ryanodine. En effet, l'affinité est mesurée par la capacité de liaison de la ryanodine au RyR2 en fonction des concentrations en Ca^{2+} . Lorsque la concentration en Ca^{2+} est élevée, la ryanodine atteint sa capacité de liaison maximale (Bmax) lorsque le RyR2 ne peut plus s'ouvrir davantage.

Afin de mesurer la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} , la capacité de liaison de la ryanodine tritiée au RyR2 est normalisée par les valeurs obtenues lorsque la ryanodine atteint sa capacité de liaison maximale (Bmax) au RyR2. Les données sont ajustées à une fonction (Hill1) afin de calculer la concentration d'efficacité médiane (EC50) nécessaire pour que la ryanodine se fixe sur le RyR2.

Des souris mâles et femelles âgées entre 4 à 6 mois sont euthanasiées par dislocation cervicale et les cœurs entiers sont prélevés et homogénéisés dans une solution saline contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (fluorure de sodium, l'orthovanadate de sodium, le pyrophosphate de sodium et le β -glycérophosphate) utilisés afin d'empêcher la dégradation des protéines et notamment la déphosphorylation du RyR2 par les phosphoprotéines des sérines / thréonines phosphatases ainsi que les protéines tyrosines phosphatases (PTP) lors de la lyse protéique. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 3 minutes à 3000 rpm puis le surnageant est récupéré et conservé à -80°C.

Les concentrations protéiques sont quantifiées par la technique de dosage de Bradford. Cette méthode de dosage colorimétrique repose sur la capacité du bleu de Coomassie G-250 à se lier spécifiquement aux protéines entraînant un changement de couleur proportionnel à la concentration en protéines de l'échantillon. Le bleu de Coomassie est un colorant anionique qui se lie principalement aux résidus d'acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine) des protéines et qui absorbe à une longueur d'onde spécifique de 595 nm. L'absorbance lue par spectrophotométrie est alors proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les échantillons. La concentration exacte est finalement déterminée par rapport à une gamme de dilution en triplicata utilisant du sérum d'albumine bovine (BSA) à différentes concentrations (0 / 2 / 5 / 10 / 15 / 20 μ g de BSA). Chaque échantillon (1 μ L) est dilué dans 198 μ L d'eau ultrapure et 200 μ L de colorant de Bradford. Les échantillons sont réalisés en triplicata. La plaque d'échantillons est ensuite placée dans un spectrophotomètre pour lecture et quantification des échantillons. Une droite est tracée en prenant en compte l'absorbance de chaque

concentration de la gamme en ordonnée et leur concentration en abscisse. Puis, via l'équation de la droite, la concentration de chaque échantillon est obtenue grâce à l'absorbance mesurée pour chacun. Les volumes d'échantillons incorporés sont calculés pour 100 µg de protéines par tube.

Afin de mesurer l'affinité maximale du RyR2 à la ryanodine, les échantillons sont incubés avec des tampons contenant du KCl 1M, Na-HEPES 20 mM pH 7.4, 16 nM de [³H] ryanodine (NET950, PerkinElmer) et CaCl₂ 10 µM. Afin de mesurer la sensibilité du RyR2 au Ca²⁺, les échantillons sont incubés avec des tampons contenant du KCl 0.2 M, Na-HEPES 20 mM pH 7.4, 6.5 nM de [³H] ryanodine (NET950, PerkinElmer), 1 mM EGTA et différentes concentrations de CaCl₂ entre 100 nM à 100 mM. Le ratio Ca²⁺/EGTA dans ces solutions est calculé par le logiciel MaxChelator (WEBMAXCLITE v1.15; Temperature = 37 °C, pH = 7.4, Ionic = 0.2 N). Les échantillons sont ensuite incubés pendant 2h à 37°C puis filtrés à l'aide de papier filtrant (Whatman GF/B) et rincés trois fois à l'eau distillée dans un collecteur (Brandel M24-R). Les liaisons non spécifiques du RyR2 sont déterminés en présence de 20 µM de ryanodine non tritiée (ALX- 630-062-M005, Enzo Biosciences). Les liaisons entre la [³H] ryanodine et le RyR2 sont quantifiées à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman LS6500) en présence d'un liquide de scintillation (Bio Safe II counting cocktail 111195, RPI Research).

Les résultats obtenus sont ensuite normalisés par les niveaux d'expression de RyR2 obtenus par technique de western blot à partir des mêmes échantillons utilisés à partir d'homogénats de cœurs entiers décrit précédemment. Les données recueillies sont ensuite traitées sur Origin Lab.

VI. Etude de l'effet de S2030 dans un modèle arythmique

Après avoir étudié le rôle de S2030 dans le rythme cardiaque et notamment au sein du nœud sinusal, nous nous sommes intéressés au rôle de la phosphorylation de S2030 dans un modèle d'arythmie ventriculaire. En effet, les cardiomyocytes ventriculaires isolés de souris S2030A présentent moins de libérations diastoliques spontanées sous forme de Ca²⁺ sparks et Ca²⁺ waves que les souris WT lors d'une réponse β-adrénergique.⁴⁷³ Ces résultats suggèrent ainsi que la phosphorylation de S2030 module la réponse β-adrénergique et que sa réduction pourrait potentiellement réduire les libérations diastoliques spontanées de Ca²⁺ et protéger les modèles CPVT de la survenue d'arythmies ventriculaires.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Ernst Niggli et Dr. Marcel Egger à l'université de Berne en Suisse, nous nous sommes intéressés à l'effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 dans un modèle murin exprimant une mutation responsable de CPVT (RyR2^{R420Q}). Le modèle utilisé (Souris RyR2^{R420Q/S2030A}) est issu du croisement des souris S2030A avec les souris CPVT RyR2^{R420Q} et ce modèle est comparé avec les souris CPVT RyR2^{R420Q}.

L'objectif est de caractériser la dynamique calcique des cardiomyocytes ventriculaires isolés de ces modèles lors de la réponse β -adrénergique et de déterminer si la réduction de la phosphorylation de S2030 pourrait potentiellement réduire les libérations diastoliques spontanées calciques pro-arythmogènes des modèles CPVT RyR2^{R420Q}.

VI.1 Isolement des cardiomyocytes ventriculaires des souris RyR2^{R420Q} et RyR2^{R420Q/S2030A}

Les souris mâles âgées de 4 à 6 mois sont injectées avec de l'héparine (400U/ml) 15 minutes avant la dislocation cervicale pour empêcher la formation de caillots sanguins. Le cœur est rapidement prélevé et placé dans une solution de Tyrode sans Chlorure de Ca^{2+} (CaCl_2) (mM) à 4°C : NaCl 140, KCl 5.4, MgCl_2 6H₂O 1.1, HEPES 10, NaH_2PO_4 1, D-glucose 10, pH 7.4. Le cœur est ensuite nettoyé puis canulé par l'aorte descendante sur un système de perfusion selon la méthode de Langendorff par gravité. Dans un premier temps, l'organe isolé est perfusé par du Tyrode maintenue à 37°C afin d'éliminer tout résidues de sang. Ensuite, la digestion enzymatique du cœur est obtenue par perfusion d'une solution composée de protéase XIV (Sigma, P5147-1G, 160U/ml) et de collagénase II (Worthington LS004177, 0.21 U/ml) diluée dans du Tyrode dépourvue de CaCl_2 pendant environ 10 minutes à 37°C, jusqu'à accélération du débit, traduisant de la digestion de la valve aortique. Une fois le cœur digéré, seuls les ventricules sont récupérés et découpés manuellement dans une solution de Tyrode dépourvue de CaCl_2 . Les cellules sont ensuite dispersées par agitation mécanique douce pendant 3 minutes. La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur un filtre de nylon de 100 μm . Enfin, le Ca^{2+} est réintroduit de manière progressive dans le milieu afin de reproduire les conditions calciques physiologiques (1.8 mM CaCl_2) et éviter des dommages cellulaires dû au paradoxe calcique. Le paradoxe calcique se traduit par une hypercontracture des cardiomyocytes dû à une transition brusque des concentrations extracellulaires de 0 à 1.8 mM CaCl_2 sans concentration intermédiaire via l'influx massif de Ca^{2+} dans les cellules par NCX.

VI.2 Etude de la dynamique calcique des souris RyR2^{R420Q} et RyR2^{R420Q/S2030A}

Afin d'étudier la dynamique calcique des cardiomyocytes ventriculaires isolés, celles-ci sont chargées avec une sonde fluorescente calcique Fluo-3-AM (F1242, Invitrogen) sensible aux ions Ca^{2+} et utilisé afin de visualiser les variations intracellulaires de Ca^{2+} dans la cellule. Le complexe acétoxyméthyl ester (AM) de cette sonde permet au Fluo-3 de traverser la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur, les estérases clivent ce complexe AM et libère le Fluo-3 qui a des propriétés fluorescentes lors de sa liaison réversible au Ca^{2+} . Le complexe Fluo3- Ca^{2+} devient fluorescent à une longueur d'onde avec un pic d'excitation de 500 nm et émet de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission entre 510 et 700 nm. Les cardiomyocytes sont ainsi chargés avec du Fluo-3-AM dilué dans du DMSO et 20% d'acide

pluronique à une concentration de 5 μM dans du Tyrode pendant 30 minutes à température ambiante. L'acide pluronique permet de limiter l'agrégation du Fluo-3-AM et de mieux faciliter sa perméabilisation dans la cellule.

Les variations calciques intracellulaires sont visualisées par microscopie confocale (OLYMPUS) en condition basale (Tyrode) et en condition β -adrénergique (ISO 100 nM). Les principes de cette technique sont décrits précédemment en section **Chapitre 2 IV.2**. Les images sont acquises par mode « line scan », c'est-à-dire en coupe longitudinale de la cellule. Les cellules sont déposées dans une chambre reliée à un stimulateur électrique. Un système de perfusion, placé à proximité des cellules, permet le changement de milieu. Les cardiomyocytes ventriculaires sont perfusés en continu avec la solution de Tyrode (mM) ; NaCl 140, KCl 5.4, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,8, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.2, HEPES 10, D-glucose 10, pH 7.4, puis stimulés électriquement à une fréquence de 2 Hz (amplitude de 50 V, durée 5s) afin d'enregistrer les transitoires calciques (**Figure 40**). Une période de non-stimulation d'environ 30s nous permet d'enregistrer les libérations diastoliques spontanées des cardiomyocytes tels que les Ca^{2+} waves pouvant favoriser la survenue d'arythmies ventriculaires.

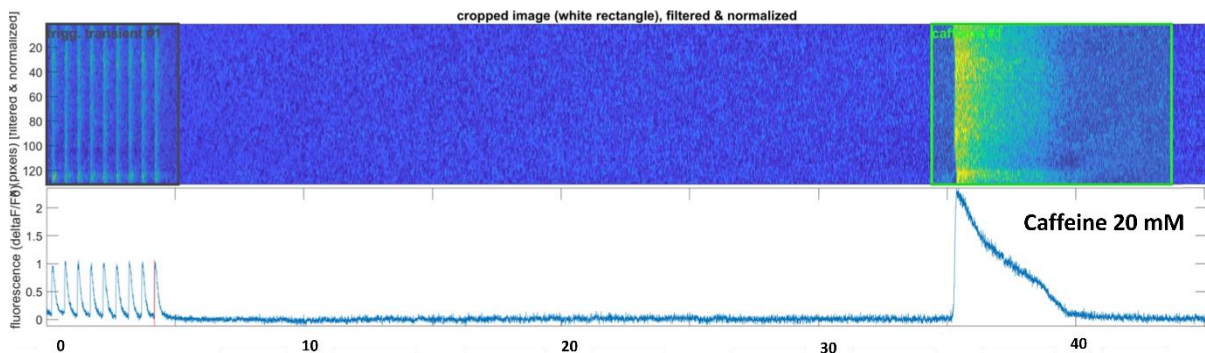


Figure 40- Protocole utilisé pour l'étude de la dynamique calcique des cardiomyocytes ventriculaires des souris $\text{RyR2}^{\text{R420Q}}$ et $\text{RyR2}^{\text{R420Q/S2030A}}$; Les cardiomyocytes ventriculaires sont stimulés électriquement à une fréquence de 2 Hz (amplitude de 50 V, durée 5s) afin d'enregistrer les transitoires calciques. Une période de non-stimulation d'environ 30s nous permet d'enregistrer les libérations diastoliques spontanées des cardiomyocytes tels que les Ca^{2+} waves pouvant favoriser la survenue d'arythmies ventriculaires. Afin de mesurer la charge calcique du RS, une solution de caféine (20 mM) est rapidement perfusée à la fin de la période de non-stimulation.

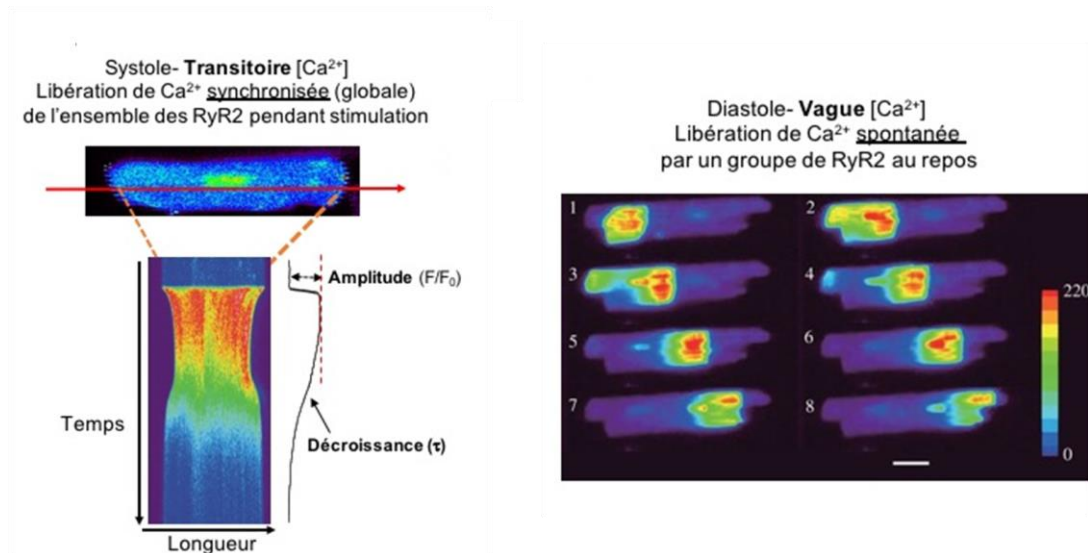


Figure 41- Représentation des libérations de Ca^{2+} dans les cardiomyocytes ventriculaires ; (gauche) Line scan (coupe longitudinale représenté par une flèche rouge) par microscopie confocale d'un cardiomyocyte ventriculaire isolé (souris adulte) couplé à une sonde fluorescente calcique Fluo3AM illustrant un transitoire calcique après stimulation électrique de 1 Hz ; (droite) Images en fonction du temps d'un cardiomyocyte ventriculaire isolé de souris adulte, couplé à une sonde fluorescente calcique présentant des vagues calciques visualisées par microscopie confocale (capturés toutes les 100 ms). L'échelle colorimétrique correspond au niveau de fluorescence du Ca^{2+} intracellulaire.

Afin de mesurer la charge calcique du RS, une solution de caféine (20 mM) est rapidement perfusée aux cardiomyocytes à la fin de cette période de non-stimulation (**Figure 40**). La caféine permet de maintenir les RyR2 à l'état ouvert et ainsi vider le contenu en Ca^{2+} du RS des cellules. Cette mesure de la charge calcique nous permet ainsi d'étudier indirectement l'activité de SERCA2A et sa capacité à recapter du Ca^{2+} vers le RS. Cette libération de Ca^{2+} est visualisée par une augmentation rapide de la fluorescence émise par le Fluo3. Un retour à la fluorescence basal sera ensuite observé toujours en présence de caféine due à l'expulsion du Ca^{2+} hors de la cellule via l'échangeur NCX.

Le rapport entre l'amplitude du transitoire calcique évoqué par stimulation électrique et l'amplitude de la charge calcique du RS évoqué par la caféine permet d'estimer la libération fractionnaire de Ca^{2+} libérée par le RyR2. Cette libération fractionnaire permet ainsi d'évaluer l'effet des mutations sur l'activité du RyR2 et de mieux comprendre les dysfonctionnements associés aux pathologies cardiaques et notamment la CPVT.

Les images acquises sont ensuite traitées via le logiciel MATLAB à l'aide de programmes élaborées par Rado Janicek. Afin d'évaluer l'effet de la réduction de la phosphorylation sur S2030 sur la survenue d'événements pro-arythmogènes de la mutation CPVT, les caractéristiques suivantes des waves calciques sont quantifiées ; Le pourcentage de waves au cours du temps, le temps de latence de l'apparition de la première wave (en ms), l'amplitude et le temps de décroissance (wave tau, en ms).

Les transitoires calciques sont également quantifiés comme décrit précédemment (**Figures 38 et 41**). Les graphiques des données et les tests statistiques sont élaborés via R studio.

VII. Tests statistiques

Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm écart-type de la moyenne (Standard Error of the Mean). Selon les conditions expérimentales et le nombre de groupes à comparer, les différences entre les groupes ont été analysées par analyse « nested » ANOVA à deux voies (génotype et traitement) et trois voies (génotype, traitement et sexe) suivie d'un test post-hoc de Sidak lorsque les interactions génotype : traitement sont significatives à l'aide du logiciel Rkward. Une différence est considérée significative si la valeur p est inférieure à 0.05 avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTATS

Chapitre 3 RESULTATS

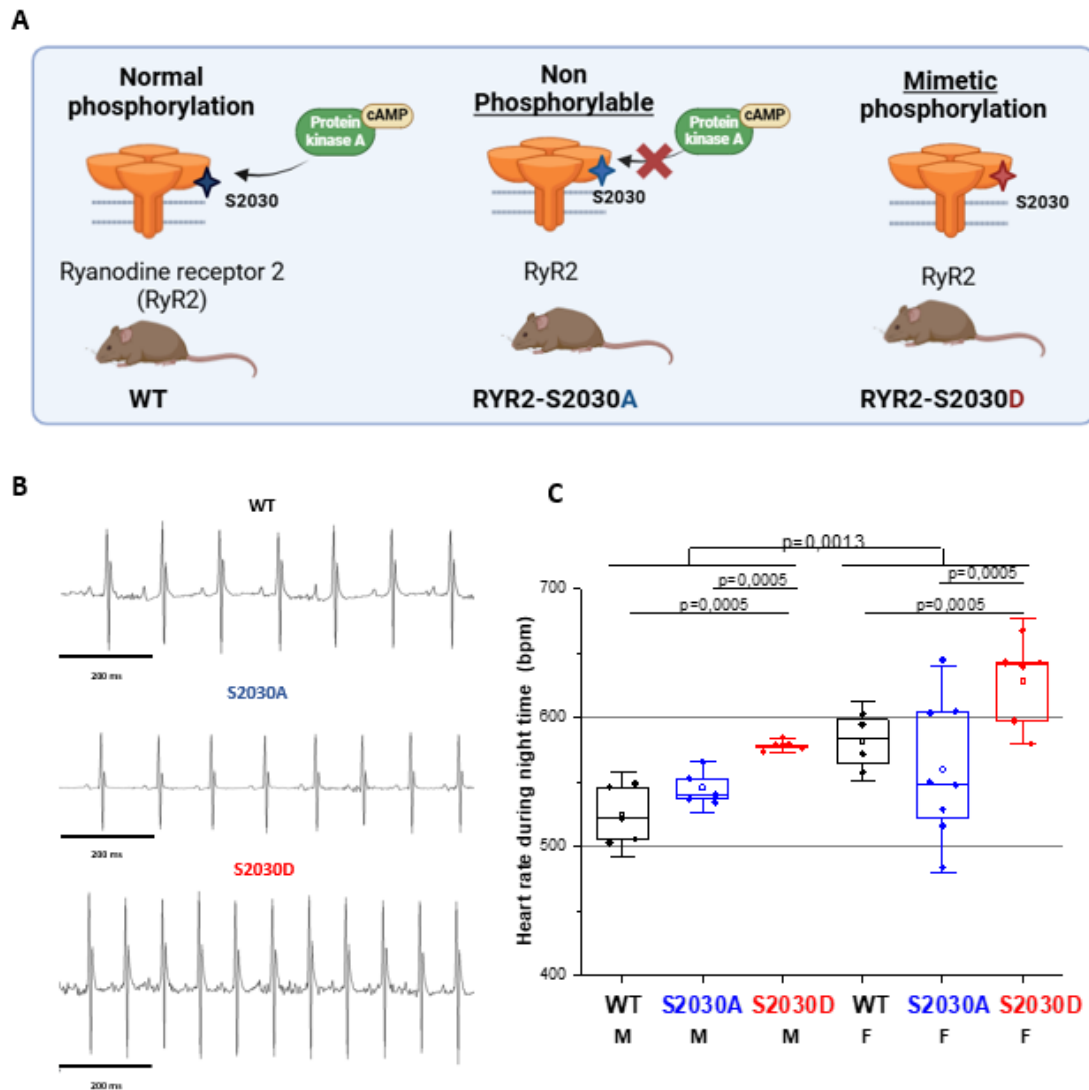


Figure 42-Effet de la phosphorylation de S2030 sur le rythme cardiaque ;

- (A) Représentation schématique des modèles génétiquement modifiés utilisés dont le site S2030 n'est pas phosphorylable par la PKA (S2030A) ou mimétiquement phosphorylé (S2030D) et les modèles contrôles (WT)
- (B) Exemples de tracés ECG lors de la période d'activité (nuit) des modèles, échelle de temps : 200 ms
- (C) Fréquence cardiaque en battements par minute (bpm) durant la nuit, M : Mâle, F : Femelle

I. Rôle de la phosphorylation de S2030 lors de la réponse β -adrénergique

1. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur le rythme cardiaque

Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 lors de la réponse β -adrénergique dans le pacemaker cardiaque, nous avons utilisé des modèles murins génétiquement modifiés dont le site S2030 n'est pas phosphorylable par la PKA (S2030A) ou mimétiquement phosphorylé (S2030D) et les modèles contrôles (WT) (**Fig.42A**). Tout d'abord, nous avons analysé le rythme cardiaque à l'état basal sur les trois modèles. Par ailleurs, le rythme cardiaque étant plus élevée chez les femmes par rapport aux hommes, nous avons étudié séparément la fréquence cardiaque selon le sexe des animaux. Pour cela, nous avons enregistré pendant 24h l'ECG sur animaux éveillés par télémétrie.

Le panneau **B** de la **Figure 42** illustre des exemples de ces tracés des modèles WT, S2030A et S2030D à l'état basal. On observe alors que le rythme cardiaque des S2030D est plus rapide que celui des WT et S2030A. Le panneau **C** de la **Figure 42** représente la fréquence cardiaque (FC) médiane en battements par minute (bpm) enregistré lors de la période nocturne (de 20h à 8h) soit la période active de ces modèles. Les données sur les modèles contrôles sont représentées en noir, les souris S2030A en bleu et les souris S2030D en rouge. Chaque point représente la FC d'un animal (mâles ; WT N=5, S2030A N=5, S2030D N=5 et femelles ; WT N=4, S2030A N=8 et S2030D N=6). De façon générale, la FC des femelles quel que soit le génotype est significativement plus rapide que la FC des mâles ($p=0.0013$). Quel que soit le sexe de l'animal, nous n'observons pas de différence significative entre les WT et les S2030A. Cependant, la FC des S2030D est significativement plus rapide que les souris WT et les S2030A ($p=0.0005$).

Ainsi, ces résultats démontrent que la phosphorylation du RyR2 sur S2030 a un effet sur le rythme cardiaque à l'état basal et suggère que la phosphorylation participe à l'effet chronotrope positif. Afin d'appuyer nos observations, nous avons étudié le rôle de la phosphorylation lors de la réponse β -adrénergique.

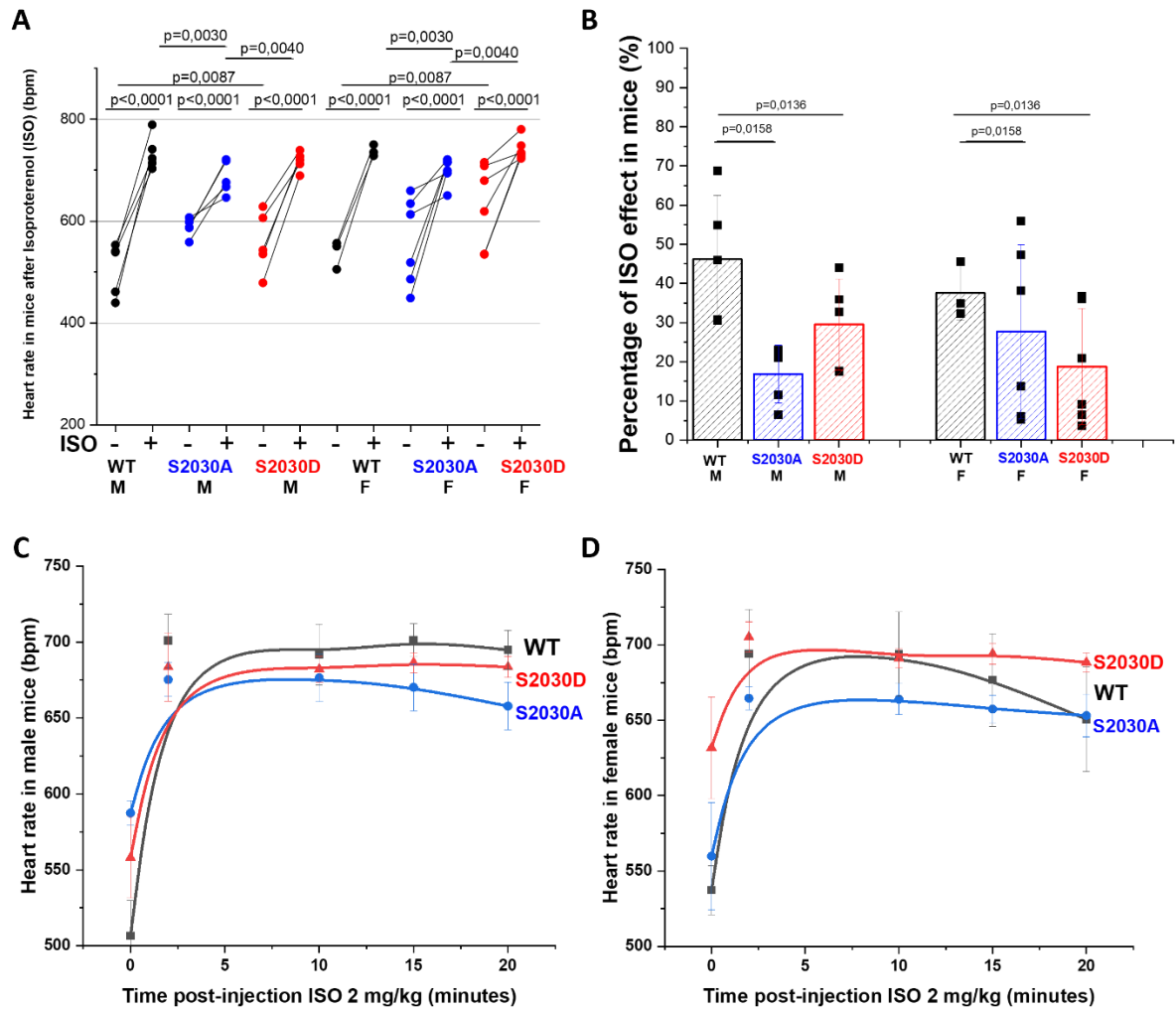


Figure 43-Effet de la phosphorylation de S2030 sur la réponse β -adrénergique in vivo

- (A) Fréquence cardiaque (bpm) avant et après injection d'Isoprénaline (ISO, 2 mg/Kg), agoniste des récepteurs β -adrénergique, M : Mâle, F : Femelle
- (B) Pourcentage d'accélération de la fréquence cardiaque en présence d'ISO
- (C) Réponse β -adrénergique au cours du temps des souris mâles
- (D) Réponse β -adrénergique au cours du temps des souris femelles

2. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur la réponse β -adrénergique in vivo

Afin de déterminer si la phosphorylation du RyR2 sur S2030 est impliquée lors de la réponse β -adrénergique, nous avons enregistré, toujours par télémétrie, les ECG des animaux avant et après injection en I.P d'un agoniste des récepteurs β -adrénergique (Isoprénaline, ISO 2 mg/kg). Les enregistrements ont été effectués sur les mâles et les femelles et les données ont été séparées afin de considérer une différence probable basée sur le sexe de l'animal.

Le panneau **A** de la **Figure 43** représente la FC (bpm) par animal avant et après injection I.P. d'ISO. Chaque point relié représente la FC d'un même animal (mâles ; WT N=5, S2030A N=5, S2030D N=5 et femelles ; WT N=3, S2030A N=6 et S2030D N=6). La FC à l'état basale a été mesurée 10 minutes avant l'injection de l'ISO. La FC maximale en présence d'ISO a été mesurée suivant les 5 premières minutes après l'injection afin de s'assurer de la distribution générale de l'agent pharmacologique dans le système des animaux. Tout d'abord, nous pouvons observer que la FC est significativement accélérée après l'injection de l'ISO dans tous les groupes, quel que soit le génotype ou le sexe ($p < 0.0001$). Ainsi, tous les génotypes sont sensibles à l'ISO. Ceci démontre que la phosphorylation du RyR2 sur S2030 n'est pas indispensable à l'effet chronotrope positif. Cependant, l'effet de l'ISO sur la FC est différent selon les génotypes. En effet, quel que soit le sexe de l'animal, la FC en présence d'ISO est significativement moindre chez les S2030A comparée aux WT ($p = 0.0030$) et aux S2030D ($p = 0.0040$). De plus, la FC à l'état basal des S2030D est significativement plus élevée que celle des WT ($p = 0.0087$). Par ailleurs, nous n'observons pas de différences significatives entre les mâles et les femelles. En effet, nous avons observé une différence liée au sexe de la FC lors de la période d'activité des souris soit la nuit (**Fig.42C**). Ici, les mesures ont été faites la journée soit la période nocturne des modèles. Ainsi, ces résultats suggèrent que la réponse β -adrénergique est diminuée chez les souris S2030A par rapport aux WT et aux S2030D sans différence selon le sexe de l'animal lors de la période nocturne des animaux.

Afin de mesurer l'effet de l'ISO sur ces modèles, nous avons calculé le pourcentage d'accélération de la FC en présence d'ISO (rapport entre la FC en condition basale sur la FC en condition ISO multiplié par 100) représenté dans le panneau **B** de la **Figure 43**. La FC moyenne des WT est accélérée de 45% chez les mâles et de 40 % chez les femelles après ISO. Nous n'observons pas de différences significatives entre les mâles et les femelles chez les WT. Cependant, l'effet ISO chez les S2030A et S2030D est significativement inférieur par rapport à celui des WT (WT-S2030A ; $p = 0.0158$ et WT-S2030D ; $p = 0.00136$). En effet, la FC moyenne des S2030A est accélérée de 15% chez les mâles et de 28% chez les femelles et celle des S2030D de 30% chez les mâles et de 20% chez les femelles. Les différences entre les mâles et les femelles ne sont pas significatives. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'ISO a un effet moindre chez les S2030A et les S2030D par rapport aux WT. En effet, l'effet moindre de l'ISO sur

les S2030D seraient notamment dû à la FC plus élevée des S2030D à l'état basale par rapport aux WT ($p=0.0087$) (cf. **Fig.43A**).

Les panneaux **C** (mâles) et **D** (femelles) de la **Figure 43** représentent la réponse β -adrénergique des modèles au cours du temps. En effet, la FC est mesurée à l'état basale (10 minutes avant l'injection d'ISO) et à différents moments de l'enregistrement en présence d'ISO (2, 10, 15 et 20 minutes après injection). Ces panneaux nous permettent de visualiser la phase de plateau de la réponse β -adrénergique dans chaque groupe et l'évolution de cette réponse au cours du temps. Dans le panneau **C (Fig.43)**, nous pouvons observer chez les mâles qu'à 10 minutes post-injection la réponse β -adrénergique des S2030A est diminuée par rapport aux WT et aux S2030D. De plus, 20 minutes après injection d'ISO, la réponse β -adrénergique des S2030A tend à diminuer davantage au cours du temps contrairement aux WT et S2030D dont la réponse augmente davantage.

Dans le panneau **D (Fig.43)**, chez les femelles, on observe qu'à 10 minutes post-injection d'ISO cette différence de réponse entre les S2030A et les WT est plus distincte. En effet, la réponse β -adrénergique des S2030A est diminuée par rapport aux WT et aux S2030D. Nous pouvons également observé qu'à partir de 10 minutes, la réponse β -adrénergique des WT femelles diminue progressivement contrairement aux S2030D femelles. Cependant, la réponse des S2030D reste élevée au cours du temps par rapport aux S2030A. Par ailleurs, lorsqu'on compare les données des WT mâles et des WT femelles, on observe au bout de 10 minutes une diminution progressive de la réponse β -adrénergique des WT femelles jusqu'à la fin de l'enregistrement contrairement aux WT mâles.

Ainsi, ces résultats démontrent que la réponse β -adrénergique des S2030A est diminuée par rapport aux WT et S2030D. De plus, il semblerait que la réponse β -adrénergique des S2030A est diminuée davantage chez les femelles que chez les mâles. Ainsi, cela démontre que la phosphorylation du site S2030 est essentielle à une réponse β -adrénergique totale.

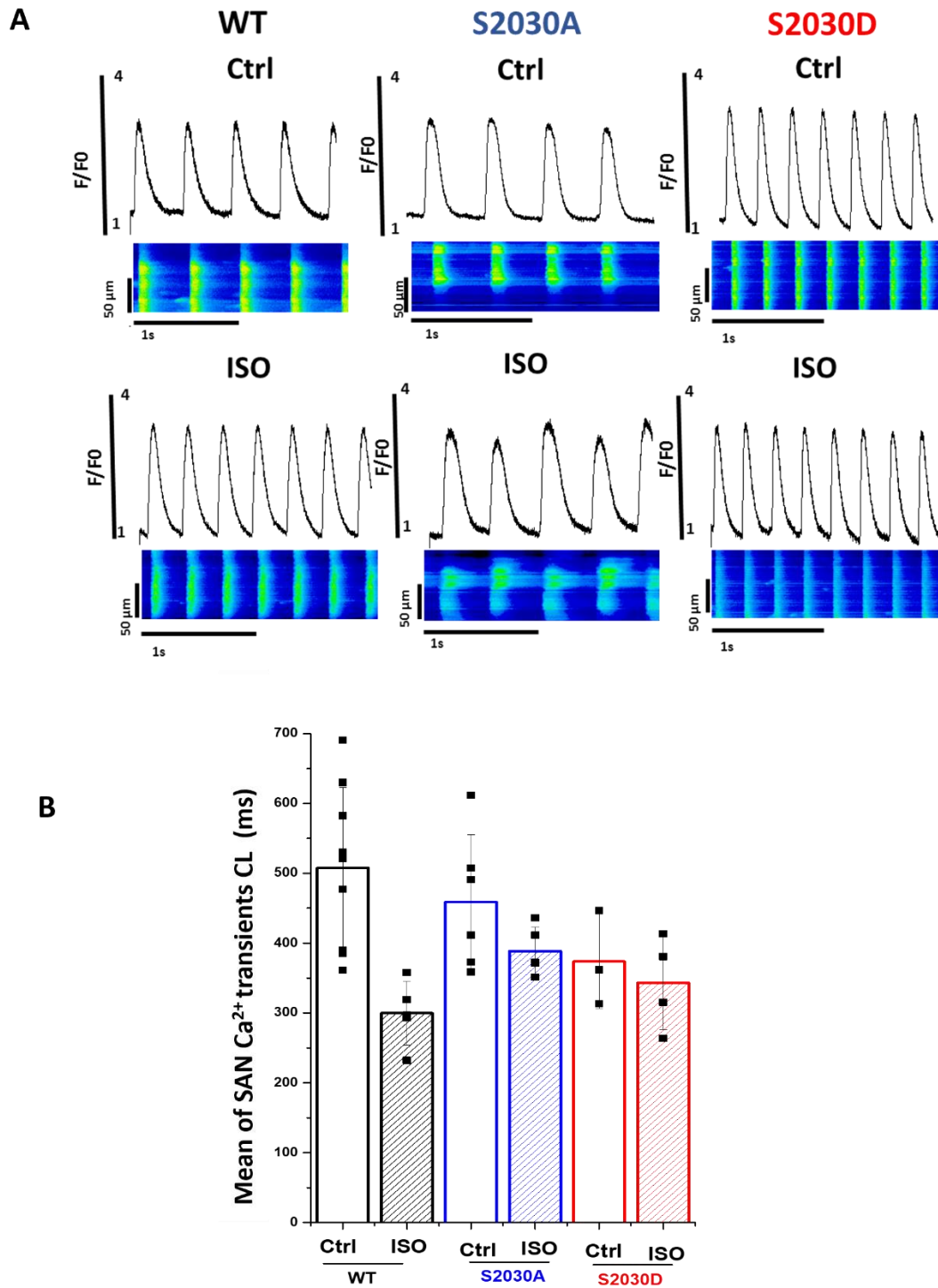


Figure 44- Effet de la phosphorylation de S2030 sur le nœud sino-atrial isolé lors de la réponse β -adrénergique

- (A) Exemples de transitoires calciques des cellules sinusales en condition basale (Ctrl) et en condition β -adrénergique (ISO, 20 nM) visualisés par microscopie confocale
- (B) Moyenne de la période entre deux transitoires calciques consécutifs (cycle length, CL, en ms) par animal en condition basale (Ctrl) et en condition β -adrénergique

3. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur le NSA lors de la réponse β -adrénergique

Pour mieux comprendre le rôle du site S2030 sur la réponse β -adrénergique, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques intrinsèques du NSA de ces modèles et notamment à la fréquence de battement spontanée du NSA. Pour ce faire, nous avons isolé et incubé le NSA avec une sonde fluorescente calcique afin de visualiser les variations intracellulaires de Ca^{2+} des cellules du NSA en condition basale (Ctrl) et condition β -adrénergique (ISO, 20 nM) par microscopie confocale. Les mesures sont effectuées sur tissu entier. Nous n'avons pas observé de différences entre les NSA mâles et femelles. Ainsi, nous avons regroupés les données mâles et femelles.

Le panneau **A** de la **Figure 44** illustre des exemples de transitoires calciques des cellules du NSA en condition basale (Ctrl) et en condition β -adrénergique (ISO) pour chacun des modèles. Au-dessus de chaque image des transitoires calciques se trouve le rapport de fluorescence F/F_0 de ceux-ci. Ces images illustrent que les cellules du NSA à l'état basal des S2030D ont des transitoires calciques plus fréquents que les WT et les S2030A. La perfusion d'ISO (20 nM) accélère la fréquence des transitoires calciques des cellules du NSA dans tous les groupes mais il semblerait que cet effet ne soit pas le même.

Afin de quantifier cet effet global pour chaque NSA, nous avons mesuré le temps entre deux transitoires calciques consécutifs (cycle length (CL), en ms) des cellules du NSA inversement proportionnelle à la fréquence des transitoires calciques. En effet, lorsque le CL est élevé cela signifie que la fréquence des transitoires calciques est faible et donc que la cellule bat lentement. En moyennant les CL (moyenne +/- écart-type de la moyenne) de chaque cellule par animal, nous avons quantifié le CL moyen des transitoires calciques du NSA dans ces groupes avant et après ISO représentées dans le panneau **B** de la **Figure 44**. Chaque point représente la moyenne des CL des cellules sinusales d'un seul animal (WT N=8 (basale) et N=5 (ISO), S2030A N=6 (basale) et N=5 (ISO), S2030D N=3 (basale) et N=4 (ISO)) avec minimum 3 cellules par animal et par condition. On observe que le CL moyen des transitoires calciques à l'état basal des S2030D est plus rapide que celui des WT et des S2030A. Après ISO, le CL moyen des transitoires calciques des WT est significativement accélérée. Cependant, le CL moyen des transitoires calciques après ISO est moins accélérée chez les S2030A et les S2030D. Ainsi ces résultats démontrent que la modification du site S2030 qu'il soit phosphorylé ou non phosphorylable altère l'effet de l'ISO sur le NSA contrairement aux WT.

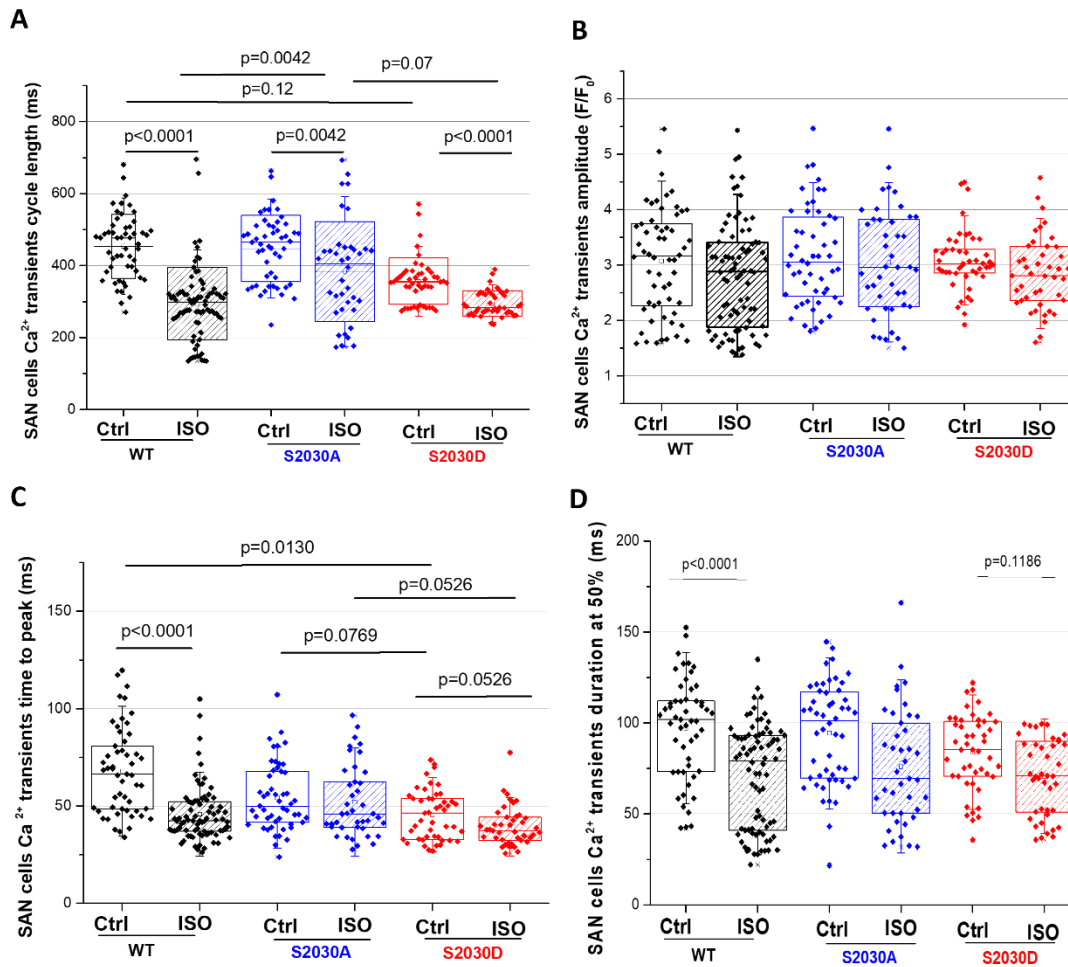


Figure 45- Caractéristiques des transitoires calciques des cellules sinusales en condition basale et en condition β -adrénergique

- (A) Temps entre deux transitoires calciques consécutifs (Cycle length, CL, en ms)
- (B) Amplitude des transitoires calciques (F/F_0)
- (C) Temps au pic des transitoires calciques (en ms)
- (D) Durée des transitoires calciques mesurée à 50% du pic (en ms)

Afin de caractériser la dynamique calcique des cellules sinusales lors d'une réponse β -adrénergique, nous avons mesuré pour chaque cellule le CL (**Fig.45A**), l'amplitude (**Fig.45B**), le temps au pic (**Fig.45C**) et la durée (panneau **Fig.45D**) des transitoires calciques des cellules sinusales en condition basale (Ctrl) et en condition β -adrénergique (ISO). Chaque point représente une cellule sinusale. Les cellules quantifiées ne sont pas appariées avant et après ISO ; WT Control (N=8, n=53) et ISO (N=5, n=80), S2030A Control (N=6, n=51) et ISO (N=5, n=36), S2030D Control (N=3, n=47) et ISO (N=4, n=43).

Dans le panneau **A**, nous pouvons observer que le CL des cellules sinusales des WT est significativement plus court après ISO ($p < 0.0001$). De même, l'ISO raccourcit le CL des cellules sinusales des S2030A ($p = 0.0042$) et des S2030D ($p < 0.0001$). Ainsi, cela démontre bien un effet de l'ISO sur les NSA isolés. Cependant, l'effet ISO est différent entre les génotypes. En effet, à l'état basal le CL des cellules sinusales WT et des S2030A ne sont pas significativement différents mais en présence d'ISO le CL des S2030A est significativement plus long que celui des WT ($p = 0.0042$). Lorsque le site S2030 est phosphorylé, le CL des cellules sinusales à l'état basal des S2030D est plus court que celui des WT et des S2030A bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p = 0.12$). Par ailleurs en présence d'ISO, le CL des cellules sinusales des S2030D est également plus court que celui des S2030A bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p = 0.07$). Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation du site S2030 joue un rôle sur la fréquence des transitoires calciques spontanées des cellules du NSA lors d'une réponse β -adrénergique.

Dans le panneau **B**, nous n'observons pas de différence significative entre l'amplitude des transitoires calciques des WT en condition basale et en présence d'ISO. De même que pour l'amplitude des transitoires calciques des S2030A et des S2030D en condition basale et en présence. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes à l'état basal et en présence d'ISO. Ainsi, ces résultats nous suggèrent que la phosphorylation de S2030 n'a pas d'effet significatif sur la quantité de Ca^{2+} intracellulaire des cellules du NSA.

Dans le panneau **C**, nous pouvons observer que le temps au pic (en ms) des transitoires calciques des WT est significativement plus rapide en présence d'ISO ($p < 0.0001$). De plus, le temps au pic des transitoires calciques des S2030A contrairement aux S2030D. De plus, le temps au pic en présence d'ISO entre les WT et les S2030D ne sont pas différents contrairement à celui entre les S2030A et les S2030D ($p = 0.0526$). Par ailleurs, à l'état basal le temps au pic des transitoires des S2030D est significativement plus rapide que celui des WT ($p = 0.0130$) et est également plus rapide que celui des S2030A bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p = 0.0769$). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation du site S2030 accélère le temps au pic des transitoires calciques à

l'état basale et que son absence empêche l'accélération du temps au pic des transitoires calciques lors d'une réponse β -adrénergique.

Dans le panneau **D**, l'ISO accélère significativement la durée (mesurée à 50% du pic, D50, en ms) des transitoires calciques des WT ($p < 0.0001$). En présence d'ISO, la D50 des S2030D est également raccourcie bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p = 0.1186$). Par ailleurs, cet effet ISO n'est pas significatif chez les S2030A ($p = 0.80$). De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes à l'état basale (WT basal vs S2030A basal vs S2030D basal, $p < 0.46$) et en présence d'ISO (WT ISO vs S2030A ISO vs S2030D ISO, $p = 0.6096$). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 n'altère pas la D50 des transitoires calciques.

Ainsi, ces résultats démontrent que la phosphorylation sur le site S2030 est essentielle à une réponse β -adrénergique totale du NSA et suggèrent également que la phosphorylation du site S2030 joue un rôle sur la fréquence des transitoires calciques spontanées des cellules du NSA lors d'une réponse β -adrénergique.

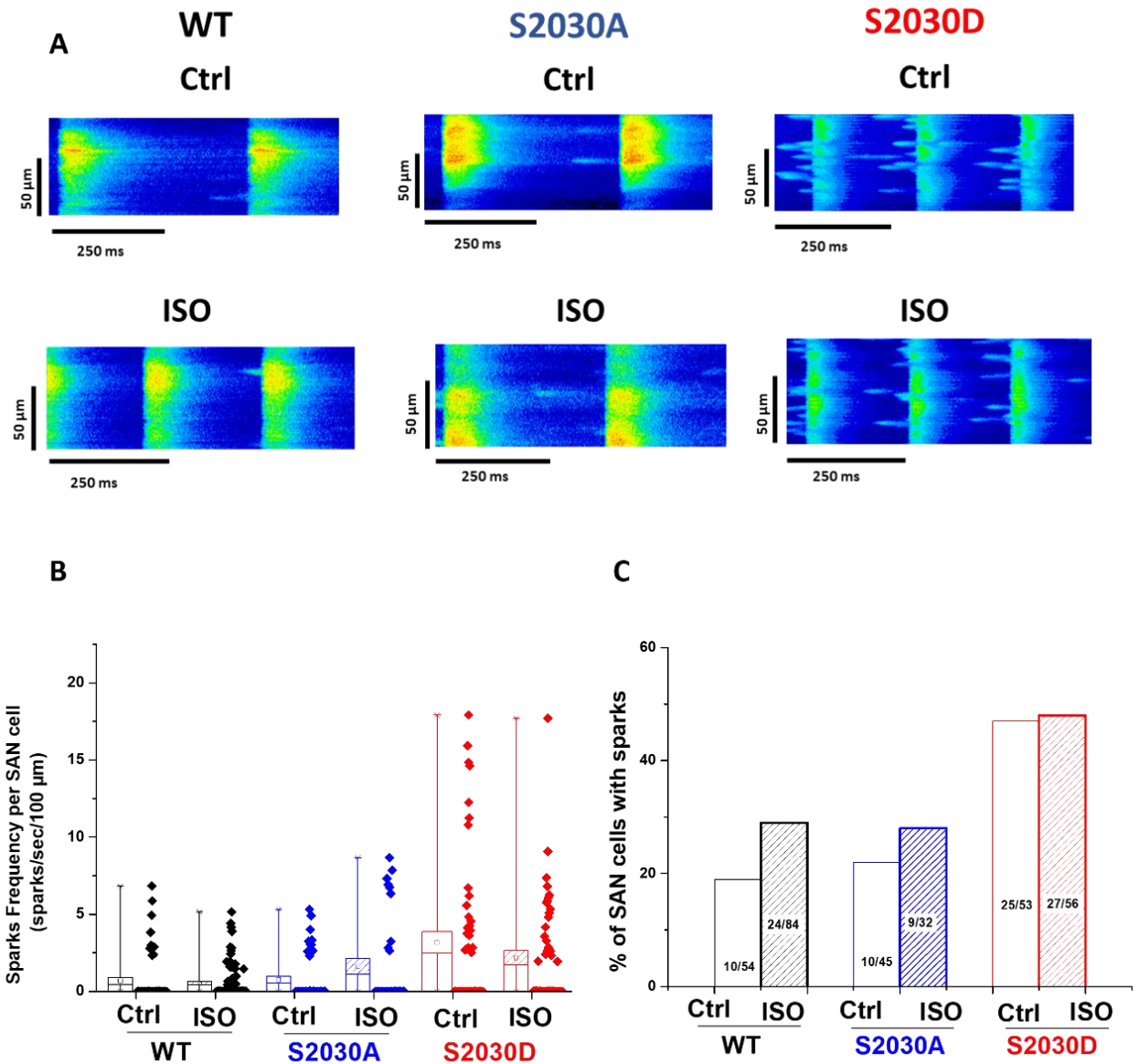


Figure 46-Effet de la phosphorylation de S2030 sur les libérations de Ca^{2+} sparks dans les cellules du NSA lors de la réponse β -adrénergique

- (A) Exemples de Ca^{2+} sparks lors de la phase diastolique des cellules sinusales en condition basale (Ctrl) et en condition β -adrénergique (ISO)
- (B) Fréquence de Ca^{2+} sparks (nombre de sparks/seconde/100 μ m)
- (C) Pourcentage de cellules sinusales avec des Ca^{2+} sparks

4. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur les libérations de Ca²⁺ sparks dans le NSA lors de la réponse β-adrénergique

L'enregistrement des transitoires calciques des cellules sinusales sur tissu entier en microscopie confocale nous a permis également d'enregistrer les libérations diastoliques calciques sous forme de Ca²⁺ sparks. La caractérisation de ces Ca²⁺ sparks permettent d'étudier l'activité in situ du RyR2 et notamment la probabilité d'ouverture du RyR2 lors de la phase diastolique. La caractérisation des Ca²⁺ sparks a été étudiée en condition basale (Ctrl) et lors d'une stimulation β-adrénergique (ISO, 20 nM) afin d'étudier la contribution de la phosphorylation du site S2030 sur la fonction du RyR2 lors de la réponse β-adrénergique. Seules les cellules présentant des transitoires calciques ont été incluses dans cette mesure. En effet, nous avons exclu les cellules ne présentant que des Ca²⁺ sparks sans transitoires calciques afin de ne considérer que les cellules sinusales fonctionnelles c'est-à-dire qui battent spontanément. Les cellules quantifiées ne sont pas appariées avant et après ISO ; WT Control (N=8, n=54) et ISO (N=5, n=84), S2030A Control (N=6, n=45) et ISO (N=5, n=32), S2030D Control (N=3, n=53) et ISO (N=4, n=56).

Le panneau **A** de la **Figure 46** illustre des exemples de Ca²⁺ sparks entre des transitoires calciques lors de la phase diastolique des cellules sinusales en condition basale (Ctrl) et en condition β-adrénergique (ISO) pour chacun des modèles. Ces images illustrent que les cellules sinusales des WT présentent peu de Ca²⁺ sparks en condition basale et après perfusion d'ISO. Il en est de même pour les cellules sinusales des S2030A contrairement aux S2030D. En effet, nous pouvons observer que les cellules sinusales des S2030D présentent un nombre plus important de Ca²⁺ sparks en condition basale et en présence d'ISO.

Afin de comparer cette différence entre les modèles, nous avons mesuré la fréquence de Ca²⁺ sparks qui correspond à la quantité de Ca²⁺ sparks sur une distance et un temps diastolique donné (Nombre de sparks/sec/100µm) représentée sur le panneau **B** de la **Figure 46**. Chaque point représente la fréquence de Ca²⁺ sparks par cellule, mesurée 0 si absence de Ca²⁺ sparks dans cette cellule. On observe que la fréquence moyenne de Ca²⁺ sparks des WT est très faible en condition basale et que cette fréquence semble diminuer après ISO. Chez les S2030A, la fréquence moyenne de Ca²⁺ sparks est très faible en condition basale et cette fréquence semble augmenter après ISO. Chez les S2030D, la fréquence moyenne de Ca²⁺ sparks en condition basale et en présence d'ISO est nettement plus élevée que celle des WT et des S2030A. Par ailleurs, la fréquence moyenne de Ca²⁺ sparks en condition basale des S2030A semble similaire à celle des WT mais cette fréquence est augmentée après ISO contrairement aux WT et S2030D. En effet, en présence d'ISO, la fréquence moyenne de Ca²⁺ sparks tend à diminuer chez les WT et les S2030D contrairement aux S2030A. Ainsi, ces résultats suggèrent que la libération de Ca²⁺ sparks tend à diminuer lors d'une réponse β-adrénergique comme observé

chez les WT et les S2030D mais que l'absence de phosphorylation sur S2030 empêche cet effet ISO. De plus, ces résultats suggèrent que la phosphorylation du site S2030 favorise la libération de Ca^{2+} sparks.

Afin de mesurer l'effet de l'ISO sur la libération de Ca^{2+} sparks dans ces modèles, nous avons calculé le nombre de cellules présentant des Ca^{2+} sparks avant et en présence d'ISO sous forme de pourcentage représenté dans le panneau **C** de la **Figure 46** ; En condition basale, 18% des cellules sinusales des WT présentent des Ca^{2+} sparks et cette proportion augmente en présence d'ISO. De façon similaire aux WT, les cellules sinusales des S2030A présentent une proportion de cellules avec Ca^{2+} sparks de 22% et cette proportion augmente en présence d'ISO. Lorsque le site S2030 est phosphorylé, la proportion de cellules avec Ca^{2+} sparks des S2030D en condition basale est nettement plus élevée que celle des WT et S2030A. De plus, il y aurait autant de cellules présentant des Ca^{2+} sparks en condition basale et en présence d'ISO dans le groupe S2030D. Ainsi, ces résultats démontrent qu'il y a bien une augmentation de la proportion de cellules avec Ca^{2+} sparks lors d'une réponse β -adrénergique et que la phosphorylation du site S2030 favorise davantage les libérations de Ca^{2+} diastoliques du RyR2.

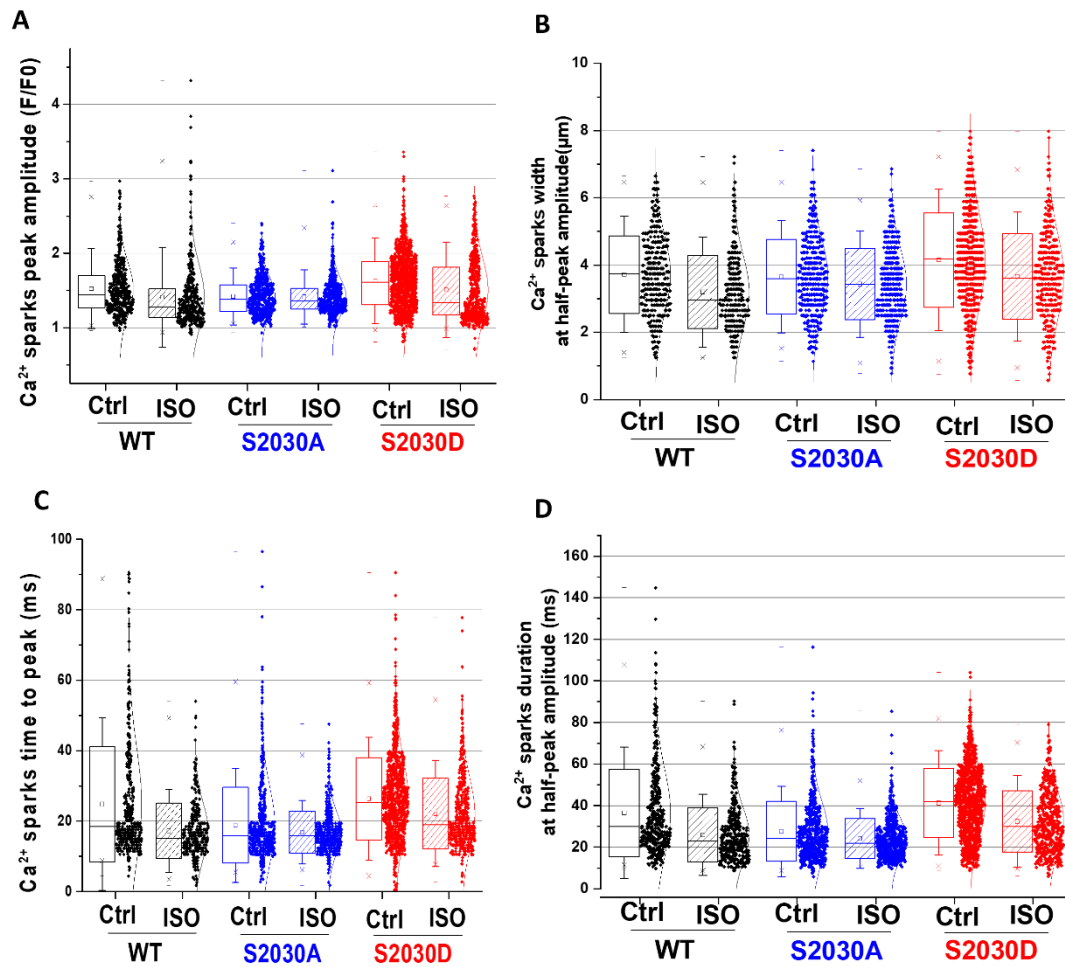


Figure 47- Caractéristiques des Ca^{2+} sparks des cellules sinusales en condition basale et en condition β -adrénergique

- (A) Amplitude des Ca^{2+} sparks (F/F0)
- (B) Largeur maximale à 50% du pic des Ca^{2+} sparks (μm)
- (C) Temps au pic des Ca^{2+} sparks (ms)
- (D) Durée maximale à 50% du pic des Ca^{2+} sparks (ms)

Afin de mieux caractériser les Ca^{2+} sparks des cellules sinusales lors d'une réponse β -adrénergique, nous avons mesuré pour chaque cellule l'amplitude (**Fig.47A**), la largeur maximale à 50% du pic (W50) (**Fig.47B**), le temps au pic (**Fig.47C**) et la durée maximale à 50% du pic (D50) (**Fig.47D**) des Ca^{2+} sparks en condition basale (Ctrl) et en condition β -adrénergique (ISO). Chaque point représente un Ca^{2+} spark ; WT Control (N=8, n=447) et ISO (N=5, n=373), S2030A Control (N=6, n=568) et ISO (N=5, n=555), S2030D Control (N=3, n=1128) et ISO (N=4, n=520).

Dans le panneau **A**, l'amplitude des Ca^{2+} sparks des cellules WT en condition ISO est légèrement diminuée par rapport à celle en condition basale. Cependant, l'amplitude des Ca^{2+} sparks des S2030A n'est pas diminuée en présence d'ISO contrairement aux WT. Par ailleurs, l'ISO diminue légèrement l'amplitude des Ca^{2+} sparks des cellules S2030D. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'ISO aurait potentiellement un effet moindre sur l'amplitude des Ca^{2+} sparks des S2030A contrairement aux WT et S2030D.

Dans le panneau **B**, la largeur des Ca^{2+} sparks (en μm) des cellules WT est réduite en présence d'ISO par rapport à celle en condition basale. En l'absence de phosphorylation sur S2030, la largeur des Ca^{2+} sparks des S2030A est également réduite en présence mais moins que chez les WT. Par ailleurs, l'ISO réduit davantage la largeur des Ca^{2+} sparks des cellules S2030D. En condition basale, les Ca^{2+} sparks des S2030D semblent plus larges que ceux des WT et des S2030A. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'ISO aurait potentiellement un effet moindre sur la largeur des Ca^{2+} sparks des S2030A contrairement aux WT et aux S2030D et que la phosphorylation de S2030 augmenterait potentiellement la largeur des Ca^{2+} sparks en condition basale.

Dans le panneau **C**, le temps au pic (en ms) des Ca^{2+} sparks des cellules WT en condition ISO est accéléré par rapport à celui des WT en condition basale. En l'absence de phosphorylation sur S2030, le temps au pic des Ca^{2+} sparks est diminuée en présence d'ISO mais de manière moindre comparée aux WT. Lorsque le site S2030 est phosphorylé, l'ISO réduit le temps au pic des Ca^{2+} sparks. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'ISO aurait potentiellement un effet moindre sur le temps au pic des Ca^{2+} sparks des S2030A contrairement aux WT et S2030D et que la phosphorylation de S2030.

Dans le panneau **D**, la durée (en ms) des Ca^{2+} sparks des cellules WT en condition ISO est plus courte que celle en condition basale. En l'absence de phosphorylation sur S2030, l'ISO réduit la durée des Ca^{2+} sparks. De même, lors de la phosphorylation sur S2030, la durée des Ca^{2+} sparks des S2030D est réduite en présence d'ISO. Cependant, l'ISO réduit davantage la durée des Ca^{2+} sparks des WT et S2030D par rapport aux S2030A. En condition basale et en présence d'ISO, la durée des Ca^{2+} sparks des S2030D semble plus longue que celle des WT et des S2030A. Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 tend à augmenter la durée des Ca^{2+} sparks.

Pour conclure, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 joue un rôle sur l'activité du RyR2 in situ et notamment sur sa probabilité d'ouverture lors de la phase diastolique. En effet, les cellules sinusales des S2030D présentent un nombre et une fréquence de Ca^{2+} sparks plus élevée que celles des WT et S2030A. De plus, ces Ca^{2+} sparks seraient plus longs et plus larges que ceux des WT et des S2030A. Ces résultats suggèrent alors que la phosphorylation de S2030 augmente l'activité du RyR2 et conduit ainsi à une augmentation de l'horloge calcique. L'augmentation de l'horloge calcique conduit alors à une accélération de l'activité du pacemaker cardiaque.

Si lors de la phosphorylation de S2030, l'activité du RyR2 est également augmentée dans les cardiomyocytes ventriculaires, les libérations de Ca^{2+} diastoliques du RyR2 pourraient notamment favoriser la survenue de troubles du rythme. Ainsi, nous pourrions supposer que les souris S2030D soient plus enclin à développer des arythmies que les WT et les S2030A lors d'un stress important.

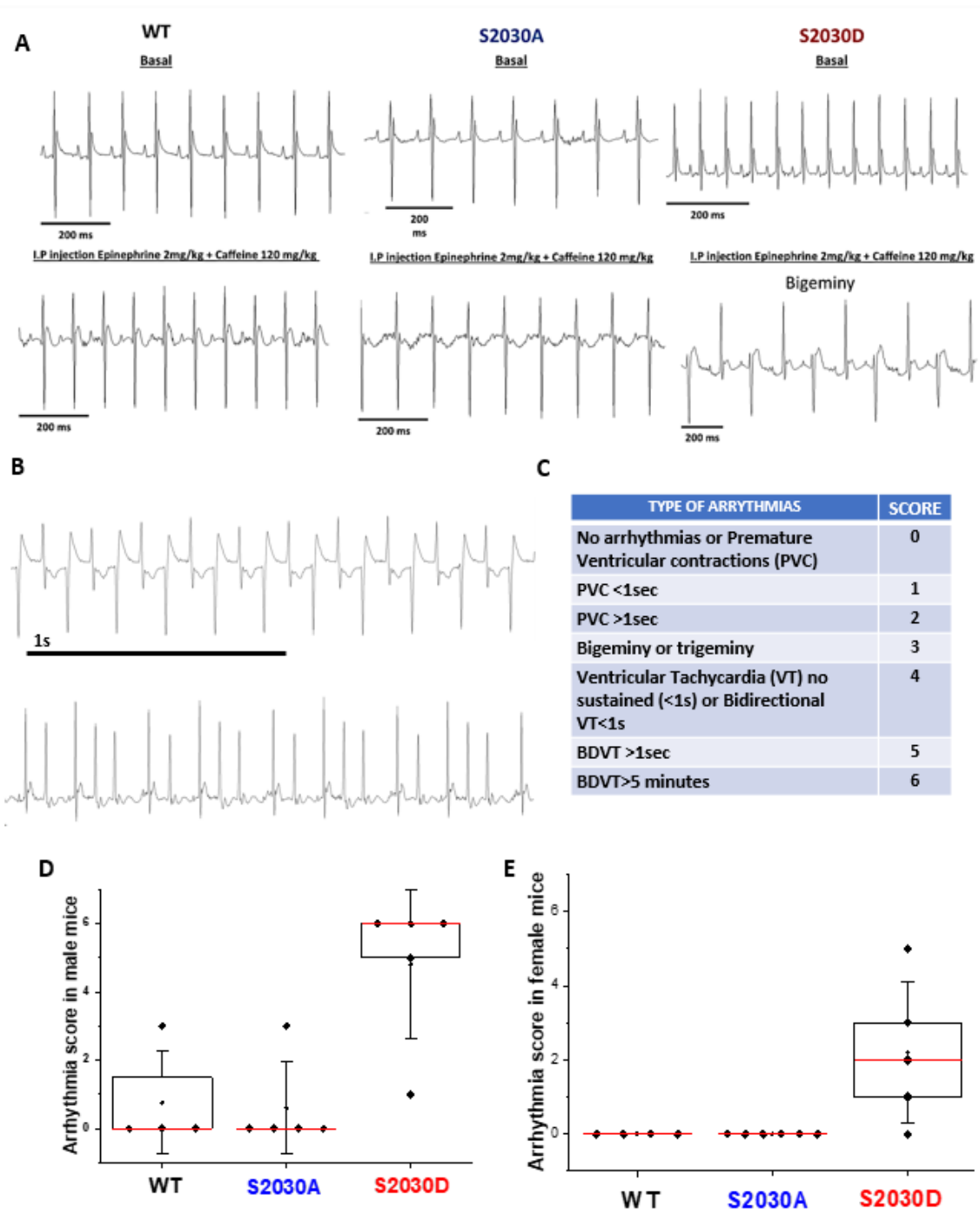


Figure 48- Effet de la phosphorylation de S2030 sur l'activité électrique cardiaque lors d'un stress (Epinephrine+ Caféine)

- (A) Exemples de tracés ECG en condition basale et en présence d'épinéphrine (2mg/Kg) + Caféine (120 mg/kg)
- (B) Exemples d'arythmies ventriculaires identifiées lors d'un stress ; (haut) Tachycardie ventriculaire bidirectionnelle (S2030D mâle), (bas) Episodes de bigémisés et trigémisés (S2030D femelle)
- (C) Score établi afin de distinguer les arythmies selon leur sévérité et leur durée
- (D) Score d'arythmie des mâles et (E) des femelles

5. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur l'activité électrique cardiaque lors d'un stress (Épinéphrine/Caféine)

Afin de tester notre hypothèse selon laquelle les souris S2030D seraient plus enclins à développer des arythmies, nous avons enregistré les ECG par télémétrie des modèles avant et après injection I.P. d'une solution composée d'épinéphrine (2mg/kg) et de caféine (120 mg/kg). Les enregistrements ont été effectués sur les mâles et les femelles et les données ont été séparées afin de considérer une différence probable basée sur le sexe de l'animal.

Le panneau **A** de la **Figure 48** illustre des exemples des ECG enregistrés avant et après injection d'épinéphrine et caféine. Le panneau **B** (**Fig.48.**) illustre des exemples d'arythmies ventriculaires identifiés sur les tracés d'ECG. Le premier exemple montre une tachycardie ventriculaire bidirectionnelle (BDVT) enregistrée 30 minutes après injection chez une souris S2030D mâle. Cette arythmie ventriculaire d'une durée de 14 minutes est reconnaissable par la présence de deux complexes QRS d'axes opposés. Le deuxième exemple montre un rythme très irrégulier avec des épisodes de bigéminés et trigéminés enregistré 10 minutes post-injection chez une souris S2030D femelle. Ce type d'arythmie est décrit comme une alternance entre un complexe QRS normal suivie d'une extrasystole ventriculaire (bigéminé) ou de deux extrasystoles ventriculaires (trigéminé).

Afin de mieux évaluer si la phosphorylation de S2030 favorise les troubles du rythme, nous avons distingué les types d'arythmies et leur durée selon un score de 0 à 6 représenté dans le panneau **C** de la **Figure 48**. Les épisodes d'arythmies suivant les 5 premières minutes post-injection n'ont pas été considérés afin d'exclure un stress potentiel lié à l'injection. Ce score catégorise l'absence d'arythmies (score 0) aux arythmies les plus sévères (score 6). Les arythmies sont distinguées des événements les moins sévères tels que des extrasystoles ventriculaires selon leur durée (score 1 si $< 1s$ et score 2 si $> 1s$) jusqu'aux événements les plus sévères tels que les épisodes de bigéminée ou trigéminée (score 3) et les tachycardies ventriculaires selon leur durée (< 1 seconde ; score 4, > 1 seconde score 5 et > 5 minutes score 6). A l'aide de ce score, nous avons établi le nombre d'animaux présentant des arythmies et la sévérité de ces arythmies chez les mâles (**Fig.48D**) et les femelles (**Fig.48E**). Dans le panneau **D** de la **Figure 48**, on observe que les souris S2030D mâle présentent plus d'arythmies que les WT et les S2030A mâles. De plus, les arythmies des S2030D ont des scores d'arythmies plus sévères que les WT et les S2030A. Dans le panneau **E** de la **Figure 48**, on observe également que les souris S2030D femelles présentent plus d'arythmies que les WT et les S2030A femelles. Par ailleurs, les S2030D femelles présentent des scores d'arythmies moins sévères que les S2030D mâles. Ainsi, ces résultats démontrent que lors d'une réponse β -adrénergique la phosphorylation de S2030 favorise la survenue d'arythmies sévères chez les mâles et les femelles.

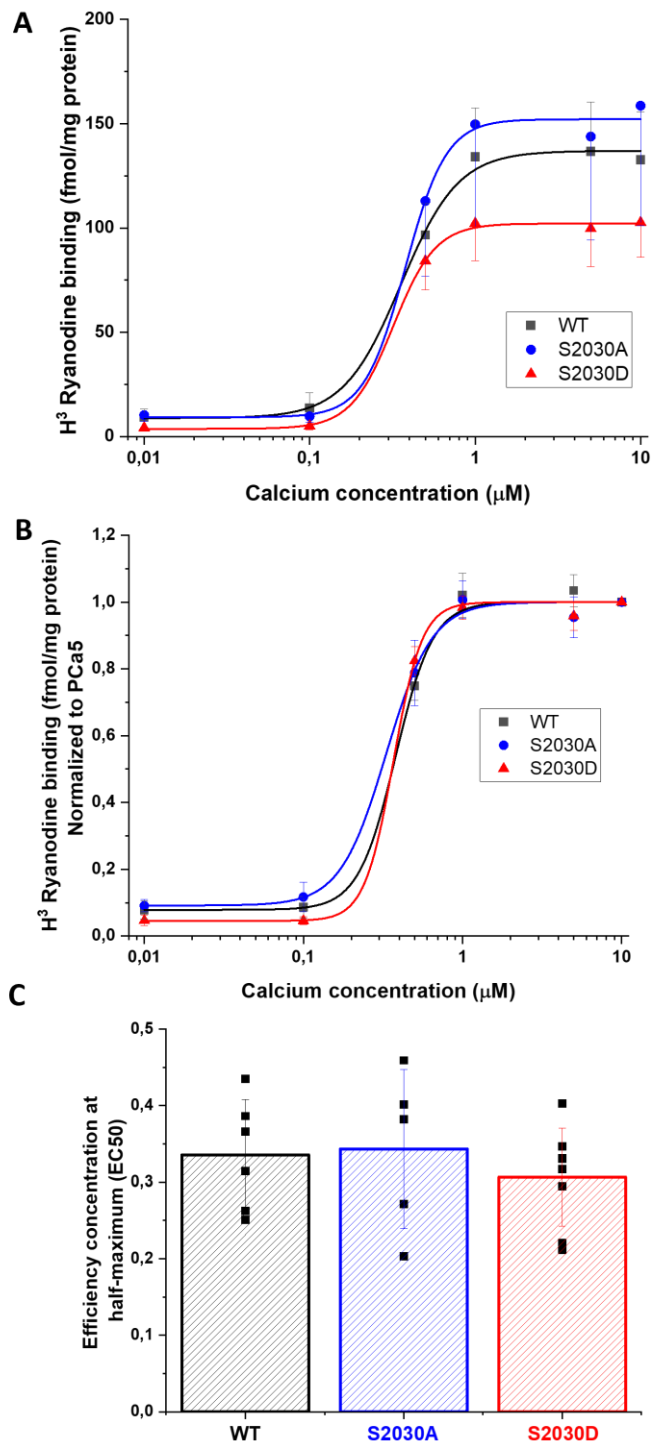


Figure 49- Effet de la phosphorylation de S2030 sur la sensibilité au Ca²⁺ du RyR2

- (A) Capacité de liaison de la ryanodine tritiée au RyR2 (affinité) en fonction des concentrations en Ca²⁺ (μM)
- (B) Affinité de la ryanodine tritiée au RyR2 normalisée sur la capacité de liaison maximale (Bmax) à 10 μM
- (C) Concentration d'efficacité médiane (EC50) de ryanodine à l'ouverture de RyR2

6. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur la sensibilité au Ca²⁺ du RyR2

L'étude des caractéristiques des Ca²⁺ sparks (**Figure 46**) montre que la phosphorylation de RyR2 sur S2030 a un effet sur l'activité du RyR2 in situ. Afin de mieux comprendre cet effet, nous avons étudié la sensibilité du RyR2 au Ca²⁺ par fixation de ryanodine tritiée au RyR2 sur homogénats de cœur entier par technique de *Radiobinding assay*. En couplant la ryanodine (ligand naturel du RyR2) avec du tritium radioactif (H³), nous pouvons mesurer la capacité de liaison de la ryanodine tritiée au RyR2 en fonction des concentrations en Ca²⁺. La ryanodine se lie au RyR2 ouvert, et l'ouverture de ces récepteurs dépend de la concentration en Ca²⁺ présent dans le milieu. Plus il y a de Ca²⁺ dans la solution, plus les récepteurs s'ouvrent et se lient à la ryanodine tritiée. Les résultats obtenus sont normalisés par les niveaux d'expression de RyR2 obtenues par technique de western blot à partir des mêmes échantillons utilisés (WT N=6, S2030A N=5, S2030D N=8).

Le panneau **A** de la **Figure 49** représente la capacité de liaison de la ryanodine tritiée au RyR2 (en femtomol/mg de protéine) en fonction des concentrations en Ca²⁺. Dans tous les groupes, on observe une augmentation de la liaison de la ryanodine tritiée au RyR2 qui s'ouvre davantage lorsque la concentration en Ca²⁺ augmente. Lorsque la concentration en Ca²⁺ est élevée, la ryanodine atteint sa capacité de liaison maximale (Bmax) lorsque le RyR2 ne peut plus s'ouvrir davantage. Cette Bmax est également dépendante de l'expression des canaux. La Bmax moyenne des WT est de 132 +/- 23 fmol/mg, celle des 2030A est de 153 +/- 44 fmol/mg et celle des S2030D est de 102 +/- 16 fmol/mg. Nous n'observons pas de différence significative entre les groupes. Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 n'a pas d'effet significatif sur l'expression des RyR2.

Le panneau **B** de la **Figure 49** représente l'affinité de la ryanodine au RyR2 normalisée à son maximum, 10 µM de Ca²⁺. En effet, cette valeur a été choisie pour s'assurer que la ryanodine a atteint sa capacité de liaison maximale au RyR2. Les données sont ajustées à une fonction (Hill1) afin de calculer la concentration d'efficacité médiane (EC50) nécessaire pour que la ryanodine se fixe sur le RyR2 ouvert représentée sur le panneau **C** de la **Figure 49**. Nous n'observons pas de différence significative entre les EC50 des WT par rapport aux S2030A et S2030D. Ainsi, cela suggère que la phosphorylation de S2030 n'a pas d'effet sur la sensibilité du RyR2 au Ca²⁺. Cependant, ces résultats n'expliquent pas l'augmentation de Ca²⁺ sparks ni la survenue d'arythmies sévères chez les S2030D qui pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'ouverture du canal de RyR2. Ainsi, on pourrait supposer que la phosphorylation du site S2030 modifierait les taux de phosphorylation sur les autres sites de phosphorylation connus S2808 et S2814 et que l'interdépendance de ces sites de phosphorylations contribuerait à l'activité du RyR2.

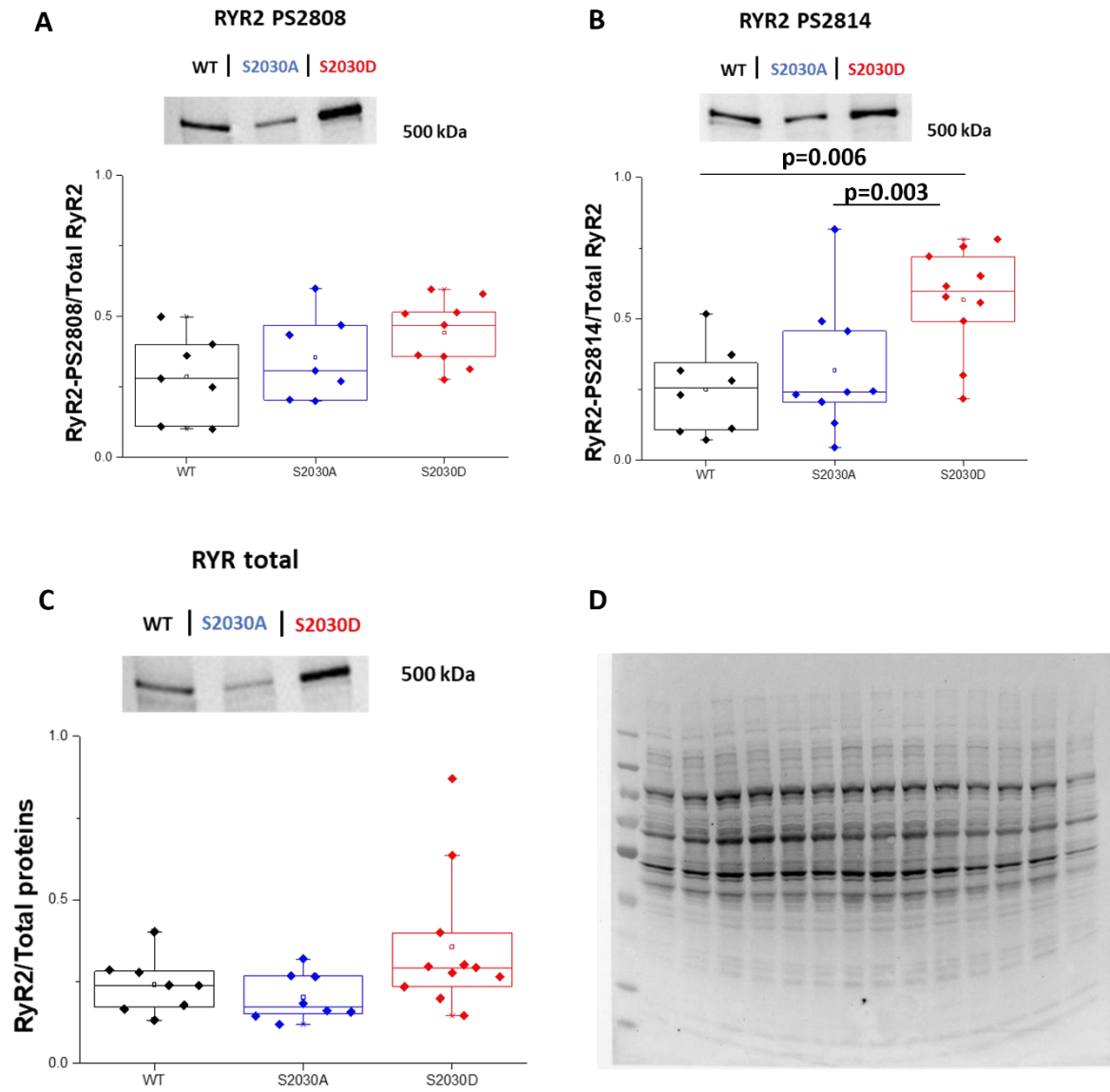


Figure 50-Effet de la phosphorylation de S2030 sur l'expression de RYR2 et les taux de phosphorylation de S2808 et S2814

- (A) Taux de phosphorylation de S2808 normalisé sur l'expression totale de RyR2 à l'état basale à partir de tissus ventriculaires
- (B) Taux de phosphorylation de S2814 normalisé sur l'expression totale de RyR2 à l'état basale à partir de tissus ventriculaires
- (C) Expression totale de RyR2 normalisée sur la quantité de protéines totales dans chaque échantillon
- (D) Révélation de protéines totales sur gel de polyacrylamide 3-8%, Tris-Acétate

7. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur l'expression de RyR2 et les sites de phosphorylations S2808 et S2814

Afin de tester notre hypothèse selon laquelle la phosphorylation de S2030 a un effet sur la phosphorylation des sites S2808 et S2814, nous avons mesuré les taux de phosphorylation des sites S2808 et S2814 par technique de western blot à partir d'homogénats de tissus ventriculaires.

Le panneau **A** de la **Figure 50** représente les taux de phosphorylation de S2808 normalisés sur l'expression total de RyR2 des modèles WT, S2030A et S2030D à l'état basal. Nous n'observons pas de différence significative entre les taux de phosphorylation de S2808 des WT et S2030A. De plus, le taux de phosphorylation de S2808 des S2030D n'est pas significativement différent des WT ($p=0.10$) et S2030A ($p=0.66$). Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 n'induit pas de modification significative sur S2808.

Le panneau **B** de la **Figure 50** représente les taux de phosphorylation de S2814 normalisés sur l'expression total de RyR2 des modèles WT, S2030A et S2030D à l'état basal. Nous n'observons pas de différence significative entre les taux de phosphorylation de S2814 des WT et S2030A. Cependant, les taux de phosphorylation de S2814 des S2030D est plus élevée que les WT ($p=0.006$) et S2030A ($p=0.003$). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'en l'absence de phosphorylation de S2030 le taux de phosphorylation de S2814 est similaire à celui des WT et que la phosphorylation mimétique de S2030 induit une augmentation significative de la phosphorylation de S2814.

Nous avons également mesuré l'expression du RyR2 total normalisé par la quantité de protéines totales (**Fig.50D**) de chaque échantillon des modèles WT, S2030A et S2030D à l'état basal représenté dans le panneau **C** de la **Figure 50**. On observe alors que l'expression du RyR2 dans le groupe n'est pas significativement différent par rapport aux WT. Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 n'altère pas l'expression du RyR2.

La phosphorylation de S2808 et S2814 en condition basale n'est pas significativement différente chez les S2030A par rapport aux WT. Cependant, le taux de phosphorylation de S2814 est significativement augmenté chez les S2030D mais pas celui de S2808. Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 induit une augmentation de la phosphorylation du site S2814 à l'état basal et soutient l'hypothèse selon laquelle ces sites seraient co-dépendants bien qu'ils ne soient pas phosphorylés par les mêmes kinases. En effet, le site S2030 est PKA-dépendant tandis que le site S2814 est CaMKII-dépendant. Cette augmentation de phosphorylation de S2814 chez les S2030D pourrait notamment conduire à une augmentation de la probabilité d'ouverture du RyR2.

Conclusion du chapitre I

L'étude du rôle de la phosphorylation de S2030 sur des modèles non phosphorylable (S2030A), mimétiquement phosphorylé (S2030D) et des modèles contrôles (WT) a démontré que la phosphorylation de S2030 est impliquée dans le rythme cardiaque sinusal. En effet, le rythme cardiaque in vivo à l'état basal des S2030D est plus rapide que celui des WT et S2030A. De plus, le CL moyen des transitoires calciques des NSA en condition basale des modèles S2030D est plus rapide que celles des WT et des S2030A. Par ailleurs, la phosphorylation de S2030 est également essentielle à une réponse β -adrénergique totale. En effet, nous avons démontré in vivo et sur les NSA que les modèles S2030A présentent une réponse β -adrénergique moindre à l'ISO par rapport aux WT et S2030D. De plus, cette réponse β -adrénergique serait différente in vivo selon le sexe. L'étude des Ca^{2+} sparks nous montre que la phosphorylation de S2030 joue un rôle sur l'activité du RyR2 in situ et notamment sur sa probabilité d'ouverture lors de la phase diastolique. En effet, les cellules sinusales des S2030D présentent un nombre et une fréquence de Ca^{2+} sparks plus élevée que celles des WT et S2030A. De plus, ces Ca^{2+} sparks seraient potentiellement plus longs et plus larges que ceux des WT et des S2030A. Par ailleurs, lors d'un stress intense (Epinéphrine+caféine), la phosphorylation de S2030 favorise la survenue d'arythmies ventriculaires sévères. De plus, la phosphorylation de S2030 induit une augmentation de la phosphorylation du site S2814 à l'état basal et soutient l'hypothèse selon laquelle ces sites seraient co-dépendants bien qu'ils soient phosphorylés par différentes kinases.

II. Effet de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 dans un modèle arythmique lors de la réponse β -adrénergique

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Ernst Niggli et Dr. Marcel Egger à l'université de Berne en suisse, nous nous sommes intéressés à l'effet de la phosphorylation de RyR2 sur S2030 dans un modèle murin exprimant une mutation responsable de CPVT (RyR2^{R420Q}). L'objectif de cette étude est de déterminer si la réduction de la phosphorylation de S2030 peut potentiellement réduire les libérations diastoliques spontanées calciques favorisant la survenue d'arythmies ventriculaires chez les modèles CPVT RyR2^{R420Q}. En effet, nous avons démontré que les souris S2030A homozygotes présentent une réponse β -adrénergique moindre que les WT. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé des modèles RyR2^{R420Q/S2030A} (CPVT/S2030A) issus du croisement des souris S2030A homozygotes avec les souris CPVT RyR2^{R420Q}. Ce modèle CPVT/S2030A est comparé avec les souris CPVT RyR2^{R420Q}. Pour ce faire, nous avons isolé et incubé les cardiomyocytes ventriculaires avec une sonde fluorescente calcique afin de visualiser les variations intracellulaires de Ca²⁺ des cellules en condition basale (CONTROL) et condition β -adrénergique (ISO, 100 nM) par microscopie confocale. Les cellules sont stimulées électriquement afin de mesurer les transitoires calciques. Ensuite, une période de non-stimulation de 30s nous permet d'enregistrer les libérations diastoliques spontanées des cardiomyocytes telles que les vagues calciques pouvant favoriser la survenue d'arythmies ventriculaires. La charge calcique du RS est ensuite mesurée par la perfusion d'une solution de caféine (20 mM) (CPVT Ctrl N=6, n=24 et ISO N=6, n=20 ; CPVT/S2030A Ctrl N=6, n=31 et ISO N=6, n=22)

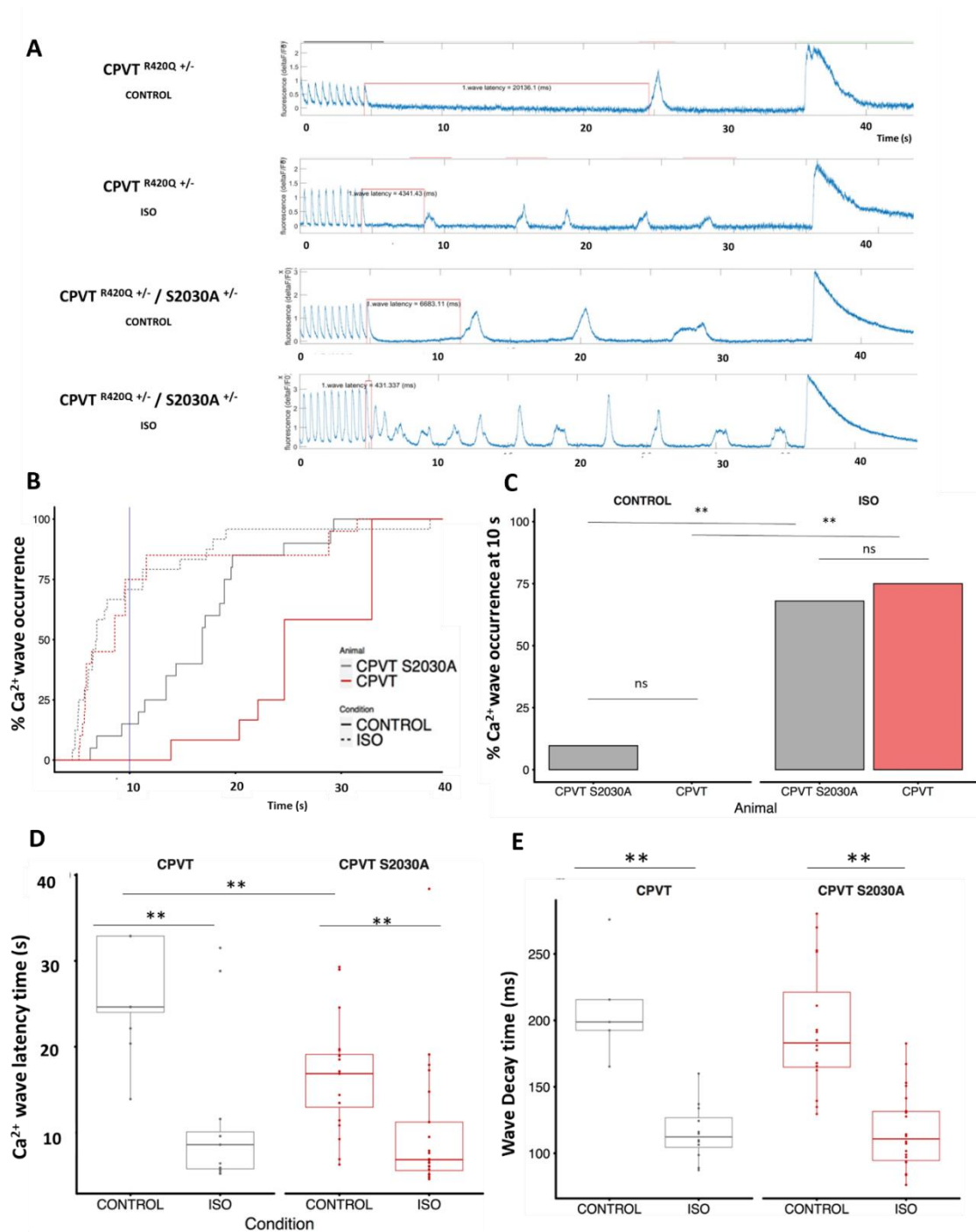


Figure 51- Effet de la phosphorylation de S2030 dans un modèle arythmique CPVT (RyR2 R420Q) lors de la réponse β -adrénergique

- (A) Exemples du protocole utilisé illustrant la survenue de Ca^{2+} waves dans des cardiomyocytes ventriculaires en condition basale (CONTROL) et en condition β -adrénergique (ISO, 100 nM)
- (B) Pourcentage de survenue des Ca^{2+} waves au cours du temps
- (C) Pourcentage de survenue de Ca^{2+} waves à 10 secondes de l'enregistrement
- (D) Temps de latence entre le dernier transitoire et la première Ca^{2+} wave (en ms)
- (E) Temps de décroissance des Ca^{2+} waves (en ms)

Le panneau **A** de la **Figure 51** illustre le protocole utilisé. Ces exemples représentent la survenue de Ca^{2+} waves lors de la phase diastolique en condition basale et en présence d'ISO. On observe que les cellules CPVT et CPVT/2030A présentent des vagues calciques en condition basale et que l'ISO augmente davantage la survenue de vagues calciques.

Ensuite, nous avons mesuré le pourcentage de survenue des Ca^{2+} waves au cours du temps (en secondes, sec) représenté dans le panneau **B** de la **Figure 51**. On observe que la probabilité de Ca^{2+} waves en condition basale (lignes pleines) des CPVT/S2030A est plus élevée au cours du temps que celle des CPVT. En condition ISO (lignes en pointillées), la probabilité de Ca^{2+} waves des CPVT/S2030A n'est pas significativement différente que celle des CPVT. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'ablation de la phosphorylation dans un modèle CPVT augmente la survenue de Ca^{2+} waves en condition basale.

Le panneau **C** de la **Figure 51** représente le pourcentage de survenue des Ca^{2+} waves à 10 sec de l'enregistrement. On observe alors en condition basale que 15% des cellules CPVT/S2030A ont des Ca^{2+} waves à 10 sec contre 0 % chez les CPVT. En présence d'ISO, 70% des cellules CPVT/S2030A présentent des Ca^{2+} waves contre 75% chez les CPVT. Ainsi, ces résultats nous démontrent que l'ISO augmente significativement la survenue des Ca^{2+} waves dans les deux modèles. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les deux modèles.

Nous avons ensuite mesuré le temps de latence (en sec) entre le dernier transitoire et la première Ca^{2+} wave présenté dans le panneau **D** de la **Figure 51** et illustrée dans les exemples dans le panneau **A** de la **Figure 51**. Dans les deux modèles, l'ISO raccourcit significativement le temps de latence de la première Ca^{2+} wave. On observe également que le temps de latence en condition basale des CPVT/S2030A est significativement plus court que celui des CPVT. En présence d'ISO, les groupes ne sont pas significativement différents. Ainsi, ces résultats suggèrent en condition basale que les cellules CPVT/S2030A présentent plus rapidement des Ca^{2+} waves que les CPVT.

Le panneau **E** de la **Figure 51** représente le temps de décroissance (en ms) des Ca^{2+} waves. On observe que le temps de décroissance des Ca^{2+} waves en condition basale des CPVT n'est pas significativement différent à celui des CPVT/S2030A. De plus, l'ISO accélère significativement le temps de décroissance des Ca^{2+} waves dans les deux modèles. Il n'y a pas de différence significative entre les deux modèles en présence d'ISO.

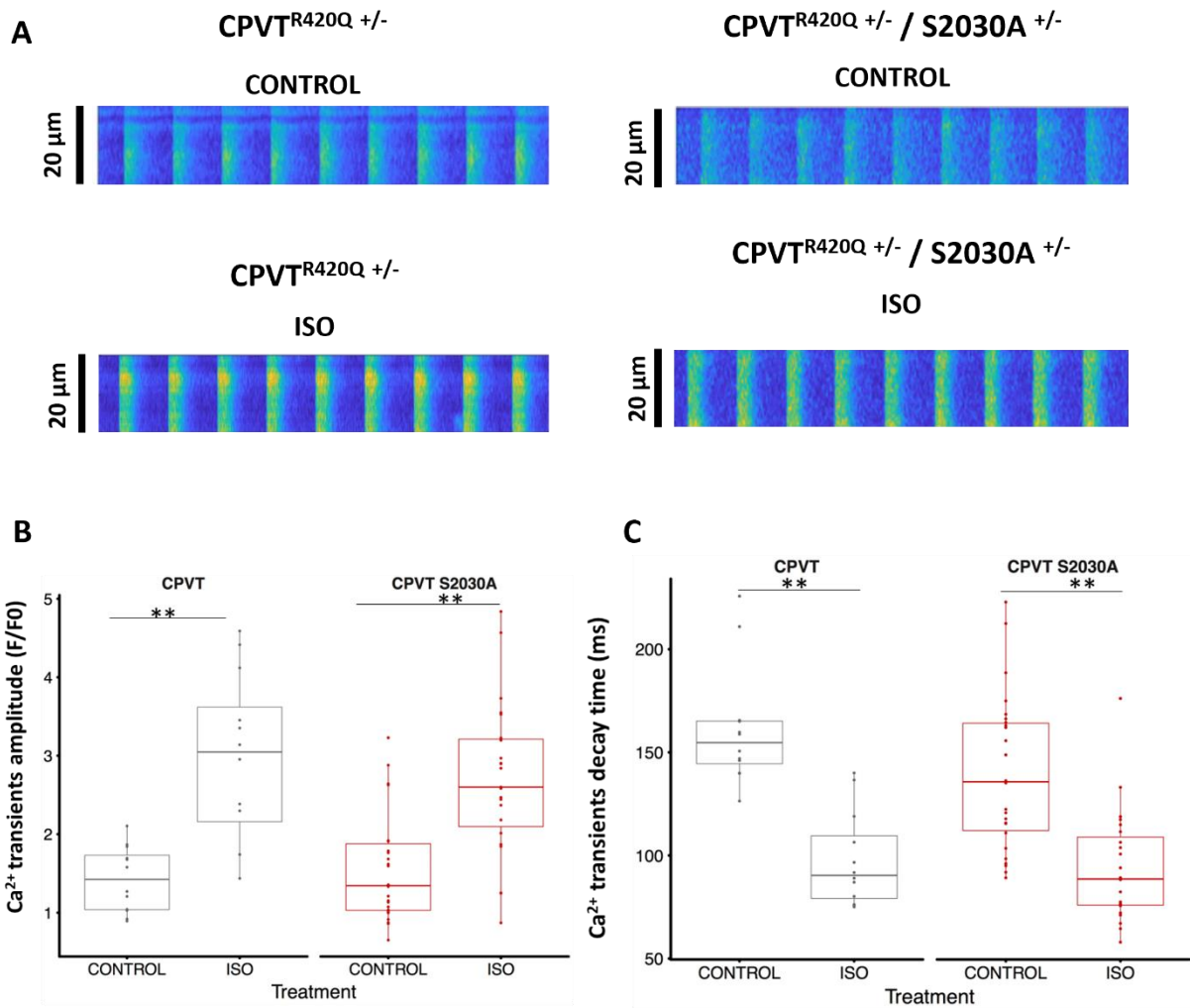


Figure 52- Effet de la phosphorylation de S2030 sur les transitoires calciques dans un modèle arythmique CPVT (RyR2^{R420Q}) lors de la réponse β -adrénergique

- (A) Exemples de transitoires calciques des cardiomyocytes ventriculaires stimulés électriquement en condition basale (CONTROL) et en condition β -adrénergique (ISO, 100 nM)
- (B) Amplitude des transitoires calciques (F/F0)
- (C) Temps de décroissance des transitoires calciques (en ms)

Afin d'étudier si la réduction de la phosphorylation de S2030 dans un modèle CPVT altère la fonction du CEC, nous avons mesuré les caractéristiques des transitoires calciques. Le panneau **A** de la **Figure 52** illustre des exemples de transitoires calciques des modèles CPVT et CPVT/S2030A en condition basale et en condition β -adrénergique.

Le panneau **B de la Figure 52** représente l'amplitude de ces transitoires calciques. On observe que l'amplitude des transitoires en condition basale des CPVT est similaire à celle des CPVT/S2030A. De plus, l'ISO augmente significativement l'amplitude des transitoires dans les deux modèles. Il n'y a pas de différence significative entre les deux modèles en présence d'ISO.

Le panneau **C de la Figure 52** représente le temps de décroissance (en ms) de ces transitoires calciques. On observe que le temps de décroissance des transitoires en condition basale des CPVT n'est pas significativement différent à celui des CPVT/S2030A. De plus, l'ISO accélère significativement le temps de décroissance des transitoires dans les deux modèles. Il n'y a pas de différence significative entre les deux modèles en présence d'ISO. Ainsi, la réduction de la phosphorylation de S2030 dans un modèle CPVT n'a pas d'effet sur les transitoires calciques.

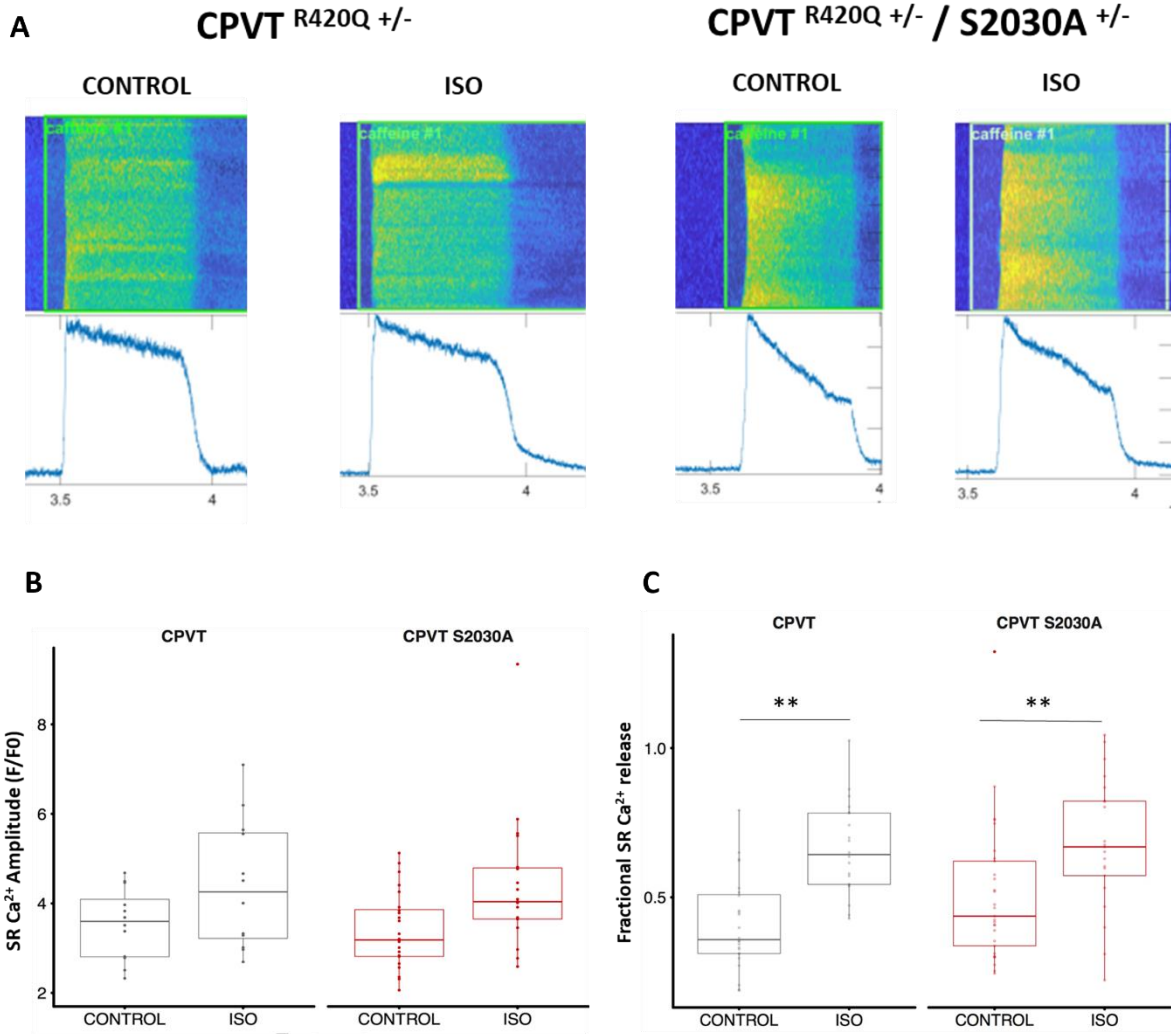


Figure 53- Effet de la phosphorylation de S2030 sur la charge calcique du RS dans un modèle arythmique CPVT (RyR2^{R420Q}) lors de la réponse β -adrenergique

- (A) Exemples de vidange de la charge calcique du RS induit par caféine 20 mM sur cardiomyocytes ventriculaires en condition basale (CONTROL) et en condition β -adrénergique (ISO, 100 nM)
- (B) Amplitude de la charge calcique du RS (F/F₀)
- (C) Libération fractionnaire de Ca²⁺ libérée par le RyR2 (rapport entre l'amplitude des transitoires calciques et l'amplitude de la charge calcique du RS)

Afin de déterminer si l'augmentation de Ca^{2+} waves dans le modèle CPVT/S2030A serait dû à une surcharge en Ca^{2+} du RS, nous avons mesuré l'amplitude de la charge calcique du RS en condition basale et en présence d'ISO (**Fig.53A et B**). On observe que la charge calcique du RS des CPVT/S2030A en condition basale n'est pas significativement différente de celle des CPVT. De plus, l'ISO augmente la charge calcique du RS dans les deux modèles. En présence d'ISO, la charge calcique des CPVT/S2030A n'est pas significativement différente de celle des CPVT. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'augmentation de vagues calciques des CPVT/S2030A n'est pas dû à une surcharge en Ca^{2+} du RS. De plus, la réduction de la phosphorylation de S2030 dans un modèle CPVT ne modifie pas la charge calcique du RS.

Enfin, nous avons mesuré la libération fractionnaire de Ca^{2+} libérée par le RyR2 (**Fig.53C**) via le rapport de l'amplitude des transitoires calciques sur l'amplitude de la charge calcique du RS. Cette mesure nous communique des informations supplémentaires sur l'activité du RyR2. On observe que la libération fractionnaire en condition basale des CPVT/S2030A n'est pas significativement différente de celle des CPVT. De plus, l'ISO augmente significativement la libération de Ca^{2+} via le RyR2 dans les deux modèles. Cependant, en présence d'ISO, il n'y a pas de différence significative entre les CPVT/S2030A et les CPVT. Ainsi, ces résultats suggèrent que la réduction de la phosphorylation de S2030 dans un modèle CPVT ne modifie pas libération fractionnaire de Ca^{2+} libérée par le RyR2.

Conclusion du chapitre II

L'étude sur l'effet de la phosphorylation de RyR2 sur S2030 dans un modèle CPVT a démontré que la réduction de la phosphorylation de S2030 ne réduit pas les libérations diastoliques spontanées calciques chez les modèles CPVT RyR2^{R420Q}. Au contraire, les modèles CPVT/S2030A présentent plus de Ca^{2+} waves en condition basale que les CPVT et ces Ca^{2+} waves apparaissent plus rapidement. De plus, la réduction de la phosphorylation de S2030 dans un modèle CPVT ne modifie pas les caractéristiques des transitoires calciques, ni la charge calcique du RS.

Chapitre 4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. La phosphorylation du RyR2 sur S2030 et la fréquence cardiaque

Notre étude est notamment la première à avoir étudié l'implication de la phosphorylation de S2030 dans le rythme cardiaque sinusal. En effet, les modèles murins S2808A et S2814A présentent une FC in vivo et une fréquence de battement du NSA en condition basale similaire aux WT suggérant l'implication d'autres sites de phosphorylation.⁵⁰⁸

Par l'utilisation des modèles non phosphorylable (S2030A), mimétiquement phosphorylé (S2030D) et des modèles contrôles (WT), nous avons démontré que la phosphorylation de S2030 est impliquée dans le rythme cardiaque sinusal. En effet, nous avons observé que la fréquence moyenne des transitoires calciques des NSA en condition basale des modèles S2030D est plus rapide que celles des WT et des S2030A. De plus, le temps au pic des transitoires calciques en condition basale des cellules sinusales des S2030D est plus rapide que celui des WT et S2030A (**Fig.45C**). Ces résultats sur des NSA isolés sont cohérents avec nos données in vivo. En effet, la FC in vivo à l'état basal des S2030D est plus rapide que celle des WT et S2030A (**Fig.42C**).

La FC plus rapide des S2030D pourrait être notamment lié à l'augmentation du nombre et de la fréquence des Ca^{2+} sparks à l'état basal dans les cellules sinusales des S2030D (**Fig.46B, C**) et suggère que la phosphorylation de S2030 augmente les LCR vers la fin de la DD et accélère l'horloge calcique qui régule l'automatisme du NSA. En effet, les LCR via RyR2 observés vers la fin de la DD dans les cellules sinusales activent l'échangeur NCX qui génère un courant entrant dépolarisant et contribuent à l'automatisme cardiaque.⁵⁹ De plus, l'inhibition de la PKA sur des cellules sinusales a démontré que la phosphorylation par la PKA participe à l'automatisme du NSA.²⁰² En effet, le site de phosphorylation S2030 est un site PKA-dépendant.⁴⁷²

Par ailleurs, il est reconnu que la phosphorylation AMPc-dépendante lors de la réponse β -adrénergique augmente l'activité du RyR2 et notamment la libération de Ca^{2+} sparks.^{202,449,451} Puisque nous avons démontré que la phosphorylation de S2030 contribue à cette réponse β -adrénergique, on suggère que le modèle S2030D mimétise cette réponse β -adrénergique et expliquerait la FC élevée à l'état basal des S2030D. De plus, les RyR2 des cellules HEK transfectées S2030D ont une probabilité d'ouverture significativement plus élevée que les S2030A lorsque les concentrations en Ca^{2+} luminales augmentent.⁵²¹ En effet, cette étude démontre que la phosphorylation de S2030 augmente la probabilité d'ouverture du RyR2 et est cohérente avec nos observations. Cependant, cette étude n'a pas mesuré la probabilité d'ouverture du RyR2 en modifiant les concentrations en Ca^{2+} cytosoliques. Ainsi, il serait

intéressant de mesurer ce paramètre à partir des cœurs des modèles afin de confirmer nos observations.

Récemment, une étude sur un modèle murin ne pouvant être phosphorylable à la fois sur le site S2808 par la PKA et sur le site S2814 par la CaMKII (Double Knock In S2808A/S2814A, DKI) a démontré que le site S2030 est phosphorylé en présence de PKA dans ce modèle sans différence significative avec le groupe WT.⁵¹⁸ La FC basale des souris DKI est notamment plus élevée que celle des WT suggérant que la phosphorylation de S2030 pourrait notamment être responsable de cette différence.

Il serait également intéressant d'étudier les acteurs contribuant à l'horloge membranaire qui régule l'automaticité du NSA en mesurant les courants I_f , I_{CaL} (notamment $Ca_v1.3$) sur cellules sinusales isolées de nos modèles. En effet, si nos modèles S2030D mimétise une réponse β -adrénergique, on s'attendrait alors à une accélération de la cinétique de ces courants comme lors d'une réponse sympathique.^{77,78,104}

II. La phosphorylation de RyR2 sur S2030 et la réponse β -adrénergique

Il a été démontré que les sites S2808 et S2814 ne sont pas impliqués dans la réponse β -adrénergique du NSA. En effet, les modèles murins S2808A et S2814A présentent une FC in vivo et une fréquence de battement du NSA similaire aux WT après réponse β -adrénergique suggérant l'implication d'autres sites de phosphorylation.⁵⁰⁸ Ainsi, nous avons étudié l'implication du site S2030 sur cette réponse dans le NSA.

Nous avons démontré que la phosphorylation de S2030 est essentielle à une réponse β -adrénergique totale du NSA. En effet, les NSA des modèles S2030A présentent une réponse β -adrénergique moindre à l'ISO par rapport aux WT et S2030D. En effet, l'ISO a un effet moindre sur le CL des transitoires calciques des S2030A par rapport aux WT et S2030D (**Fig.45A**). Ces résultats sur NSA isolés sont cohérents avec nos données in vivo (**Fig.43A**). En effet, les souris S2030A présentent également une réponse β -adrénergique moindre au cours du temps in vivo par rapport aux WT et S2030D (**Fig.43C, D**).

Nos résultats sont donc cohérents avec ceux de la littérature. En effet, l'étude de la dynamique calcique sur les cardiomyocytes issues des modèles S2030A a démontré une diminution du CEC et une réduction de libérations diastoliques spontanées (Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves) après ISO par rapport aux WT démontrant ainsi l'importance de la phosphorylation de S2030 dans la réponse β -adrénergique.⁴⁷³ Par ailleurs, les cardiomyocytes ventriculaires issus des modèles S2030A ne présentent pas d'élargissement des dyades après ISO contrairement aux modèles S2808A, S2814A et WT, suggérant un lien potentiel direct entre la phosphorylation du RyR2 sur S2030 et la microarchitecture des cardiomyocytes lors de

la réponse β -adrénergique.³¹² De plus, la réponse β -adrénergique intacte du modèle S2808A/S2814A suggère que la phosphorylation sur S2030 est suffisante à une réponse β -adrénergique physiologique.⁵¹⁸ Cependant, aucune étude dans la littérature n'a encore comparé les modèles S2030A avec les S2030D lors d'une réponse β -adrénergique que ce soit sur cellules ventriculaires ou sinusales.

Nous avons également démontré un effet moindre de l'ISO sur le NSA (**Fig.44B**) et la FC *in vivo* (**Fig.43B**) des modèles S2030D bien que la réponse β -adrénergique des S2030D soit intacte par rapport aux WT. En effet, le CL moyen des transitoires calciques des cellules du NSA (**Fig.44B**) et la FC *in vivo* en condition basale (**Fig.43A**) des modèles S2030D sont plus rapides que ceux des WT. Ainsi, en présence d'ISO, la réponse β -adrénergique ne peut aller au-delà de sa limite physiologique.

Nous avons observé notamment une cohérence entre nos données sur NSA isolé et ceux *in vivo* bien que l'isolement du NSA nous affranchi de la régulation sympathique et parasympathique du SNC. Ainsi, cela soutient l'hypothèse récente que la complexité de structure et l'innervation du NSA s'apparenterait à celle du cerveau humain.^{212,213} Il serait notamment intéressant de visualiser par immunofluorescence sur cœur entier la distribution des neurones adrénergiques (tonus sympathique) et cholinergiques (tonus vagal) du NSA sur nos modèles afin d'étudier l'effet de la phosphorylation de S2030 sur la régulation du NSA.

Il est établi que l'activité électrique est initiée dans la région centrale du NSA. Ce centre initiateur ou « leading site » n'est pas statique et sa position peut être différente selon les conditions physiopathologiques notamment lors d'une réponse β -adrénergique.¹⁸ Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la phosphorylation de S2030 sur le déplacement de ce centre initiateur suite à une stimulation β -adrénergique sur les NSA isolés des modèles S2030A, S2030D et WT par cartographie électrique et optique.

III. La phosphorylation de S2030 et la survenue d'arythmies ventriculaires

Nous avons notamment démontré que les souris S2030D présentent plus d'arythmies que les WT et les S2030A après administration d'épinéphrine et caféine (**Fig.48D, E**). De plus, les arythmies des S2030D ont des scores d'arythmies plus sévères que les WT et les S2030A. Ainsi, ces résultats démontrent que la phosphorylation de S2030 lors d'une réponse β -adrénergique favorise la survenue d'arythmies ventriculaires sévères.

La moindre incidence d'arythmies ventriculaires chez les S2030A est cohérente avec les données sur cardiomyocytes ventriculaires isolés. En effet, les cellules S2030A présentent une réduction de

libérations de Ca^{2+} diastoliques spontanées (Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves) après ISO par rapport aux WT.⁴⁷³ En effet, une augmentation de libérations de Ca^{2+} diastoliques peut favoriser l'augmentation de l'activité de NCX. Le courant dépolarisant induit par NCX peut favoriser la post-dépolarisation retardée (DAD) des cellules favorisant la survenue d'arythmies ventriculaires.^{340,341,522}

Par ailleurs, une étude sur un modèle murin S2808A/2814A, dont le site S2030 est phosphorylé en présence de PKA, a démontré une augmentation de Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves en présence d'ISO dans les cardiomyocytes ventriculaires et que 80% des modèles S2808A/S2814A présentent des arythmies ventriculaires in vivo après stress pharmacologique (adrénaline+ caféine) contre 20% chez les WT.⁵¹⁸ Ainsi, cette étude suggère que la seule phosphorylation de S2030 peut favoriser la survenue d'arythmies ventriculaires lors d'une réponse β -adrénergique.

De façon inattendue, les types d'arythmies sévères les plus fréquentes que nous avons retrouvés chez les S2030D quel que soit le sexe sont les tachycardies ventriculaires bidirectionnelles (**Fig.48B**). Nous avons notamment observé que la durée de ces arythmies chez les S2030D est fréquemment supérieure à 5 minutes et peut même atteindre jusqu'à 14 minutes. Ces types d'arythmies sont généralement observés sur des patients atteints de CPVT lors d'un stress physique ou émotionnel intense et sur des modèles exprimant une mutation sur le RyR2 responsable de CPVT après un stress induit par épinéphrine et caféine.^{329,331,340,523,524} Ainsi, les souris S2030D présentent des arythmies ventriculaires induites similaires à celles de modèles murins dont l'activité de RyR2 est modifiée et donc suggère que l'augmentation de l'activité du RyR2, soit par une mutation, soit par la phosphorylation de S2030 induit des arythmies similaires.

Très peu d'études portant sur les modèles murins CPVT ont étudié jusqu'à présent les taux de phosphorylation sur S2030. En effet, les taux de phosphorylation de S2808 et S2814 à l'état basale d'un modèle murin CPVT RyR2^{R420Q} ne sont pas modifiés mais les taux de phosphorylation de S2030 n'ont pas été étudiés dans ce modèle.³⁵⁰ Une autre étude a étudié les taux de phosphorylation S2808, S2814 et S2030 en condition basale et en présence d'ISO à partir de cardiomyocytes ventriculaires du modèle CPVT RyR2^{R420Q}. En présence d'ISO, les cardiomyocytes CPVT présentent une augmentation significative des taux de phosphorylation de S2814 et une tendance à l'augmentation des taux de phosphorylation de S2030 bien que la différence ne soit pas statistiquement différente ($p=0.13$) dû probablement à une distribution hétérogène des résultats.⁵²⁵

Par ailleurs, l'étude des taux de phosphorylation de S2030 dans les modèles arythmiques cardiaques reste très peu documentée. Une étude a notamment démontré une augmentation des taux de phosphorylation de S2030 à partir de tissus ventriculaires de patients atteints de cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (ARVC).⁴⁹⁶

Afin de soutenir nos résultats, il serait intéressant d'étudier les libérations de Ca^{2+} diastoliques et l'activité électrique lors de la réponse β -adrénergique des cardiomyocytes ventriculaires des modèles S2030D comparés aux S2030A et WT par technique couplée de patch-clamp et microscopie confocale. En effet, les arythmies ventriculaires retrouvées chez les S2030D pourrait être la conséquence d'une augmentation de libérations de Ca^{2+} diastolique favorisant les post-dépolarisations membranaires retardées.

IV. La phosphorylation de S2030 et les autres sites de phosphorylation

L'étude des taux de phosphorylation de S2808 et S2814 dans les ventricules a montré que les phosphorylations de S2808 et S2814 en condition basale ne sont pas significativement différent chez les S2030A par rapport aux WT (**Fig.50A, B**). Cependant, le taux de phosphorylation de S2814 est significativement augmenté chez les S2030D contrairement aux WT et S2030A. Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 induit une augmentation de la phosphorylation de S2814 à l'état basal.

Dans la littérature, aucune étude jusqu'à présent n'a étudié les taux de phosphorylation de S2808 et S2814 dans les modèles S2030D. Cependant, une étude sur un modèle S2030A a démontré une augmentation significative des taux de phosphorylation de S2808 et S2814 en condition basale par rapport aux WT.⁴⁷³ Ces résultats ne sont pas cohérents avec nos observations et suggère potentiellement une différence liée à la normalisation des échantillons. En effet, nous avons normalisés nos échantillons à la quantité de protéines totales de chaque échantillon tandis que Potenza et al., ont normalisés sur la quantité d'une protéine ubiquitaire (GAPDH). En effet, cette différence de technique peut induire des différences de résultats.^{526,527}

De plus, nos résultats suggèrent alors que l'augmentation significative de phosphorylation de S2814 chez les S2030D pourrait induire une augmentation de la probabilité d'ouverture du RyR2 et expliquer la survenue d'arythmies chez les S2030D lors d'un stress intense. En effet, la phosphorylation de RyR2 sur S2814 est dépendante de la CaMKII. Cette kinase est activée par le complexe Ca^{2+} /Calmoduline (CaM). Ainsi, on peut supposer que le RyR2 des S2030D étant plus actif libère plus de Ca^{2+} . Cette augmentation de Ca^{2+} cytosolique activerait la CaMKII et conduirait à la phosphorylation de S2814. En effet, il est établi que la phosphorylation de S2814 contribue notablement au mécanisme arythmogène de l'insuffisance cardiaque.⁵⁰⁹ De plus, la phosphorylation de S2814 augmente la probabilité d'ouverture de RyR2 conduisant à une augmentation des libérations de Ca^{2+} diastoliques du RyR2.⁵¹⁰ La phosphorylation de S2814 contribue ainsi à l'apparition d'épisodes d'arythmies ventriculaires. En effet,

des modèles murins S2814D ont démontré des tachycardies ventriculaires soutenues voire des épisodes de mort subite à la suite d'une stimulation β -adrénergique (Epinéphrine/caféine) ou électrique.⁵¹² Par ailleurs, l'augmentation de l'activité du RyR2 par phosphorylation de S2814 est notamment dû à une réduction de l'affinité de la CaM pour le RyR2 et conduit à un changement conformationnel du canal favorisant les libérations diastoliques de Ca^{2+} .⁵¹³ Ainsi, il serait intéressant de mesurer l'affinité de la CaM pour le RyR2 dans nos modèles afin d'étudier si la phosphorylation de S2030 est impliquée dans un changement conformationnel du RyR2 lors de la réponse β -adrénergique.

Par ailleurs, l'augmentation de la phosphorylation du site S2814 à l'état basal chez les S2030D soutient l'hypothèse selon laquelle les sites S2030 (PKA) et S2814 (CaMKII) seraient co-dépendants bien qu'ils soient situés sur des sérines éloignées et phosphorylées par différentes kinases.^{410,517} En effet, l'ablation de la phosphorylation de S2808 dans un modèle murin (S2808A) conduit à l'augmentation significative des taux de phosphorylation de S2030 et S2815 après stimulation β -adrénergique de manière Ca^{2+} -dépendante.

Enfin, nos résultats ont été obtenus à partir d'échantillons de tissus ventriculaires en condition basale mais il serait nécessaire d'étudier les taux de phosphorylation de S2808 et S2814 en présence d'ISO dans nos modèles afin d'étudier l'effet de la phosphorylation de S2030 sur les sites de phosphorylation voisins lors d'une réponse β -adrénergique. Par ailleurs, les mêmes analyses devront être faites sur tissus de NSA isolés afin de déterminer si l'augmentation de Ca^{2+} sparks dans les cellules sinusales des S2030D serait également lié à une augmentation de la phosphorylation de S2814 et donc à une augmentation de l'activité du RyR2.

V. La phosphorylation de S2030 et l'activité du RyR2

Nous avons démontré que les cellules sinusales des S2030D présentent un nombre et une fréquence de Ca^{2+} sparks plus élevés que celles des WT et S2030A (**Fig.46**). De plus, ces Ca^{2+} sparks seraient plus longs et plus larges que ceux des WT et des S2030A (**Fig.47B, D**). Ainsi, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de S2030 joue un rôle sur l'activité du RyR2 in situ et notamment sur sa probabilité d'ouverture lors de la phase diastolique. En effet, l'étude sur un modèle murin S2808A/S2814 dont le site S2030 est phosphorylé en présence de PKA a démontré une augmentation de la fréquence de Ca^{2+} sparks dans les cardiomyocytes ventriculaires en condition basale et en présence d'ISO.⁵¹⁸ Ainsi, cette étude démontre que la seule phosphorylation de S2030 augmente les libérations de Ca^{2+} diastoliques via le RyR2 et augmente son activité in situ.

Cela suggère également que la phosphorylation de S2030 augmente l'activité du RyR2 en augmentant la probabilité d'ouverture du canal. En effet, les RyR2 des cellules HEK S2030D démontrent une

probabilité d'ouverture significativement plus élevée que les RyR2 des cellules S2030A lorsque les concentrations en Ca^{2+} luminales augmentent.⁵²¹ Cela signifierait alors que la phosphorylation de S2030 augmente la probabilité d'ouverture du canal en augmentant sa sensibilité au Ca^{2+} luminale.

Cependant, nous avons étudié la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} par fixation de ryanodine tritiée au RyR2 sur homogénats de cœur entier par technique de *Radiobinding assay*. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes (**Fig.49B, C**). Nos résultats sont notamment cohérents avec les résultats obtenus sur cellules HEK S2030D et S2030A utilisant la même technique.⁴⁹⁵ En effet, cette étude a démontré que la sensibilité du RyR2 tritiée au Ca^{2+} n'était pas significativement différente entre les groupes mutants et les WT. Cependant, la technique de *Radiobinding assay* ne permet pas de reproduire les conditions physiologiques cellulaires et de distinguer la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} cytosolique et luminale. En effet, la technique d'incorporation de canaux sur bicouche lipidique est plus appropriée puisqu'elle reproduit les compartiments cytosoliques et luminales et permet de mesurer la probabilité d'ouverture du RyR2 selon la modification des concentrations en Ca^{2+} cytosolique et luminale.

Par ailleurs, nous avons également observé que l'ISO augmente la fréquence de Ca^{2+} sparks dans les cellules sinusales des S2030A contrairement aux WT (**Fig.46B**). On suggère alors que cette augmentation en présence d'ISO pourrait être la conséquence de la moindre réponse β -adrénergique des cellules sinusales S2030A. En effet, en présence d'ISO, le CL des cellules S2030A est significativement plus long que celui des WT (**Fig.45A**). Ainsi, cela conduirait à un temps diastolique plus long entre deux transitoires et favoriserait les libérations de Ca^{2+} diastoliques du RyR2. Par ailleurs, nous avons observé que le pourcentage de cellules présentant des Ca^{2+} sparks en condition basale et en présence d'ISO était similaire entre les WT et les S2030A (**Fig.46C**). En effet, cela signifie que la proportion de cellules S2030A avec des Ca^{2+} sparks reste faible mais que ces cellules ont présentés un nombre important de Ca^{2+} sparks. Cela démontre bien que l'absence de phosphorylation sur S2030 n'augmente pas l'activité du RyR2 en soit mais peut favoriser les libérations diastoliques du RyR2 parce que le temps diastolique est plus long.

Ainsi, plusieurs hypothèses sont à considérer afin de mieux comprendre comment la phosphorylation de S2030 augmente l'activité du canal. Bien qu'il ait été démontré que la phosphorylation de S2030 augmente la probabilité d'ouverture du RyR2 en augmentant sa sensibilité au Ca^{2+} luminale, cette étude n'explique pas comment la phosphorylation d'un site cytosolique du RyR2 ait un effet sur la sensibilité du RyR2 au Ca^{2+} dans sa partie luminale.⁵²¹

Premièrement, on peut supposer que les sites de phosphorylation sont co-dépendants et que la phosphorylation de S2030 modifie le taux de phosphorylation de sites de phosphorylation voisins,

notamment S2814, qui conduit à une modification de la probabilité d'ouverture et donc de l'activité du RyR2. En effet, la phosphorylation de S2814 augmente la probabilité d'ouverture du RyR2 conduisant à une augmentation des libérations de Ca^{2+} diastoliques du RyR2.⁵¹⁰ De plus, nos résultats suggèrent que l'augmentation significative de la phosphorylation de S2814 chez les S2030D pourrait induire une augmentation de la probabilité d'ouverture du RyR2 et expliquer la survenue d'arythmies ventriculaires sévères chez les S2030D lors d'un stress intense.

Deuxièmement, on peut supposer que la phosphorylation de S2030 ait un effet sur la conformation structurelle du RyR2 via la modulation de la CaM. En effet, les sites de phosphorylation PKA et CaMKII-dépendants se situent sur le pont solénoïde (B-sol) à proximité du domaine central du canal et des sites de liaison aux Ca^{2+} (EF)(**Fig.22**).^{111,287} Par ailleurs, l'augmentation de la phosphorylation de S2814 qui conduit à une augmentation de l'activité du canal est notamment la conséquence d'une réduction de l'affinité de la CaM pour le RyR2. La réduction de l'affinité de cette protéine stabilisatrice conduit à un changement conformationnel du canal favorisant les libérations diastoliques de Ca^{2+} .⁵¹³ Ainsi, on peut suggérer que la phosphorylation de S2030 a un effet sur l'affinité de la CaM pour le RyR2. En effet, il a été suggéré que la phosphorylation de S2030 module l'inactivation du RyR2 CaM-dépendante.⁵²⁸ On pourrait alors s'attendre à une réduction de l'affinité de la CaM pour le RyR2 dans nos modèles S2030D associée à l'augmentation de la phosphorylation de S2814. Ceci modifierait la conformation structurelle du canal et augmenterait la probabilité d'ouverture du RyR2. L'augmentation de l'activité du RyR2 favoriserait alors les libérations de Ca^{2+} diastoliques et la survenue d'arythmies ventriculaires sévères lors d'un stress intense comme observées dans nos modèles S2030D. Par ailleurs, la réduction d'affinité de la CaM pour le RyR2 pourrait notamment être un facteur commun entre les modèles murins S2030D et CPVT qui développent des tachycardies ventriculaires bidirectionnelles (BDVT) après l'induction d'un stress par injection d'épinéphrine et de caféine. En effet, des mutations de la CaM ont été identifiées comme responsable d'une forme autosomique dominante de CPVT (CPVT4) et une réduction de l'affinité de la CaM a été démontré sur un modèle murin CPVT1 (RyR2^{R2474S}).^{356,407,408}

Troisièmement, on peut supposer que la phosphorylation de S2030 ait un effet sur l'organisation des clusters de RyR2 lors d'une réponse β -adrénergique. En effet, l'organisation et l'agencement des clusters de RyR2 sont modulés selon l'état de la phosphorylation PKA et CaMKII-dépendante.^{310,311} De plus, une dispersion de ces clusters a été observée lors d'une réponse β -adrénergique prolongée.³¹³ L'altération de l'arrangement et l'organisation des clusters de RyR2 est liée à une libération asynchrone de Ca^{2+} sparks pouvant favoriser la survenue d'arythmies.^{314,316} En effet, les Ca^{2+} sparks d'un RyR2 peuvent activer les RyR2 voisins et induire des relargages de Ca^{2+} propagés dans l'espace et le temps qui activent l'échangeur NCX et favorise des post-dépolarisations membranaires retardées. Ainsi, on peut supposer que les arythmies ventriculaires plus fréquemment observés chez les S2030D soient

la conséquence d'une réorganisation des clusters de RyR2 lors de la réponse β -adrénergique. En effet, la phosphorylation mimétique de S2030 dans nos modèles S2030D peut notamment s'apparenter à une réponse β -adrénergique prolongée car le site S2030 est continuellement phosphorylé sans régulation possible par les phosphatases.

VI. Différences liées au sexe

Afin de distinguer des différences potentielles liées au sexe, nous avons séparé les données *in vivo* entre les mâles et les femelles. Nous avons notamment démontré que les femelles quel que soit le génotype ont un rythme cardiaque sinusal plus élevée que les mâles (**Fig.42C**). Lorsqu'on compare les données des WT mâles et des WT femelles, on observe au bout de 10 minutes une diminution progressive de la réponse β -adrénergique des WT femelles contrairement aux WT mâles (**Fig.43C, D**). De plus, la réponse β -adrénergique au cours du temps des S2030A est diminuée davantage chez les femelles que chez les mâles par rapport aux WT. Lors d'une réponse à un stress élevée (Epinéphrine+caféine) les S2030D femelles présentent des scores d'arythmies moins sévères que les S2030D mâles (**Fig.48D, E**). Ainsi, ces résultats démontrent qu'il existe des différences liées au sexe lors de la réponse β -adrénergique.

Dans la littérature, il a été démontré que le cœur des hommes et des femmes diffère à la fois par la taille, la masse et la force contractile.⁵²⁹ En effet, le cœur des femmes est plus petit et environ 26% plus léger que celui des hommes.^{530,531} Cette différence de taille conduit à une augmentation de la contractilité cardiaque et un rythme cardiaque sinusal plus élevée chez les femmes que chez les hommes.⁵³²

Nos observations sur la réponse β -adrénergique sont notamment cohérentes avec celles dans la littérature. En effet, les modèles femelles présentent une réponse β -adrénergique moindre que les mâles, associés à une susceptibilité moindre de développer des arythmies.²⁴⁴ Les taux en AMPc chez les femelles sont moins importants que les mâles et cette différence pouvait être lié en partie à l'expression plus importante des PDE chez les femelles. Cette étude suggère alors qu'une activité plus importante des PDE serait responsable de la différence de réponse β -adrénergique.²⁴⁵ De plus, les femmes disposeraient d'un contrôle vagal plus important sur la réponse sympathique que les hommes et expliquerait une moindre réponse β -adrénergique chez les femmes.⁵³³

Par ailleurs, l'absence de différence entre les mâles et les femelles sur les NSA isolés nous a notamment conduit à regrouper les données. En effet, cette absence de différence pourrait être la conséquence de l'absence d'hormones sur les NSA isolés qui régulerait la réponse sympathique. En effet, des rats femelles ayant subi une ovariectomie ont montré des taux en PKA plus important que les rats femelles

contrôles suggérant que les œstrogènes modulent la production de l'AMPc et ainsi la réponse sympathique.^{246,247} Cependant, l'implication des hormones sexuelles sur les différences mâles-femelles dans la fonction cardiaque reste encore peu documenté. De plus, le tonus sympatho-vagal sur la fonction cardiaque est différent selon le sexe.⁵³³ Ainsi, l'absence de différence entre les NSA isolés des mâles et des femelles pourrait également être la conséquence de l'absence de tonus sympatho-vagal du SNC sur tissu isolé.

VII. La phosphorylation de S2030 dans un modèle arythmique

Nous avons émis l'hypothèse que la réduction de la phosphorylation de S2030 pourrait réduire les libérations diastoliques de Ca^{2+} dans un modèle CPVT RyR2^{R420Q} (CPVT) car les cardiomyocytes ventriculaires isolés de souris S2030A présentent moins de libérations diastoliques spontanées sous formes de Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} waves que les souris WT lors d'une réponse β -adrénergique.⁴⁷³ Les résultats obtenus par Potenza et al., sont notamment cohérents avec la moindre incidence d'arythmies ventriculaires chez les S2030A (**Fig.48D, E**). Cependant, nous avons démontré que la réduction de la phosphorylation de S2030 ne réduit pas les libérations diastoliques spontanées calciques chez les modèles CPVT RyR2^{R420Q}. Au contraire, les modèles CPVT/S2030A présentent plus de Ca^{2+} waves en condition basale que les CPVT (**Fig.51B**) et ces Ca^{2+} waves apparaissent plus rapidement (**Fig.51D**). De plus, en présence d'ISO, les CPVT/S2030A présentent autant de Ca^{2+} waves que les CPVT (**Fig.51C**). Ces résultats réfutent donc notre hypothèse initiale et peuvent s'expliquer selon plusieurs hypothèses.

Premièrement, on peut supposer que la phosphorylation de S2030 bien que partielle dans notre modèle CPVT/S2030A augmente la phosphorylation de S2814 en condition basale et ainsi l'activité du RyR2 comme démontré précédemment. En effet, le modèle CPVT/S2030A dans notre étude est issu du croisement de souris homozygotes S2030A et de souris CPVT RyR2^{R420Q} hétérozygote. Ainsi, notre modèle CPVT/S2030A est constitué de deux mutations hétérozygotes. Cela signifie alors que la phosphorylation de S2030 n'est pas complètement absente mais réduite de moitié. Ainsi, on peut supposer que la phosphorylation partielle de S2030 conduit à la phosphorylation de S2814 en condition basale et augmente la probabilité d'ouverture du RyR2. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les modèles CPVT/S2030A présentent plus de Ca^{2+} waves en condition basale que les CPVT.

Deuxièmement, on peut supposer que la réduction partielle de la phosphorylation de S2030 dans notre modèle CPVT/S2030A contribue à une réorganisation des dyades induit par l'altération de la JPH2. La JPH2 est une protéine impliquée dans l'organisation des dyades et le maintien d'une distance physiologique entre la membrane du RS et la membrane plasmique. La JPH2 est notamment colocalisée avec le RyR2 et interagit avec celui-ci via son domaine C-terminal.⁴²⁴ En effet, l'étude d'une mutation

du RyR2 associée à la CPVT (RyR2^{R420Q}) a démontré une réduction de l'interaction entre la JPH2 et le RyR2 et un remodelage des dyades. Cette altération structurelle a pour conséquence une augmentation des libérations de Ca²⁺ diastolique sous forme de Ca²⁺ sparks et waves, favorisant la survenue d'arythmies dans ce modèle CPVT RyR2^{R420Q}.³⁵⁰ Ainsi, l'altération de la JPH2 dans le modèle CPVT RyR2^{R420Q} altère la distance physiologique entre les LTCC et les RyR2 et favorise l'activation de RyR2 par mécanisme de CICR. Par ailleurs, la phosphorylation de S2030 est nécessaire à l'expansion des dyades lors d'une réponse β -adrénergique.³¹² On peut donc supposer que la réduction partielle de cette phosphorylation contribue également à l'altération de cette distance physiologique entre les LTCC et les RyR2 et favorise l'activation de RyR2 par mécanisme de CICR. Ceci expliquerait pourquoi les CPVT/S2030A présentent autant de Ca²⁺ waves que les CPVT lors d'une réponse β -adrénergique.

CONCLUSION GENERALE

A travers diverses approches expérimentales (du moléculaire à *l'in vivo*), mon projet de thèse vise à mieux comprendre la complexité des mécanismes impliqués dans l'automatisme cardiaque en étudiant notamment l'implication potentielle de la phosphorylation du canal de libération calcique, le RyR2, lors d'une réponse β -adrénergique.

Mes travaux de thèse portent plus précisément sur la contribution de la phosphorylation PKA-dépendante du RyR2 sur une sérine 2030 (S2030) dans la régulation de l'automatisme cardiaque lors d'une réponse β -adrénergique. A l'aide de modèles murins génétiquement modifiés, notre étude démontre que la phosphorylation du RyR2 sur S2030 a un effet sur la réponse chronotrope positive des cellules du NSA isolé et module la réponse β -adrénergique *in vivo*. Lors de la phosphorylation du RyR2 sur S2030, une augmentation de l'activité diastolique de RyR2 sous forme de Ca^{2+} sparks, en fréquence et en durée d'évènements, accélère l'horloge calcique impliquée dans la phase de dépolarisation diastolique du potentiel d'action des cellules du NSA. L'accélération de cette horloge calcique participe à l'effet chronotrope positif lors d'un stress. Cependant, en situation de stress intense (Epinéphrine +caféine), la phosphorylation de S2030 favorise la survenue d'arythmies ventriculaires.

Afin de mieux situer la contribution de la phosphorylation du RyR2 sur S2030 sur la modulation de l'automaticité des cellules du NSA, il serait intéressant d'étudier les canaux contribuant à l'horloge membranaire qui régule l'automaticité du NSA en mesurant les courants I_f , I_{CaL} (notamment $\text{Cav}1.3$) sur cellules sinusales isolées de nos modèles par technique de patch-clamp.^{77,78,104} Par ailleurs, il est établi que l'activité électrique est initiée dans la région centrale du NSA. Ce centre initiateur ou « leading site » n'est pas statique et sa position peut être différente selon les conditions physiopathologiques notamment lors d'une réponse β -adrénergique.¹⁸ Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la phosphorylation de S2030 sur le déplacement de ce centre initiateur suite à une stimulation β -adrénergique sur les NSA isolés de nos modèles par cartographie électrique et optique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Keith A, Flack M. The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. In: *Journal of anatomy and physiology*. 1907.
2. Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, Chandler NJ, Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat*. 2009;22:99–113.
3. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev*. 2005;85:1205–1253.
4. Besterman E, Creese R. Waller--pioneer of electrocardiography. *Heart*. 1979;42:61–64.
5. Holmqvist F, Carlson J, Platonov PG. Detailed ECG Analysis of Atrial Repolarization in Humans. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2009;14:13–18.
6. James TN. Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: Part II--function. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;45:327–360.
7. Dobrzynski H, Anderson RH, Atkinson A, Borbas Z, D'Souza A, Fraser JF, Inada S, Logantha SJRJ, Monfredi O, Morris GM, Moorman AFM, Nikolaidou T, Schneider H, Szuts V, Temple IP, Yanni J, Boyett MR. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacol Ther*. 2013;139:260–288.
8. Weisbrod D, Khun SH, Bueno H, Peretz A, Attali B. Mechanisms underlying the cardiac pacemaker: the role of SK4 calcium-activated potassium channels. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37:82–97.
9. Opthof T. The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res*. 2000;45:175–176.
10. Boyett M. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res*. 2000;47:658–687.
11. Verheijck EE, Wessels A, Van Ginneken ACG, Bourier J, Markman MWM, Vermeulen JLM, De Bakker JMT, Lamers WH, Opthof T, Bouman LN. Distribution of Atrial and Nodal Cells Within the Rabbit Sinoatrial Node: Models of Sinoatrial Transition. *Circulation*. 1998;97:1623–1631.
12. Verheijck E. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res*. 2001;52:40–50.
13. 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-Heart Circ Physiol*. 1997;272:H2793–H2806.
14. Jansen JA, Van Veen TAB, De Bakker JMT, Van Rijen HVM. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:76–82.
15. Kumar NM, Gilula NB. The Gap Junction Communication Channel. *Cell*. 1996;84:381–388.

16. Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC. Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. *Circ Res.* 1992;70:438–444.
17. Hervé J-C, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexines et canaux jonctionnels. Leurs rôles dans la propagation de l'activité électrique cardiaque et le développement du cœur. *Pathol Biol.* 2008;56:334–341.
18. Lang D, Glukhov AV. Cellular and Molecular Mechanisms of Functional Hierarchy of Pacemaker Clusters in the Sinoatrial Node: New Insights into Sick Sinus Syndrome. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8:43.
19. Kim MS, Maltsev AV, Monfredi O, Maltseva LA, Wirth A, Florio MC, Tsutsui K, Riordon DR, Parsons SP, Tagirova S, Ziman BD, Stern MD, Lakatta EG, Maltsev VA. Heterogeneity of calcium clock functions in dormant, dysrhythmically and rhythmically firing single pacemaker cells isolated from SA node. *Cell Calcium.* 2018;74:168–179.
20. Bychkov R, Juhaszova M, Tsutsui K, Coletta C, Stern MD, Maltsev VA, Lakatta EG. Synchronized Cardiac Impulses Emerge From Heterogeneous Local Calcium Signals Within and Among Cells of Pacemaker Tissue. *JACC Clin Electrophysiol.* 2020;6:907–931.
21. Fenske S, Hennis K, Rötzer RD, Brox VF, Becirovic E, Scharf A, Gruner C, Ziegler T, Mehlfeld V, Brennan J, Efimov IR, Pauža AG, Moser M, Wotjak CT, Kupatt C, Gönner R, Zhang R, Zhang H, Zong X, Biel M, Wahl-Schott C. cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells. *Nat Commun.* 2020;11:5555.
22. Easterling M, Rossi S, Mazzella AJ, Bressan M. Assembly of the Cardiac Pacemaking Complex: Electrogenic Principles of Sinoatrial Node Morphogenesis. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8:40.
23. Lovell NH, Cloherty SL, Celler BG, Dokos S. A gradient model of cardiac pacemaker myocytes. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;85:301–323.
24. Inada S, Zhang H, Tellez JO, Shibata N, Nakazawa K, Kamiya K, Kodama I, Mitsui K, Dobrzynski H, Boyett MR, Honjo H. Importance of Gradients in Membrane Properties and Electrical Coupling in Sinoatrial Node Pacing. *PLoS ONE.* 2014;9:e94565.
25. Verheijck EE, Wilders R, Joyner RW, Golod DA, Kumar R, Jongsma HJ, Bouman LN, Ginneken ACGV. Pacemaker Synchronization of Electrically Coupled Rabbit Sinoatrial Node Cells. *J Gen Physiol.* 1998;111:95–112.
26. López Garza G, Castellanos NP, Godínez R. Cell-to-cell modeling of the interface between atrial and sinoatrial anisotropic heterogeneous nets. *Comput Biol Chem.* 2017;68:245–259.
27. Zhang H, Holden AV, Boyett MR. Gradient Model Versus Mosaic Model of the Sinoatrial Node. *Circulation.* 2001;103:584–588.
28. Fedorov VV, Schuessler RB, Hemphill M, Ambrosi CM, Chang R, Voloshina AS, Brown K, Hucker WJ, Efimov IR. Structural and Functional Evidence for Discrete Exit Pathways That Connect the Canine Sinoatrial Node and Atria. *Circ Res.* 2009;104:915–923.
29. Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li J, Liu J, Tellez J, Greener ID, Honjo H, Billeter R, Lei M, Zhang H, Efimov IR, Dobrzynski H. Connexins in the Sinoatrial and Atrioventricular Nodes [Internet]. In: Dhein S, editor. *Advances in Cardiology*. Basel: KARGER; 2006 [cited 2024 Sep 13]. p. 175–197. Available from: <https://karger.com/books/book/2537/chapter/5741943>

30. Kirchhof CJHJ, Bonke FIM, Allessie MA, Lammers WJEP. The influence of the atrial myocardium on impulse formation in the rabbit sinus node. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1987;410:198–203.
31. Billette J, Tadros R. An integrated overview of AV node physiology. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2019;42:805–820.
32. Ono N, Yamaguchi T, Ishikawa H, Arakawa M, Takahashi N, Saikawa T, Shimada T. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 2009;72:139–149.
33. Callewaert G, Carmeliet E, Vereecke J. Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. *J Physiol*. 1984;349:643–661.
34. Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, Vanrijen H, Abran P, Jongsma H, Nargeot J, Gros D. Architectural and functional asymmetry of the His–Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63:77–86.
35. DELMAR M. Role of potassium currents on cell excitability in cardiac ventricular myocytes. *J Cardiovasc. Electrophysiol*. 1992;
36. Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res*. 1994;74:1071–1096.
37. Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1991;97:973–1011.
38. Li X, Zhang R, Zhao B, Lossin C, Cao Z. Cardiotoxicity screening: a review of rapid-throughput in vitro approaches. *Arch Toxicol*. 2016;90:1803–1816.
39. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*. 1985;85:247–289.
40. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198–205.
41. 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;276:800–806.
42. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 1988;395:233–253.
43. Ridgway EB, Gilkey JC, Jaffe LF. Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74:623–627.
44. Allen DG, Blinks JR. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature*. 1978;273:509–513.
45. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle. *Science*. 1993;262:740–744.
46. Cheng H, Lederer WJ. Calcium Sparks. *Physiol Rev*. 2008;88:1491–1545.

47. Brochet DXP, Yang D, Cheng H, Lederer WJ. Elementary Calcium Release Events from the Sarcoplasmic Reticulum in the Heart [Internet]. In: Islam MdS, editor. *Calcium Signaling*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012 [cited 2024 Oct 4]. p. 499–509. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2888-2_21
48. Woo S-H, Cleemann L, Morad M. Spatiotemporal Characteristics of Junctional and Nonjunctional Focal Ca²⁺ Release in Rat Atrial Myocytes. *Circ Res* [Internet]. 2003 [cited 2024 Sep 12];92. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000051887.97625.07>
49. Vinogradova TM, Brochet DXP, Sirenko S, Li Y, Spurgeon H, Lakatta EG. Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Pumping Kinetics Regulates Timing of Local Ca²⁺ Releases and Spontaneous Beating Rate of Rabbit Sinoatrial Node Pacemaker Cells. *Circ Res*. 2010;107:767–775.
50. Bozler E. The initiation of impulses in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 1943;138(2):273–82.
51. Spach MS, Kootsey JM. The nature of electrical propagation in cardiac muscle. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1983;244:H3–H22.
52. West TC. Ultramicroelectrode recording from the cardiac pacemaker. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1955;
53. DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol*. 1986;377:61–88.
54. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and Regulation of the Heart Automaticity. *Physiol Rev*. 2008;88:919–982.
55. Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME. Functional role of voltage gated Ca²⁺ channels in heart automaticity. *Front Physiol* [Internet]. 2015 [cited 2024 Sep 12];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2015.00019/abstract>
56. Rubenstein DS, Lipsius SL. Mechanisms of automaticity in subsidiary pacemakers from cat right atrium. *Circ Res*. 1989;64:648–657.
57. Lakatta EG. Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in the heart. *Cardiovasc Res*. 1992;26:193–214.
58. Zhou Z, Lipsius SL. Properties of the pacemaker current (If) in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Physiol*. 1992;453:503–523.
59. Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol*. 2000;524:415–422.
60. Bogdanov KY, Maltsev VA, Vinogradova TM, Lyashkov AE, Spurgeon HA, Stern MD, Lakatta EG. Membrane Potential Fluctuations Resulting From Submembrane Ca²⁺ Releases in Rabbit Sinoatrial Nodal Cells Impart an Exponential Phase to the Late Diastolic Depolarization That Controls Their Chronotropic State. *Circ Res*. 2006;99:979–987.
61. Monfredi O, Maltsev VA, Lakatta EG. Modern Concepts Concerning the Origin of the Heartbeat. *Physiology*. 2013;28:74–92.

62. Guo J, Mitsuiye T, Noma A. The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1997;433:390–396.
63. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker. *Circ Res*. 2010;106:659–673.
64. Hennis K, Biel M, Wahl-Schott C, Fenske S. Beyond pacemaking: HCN channels in sinoatrial node function. *Prog Biophys Mol Biol*. 2021;166:51–60.
65. Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res*. 2007;73:729–738.
66. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*. 1998;393:587–591.
67. Lee C-H, MacKinnon R. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell*. 2017;168:111-120.e11.
68. Mangoni M. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sinoatrial cells. *Cardiovasc Res*. 2001;52:51–64.
69. Ishii TM, Takano M, Xie L-H, Noma A, Ohmori H. Molecular Characterization of the Hyperpolarization-activated Cation Channel in Rabbit Heart Sinoatrial Node. *J Biol Chem*. 1999;274:12835–12839.
70. Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:9391–9396.
71. Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. HCN Channels—Modulators of Cardiac and Neuronal Excitability. *Int J Mol Sci*. 2015;16:1429–1447.
72. Herrmann S, Layh B, Ludwig A. Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: An expression study in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:997–1006.
73. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Heteromeric HCN1–HCN4 Channels: A Comparison with Native Pacemaker Channels from the Rabbit Sinoatrial Node. *J Physiol*. 2003;549:347–359.
74. Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, Shigemoto R, Accili EA. HCN2 and HCN4 Isoforms Self-assemble and Co-assemble with Equal Preference to Form Functional Pacemaker Channels. *J Biol Chem*. 2007;282:22900–22909.
75. Stieber J, Herrmann S, Feil S, Löster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:15235–15240.
76. Fenske S, Mader R, Scharr A, Pappas C, Cao-Ehlker X, Michalakis S, Shaltiel L, Weidinger M, Stieber J, Feil S, Feil R, Hofmann F, Wahl-Schott C, Biel M. HCN3 Contributes to the Ventricular Action Potential Waveform in the Murine Heart. *Circ Res*. 2011;109:1015–1023.

77. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 1991;351:145–147.
78. Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol Ther*. 2005;107:59–79.
79. Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. Structure and Function of Cardiac Pacemaker Channels. *Cell Physiol Biochem*. 1999;9:179–186.
80. Wahl-Schott C, Fenske S, Biel M. HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;15:83–90.
81. Fenske S, Krause SC, Hassan SIH, Becirovic E, Auer F, Bernard R, Kupatt C, Lange P, Ziegler T, Wotjak CT, Zhang H, Hammelmann V, Pappas C, Biel M, Wahl-Schott CA. Sick Sinus Syndrome in HCN1-Deficient Mice. *Circulation*. 2013;128:2585–2594.
82. Ludwig A. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J*. 2003;22:216–224.
83. Yaniv Y, Tsutsui K, Lakatta EG. Potential effects of intrinsic heart pacemaker cell mechanisms on dysrhythmic cardiac action potential firing. *Front Physiol* [Internet]. 2015 [cited 2024 Oct 4];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2015.00047/abstract>
84. Baruscotti M, Bucchi A, Viscomi C, Mandelli G, Consalez G, Gnecci-Rusconi T, Montano N, Casali KR, Micheloni S, Barbuti A, DiFrancesco D. Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene *Hcn4*. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:1705–1710.
85. Herrmann S, Stieber J, Stöckl G, Hofmann F, Ludwig A. HCN4 provides a ‘depolarization reserve’ and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J*. 2007;26:4423–4432.
86. Hennis K, Biel M, Fenske S, Wahl-Schott C. Paradigm shift: new concepts for HCN4 function in cardiac pacemaking. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2022;474:649–663.
87. Mangoni ME, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot J. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: From ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;90:38–63.
88. Vassort G, Alvarez J. Cardiac T-Type Calcium Current: Pharmacology and Roles in Cardiac Tissues. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994;5:376–393.
89. Tevoufouet EE, Nembo EN, Dibué-Adjei M, Hescheler J, Nguemo F, Schneider T. Cardiac Functions of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels: Role of the Pharmacoresistant Type (E-/R-Type) in Cardiac Modulation and Putative Implication in Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP) [Internet]. In: Nilius B, Gudermann T, Jahn R, Lill R, Offermanns S, Petersen OH, editors. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 167. Cham: Springer International Publishing; 2014 [cited 2024 Oct 4]. p. 115–139. Available from: https://link.springer.com/10.1007/112_2014_21
90. Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud J-F. Functional and Molecular Characterization of a T-type Ca²⁺ Channel During Fetal and Postnatal Rat Heart Development. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:533–546.

91. Vassort G, Talavera K, Alvarez J. Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium*. 2006;40:205–220.
92. Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol Rev*. 2003;55:579–581.
93. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. 2005;562:223–234.
94. Baker K, Warren KS, Yellen G, Fishman MC. Defective “pacemaker” current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:4554–4559.
95. Cribbs LL, Martin BL, Schroder EA, Keller BB, Delisle BP, Satin J. Identification of the T-Type Calcium Channel (Ca_v 3.1d) in Developing Mouse Heart. *Circ Res*. 2001;88:403–407.
96. Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni A-L, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin H-S, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. Bradycardia and Slowing of the Atrioventricular Conduction in Mice Lacking Ca_v 3.1/α_{1G} T-Type Calcium Channels. *Circ Res*. 2006;98:1422–1430.
97. Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, DiFrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, Billeter R, Sharma V, Sigg DC, Boyett MR, Dobrzynski H. Molecular Architecture of the Human Sinus Node: Insights Into the Function of the Cardiac Pacemaker. *Circulation*. 2009;119:1562–1575.
98. Lipsius SL, Hüser J, Blatter LA. Intracellular Ca²⁺ Release Sparks Atrial Pacemaker Activity. *Physiology*. 2001;16:101–106.
99. Chen C-C, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP. Abnormal Coronary Function in Mice Deficient in α_{1H} T-type Ca²⁺ Channels. *Science*. 2003;302:1416–1418.
100. Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M, Lee J-K, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. Ca_v 3.2 subunit underlies the functional T-type Ca²⁺ channel in murine hearts during the embryonic period. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2004;286:H2257–H2263.
101. Doerr Th, Denger R, Trautwein W. Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 1989;413:599–603.
102. Verheijck EE, Van Ginneken ACG, Wilders R, Bouman LN. Contribution of L-type Ca²⁺ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1999;276:H1064–H1077.
103. Christel CJ, Cardona N, Mesirca P, Herrmann S, Hofmann F, Striessnig J, Ludwig A, Mangoni ME, Lee A. Distinct localization and modulation of Ca_v 1.2 and Ca_v 1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node. *J Physiol*. 2012;590:6327–6341.
104. Torrente AG, Mesirca P, Neco P, Rizzetto R, Dubel S, Barrere C, Sinegger-Brauns M, Striessnig J, Richard S, Nargeot J, Gomez AM, Mangoni ME. L-type Ca_v 1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca²⁺ release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovasc Res*. 2016;109:451–461.

105. Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type $\text{Ca}_v 1.3 \text{ Ca}^{2+}$ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:5543–5548.
106. 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 Ca^{2+} Channels. *Cell.* 2000;102:89–97.
107. Louradour J, Bortolotti O, Torre E, Bidaud I, Lamb N, Fernandez A, Le Guennec J-Y, Mangoni ME, Mesirca P. L-Type $\text{Cav}1.3$ Calcium Channels Are Required for Beta-Adrenergic Triggered Automaticity in Dormant Mouse Sinoatrial Pacemaker Cells. *Cells.* 2022;11:1114.
108. Zhang Z, He Y, Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Zhang Q, Glatzer KA, Xu Y, Shin H-S, Low R, Chiamvimonvat N. Functional Roles of $\text{Ca}_v 1.3(\alpha_{1D})$ Calcium Channels in Atria: Insights Gained From Gene-Targeted Null Mutant Mice. *Circulation.* 2005;112:1936–1944.
109. Zhang Q, Timofeyev V, Qiu H, Lu L, Li N, Singapuri A, Torado CL, Shin H-S, Chiamvimonvat N. Expression and roles of $\text{Cav}1.3 (\alpha_{1D})$ L-Type Ca^{2+} Channel in atrioventricular node automaticity. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:194–202.
110. Marger L, Mesirca P, Alig J, Torrente A, Dübel S, Engeland B, Kanani S, Fontanaud P, Striessnig J, Shin H-S, Isbrandt D, Ehmke H, Nargeot J, Mangoni ME. Functional roles of $\text{Ca}_v 1.3$, $\text{Ca}_v 3.1$ and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: Insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels.* 2011;5:251–261.
111. Zalk R, Clarke OB, Des Georges A, Grassucci RA, Reiken S, Mancina F, Hendrickson WA, Frank J, Marks AR. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature.* 2015;517:44–49.
112. Maltsev AV, Maltsev VA, Mikheev M, Maltseva LA, Sirenko SG, Lakatta EG, Stern MD. Synchronization of Stochastic Ca^{2+} Release Units Creates a Rhythmic Ca^{2+} Clock in Cardiac Pacemaker Cells. *Biophys J.* 2011;100:271–283.
113. Vinogradova TM, Zhou Y-Y, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, Lakatta EG. Rhythmic Ryanodine Receptor Ca^{2+} Releases During Diastolic Depolarization of Sinoatrial Pacemaker Cells Do Not Require Membrane Depolarization. *Circ Res.* 2004;94:802–809.
114. Bround MJ, Asghari P, Wambolt RB, Bohunek L, Smits C, Philit M, Kieffer TJ, Lakatta EG, Boheler KR, Moore EDW, Allard MF, Johnson JD. Cardiac ryanodine receptors control heart rate and rhythmicity in adult mice. *Cardiovasc Res.* 2012;96:372–380.
115. Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol.* 1992;100:905–932.
116. Sharma V, O'Halloran DM. Recent structural and functional insights into the family of sodium calcium exchangers. *genesis.* 2014;52:93–109.
117. Levitsky DO. Three Types of Muscles Express Three Sodium–Calcium Exchanger Isoforms. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1099:221–225.
118. Pitts B. J. Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Coupling to the sodium pump. *The Journal of biological chemistry*, 254(14), 6232–6235. 1979;

119. Brown, H. F., Kimura, J., Noble, D., Noble, S. J., & Taupignon, A. The slow inward current, i_{si} , in the rabbit sino-atrial node investigated by voltage clamp and computer simulation. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1984;222:305–328.
120. Zhou, Z., & Lipsius, S. L. Na(+)-Ca²⁺ exchange current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *The Journal of physiology*, 466, 263–285. 1993;
121. Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na⁺ - Ca²⁺ Exchanger: Molecular Partners in Pacemaker Regulation. *Circ Res.* 2001;88:1254–1258.
122. Herrmann S, Lipp P, Wiesen K, Stieber J, Nguyen H, Kaiser E, Ludwig A. The cardiac sodium–calcium exchanger NCX1 is a key player in the initiation and maintenance of a stable heart rhythm. *Cardiovasc Res.* 2013;99:780–788.
123. Torrente AG, Zhang R, Zaini A, Giani JF, Kang J, Lamp ST, Philipson KD, Goldhaber JI. Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium–calcium exchanger knockout mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112:9769–9774.
124. Groenke S, Larson ED, Alber S, Zhang R, Lamp ST, Ren X, Nakano H, Jordan MC, Karagueuzian HS, Roos KP, Nakano A, Proenza C, Philipson KD, Goldhaber JI. Complete Atrial-Specific Knockout of Sodium-Calcium Exchange Eliminates Sinoatrial Node Pacemaker Activity. *PLoS ONE.* 2013;8:e81633.
125. Ito H, Ono K. A rapidly activating delayed rectifier K⁺ channel in rabbit sinoatrial node cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1995;269:H443–H452.
126. Lei M, Brown H. Two components of the delayed rectifier potassium current, I_K, in rabbit sino-atrial node cells. *Exp Physiol.* 1996;81:725–741.
127. Noble D, Tsien RW. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol.* 1969;200:205–231.
128. Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. *Physiol Rev.* 2012;92:1393–1478.
129. Kaplan WD, Trout WE. THE BEHAVIOR OF FOUR NEUROLOGICAL MUTANTS OF DROSOPHILA. *Genetics.* 1969;61:399–409.
130. Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:3438–3442.
131. Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family. *Science.* 1995;269:92–95.
132. Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol.* 1996;107:611–619.
133. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol.* 1990;96:195–215.
134. Pusch M, Magrassi R, Wollnik B, Conti F. Activation and Inactivation of Homomeric KvLQT1 Potassium Channels. *Biophys J.* 1998;75:785–792.

135. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current. *Nature*. 1996;384:78–80.
136. Ono K, Shibata S, Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sinoatrial node cells. *J Physiol*. 2000;524:51–62.
137. Clark RB, Mangoni ME, Lueger A, Couette B, Nargeot J, Giles WR. A rapidly activating delayed rectifier K⁺ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1757–H1766.
138. Ono K, Ito H. Role of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current in sinoatrial node pacemaker activity. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1995;269:H453–H462.
139. Matsuura H, Ehara T, Ding W, Omatsu-Kanbe M, Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells. *J Physiol*. 2002;540:815–830.
140. Honjo H, Lei M, Boyett MR, Kodama I. Heterogeneity of 4-aminopyridine-sensitive current in rabbit sinoatrial node cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1999;276:H1295–H1304.
141. Lei M. Characterisation of the transient outward K⁺ current in rabbit sinoatrial node cells. *Cardiovasc Res*. 2000;46:433–441.
142. Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol*. 2000;523:593–605.
143. Satoh H. Sino-Atrial Nodal Cells of Mammalian Hearts: Ionic Currents and Gene Expression of Pacemaker Ionic Channels. *J Smooth Muscle Res*. 2003;39:175–193.
144. Cho H, Takano M, Noma A. The Electrophysiological Properties of Spontaneously Beating Pacemaker Cells Isolated from Mouse Sinoatrial Node. *J Physiol*. 2003;550:169–180.
145. DiFrancesco D, Ducouret P, Robinson RB. Muscarinic Modulation of Cardiac Rate at Low Acetylcholine Concentrations. *Science*. 1989;243:669–671.
146. Giles W, Noble SJ. Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. *J Physiol*. 1976;261:103–123.
147. Noma A, Trautwein W. Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1978;377:193–200.
148. Maltsev VA, Yaniv Y, Maltsev AV, Stern MD, Lakatta EG. Modern Perspectives on Numerical Modeling of Cardiac Pacemaker Cell. *J Pharmacol Sci*. 2014;125:6–38.
149. Wickman K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal Heart Rate Regulation in GIRK4 Knockout Mice. *Neuron*. 1998;20:103–114.
150. Han X, Light PE, Giles WR, French RJ. Identification and properties of an ATP-sensitive K⁺ current in rabbit sinoatrial node pacemaker cells. *J Physiol*. 1996;490:337–350.
151. Aziz Q, Finlay M, Montaigne D, Ojake L, Li Y, Anderson N, Ludwig A, Tinker A. ATP-sensitive potassium channels in the sinoatrial node contribute to heart rate control and adaptation to hypoxia. *J Biol Chem*. 2018;293:8912–8921.

152. Reuveny E, Slesinger PA, Inglese J, Morales JM, Iñiguez-Lluhi JA, Lefkowitz RJ, Bourne HR, Jan YN, Jan LY. Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature*. 1994;370:143–146.
153. Wickman KD, Iñiguez-Lluhi JA, Davenport PA, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE. Recombinant G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature*. 1994;368:255–257.
154. Wickman K, Krapivinsky G, Corey S, Kennedy M, Nemeč J, Medina I, Clapham DE. Structure, G Protein Activation, and Functional Relevance of the Cardiac G Protein-Gated K^+ Channel, I_{KACH} . *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:386–398.
155. Mesirca P, Bidaud I, Briec F, Evain S, Torrente AG, Le Quang K, Leoni A-L, Baudot M, Marger L, Chung You Chong A, Nargeot J, Striessnig J, Wickman K, Charpentier F, Mangoni ME. G protein-gated I_{KACH} channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016 [cited 2024 Oct 4];113. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1517181113>
156. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8:321–329.
157. Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatzer KA, Vázquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N. Molecular Identification and Functional Roles of a Ca^{2+} -activated K^+ Channel in Human and Mouse Hearts. *J Biol Chem*. 2003;278:49085–49094.
158. Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Nie L, Vázquez AE, Young JN, Glatzer KA, Chiamvimonvat N. Differential expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2714–H2723.
159. Zhang Q, Timofeyev V, Lu L, Li N, Singapuri A, Long MK, Bond CT, Adelman JP, Chiamvimonvat N. Functional Roles of a Ca^{2+} -Activated K^+ Channel in Atrioventricular Nodes. *Circ Res*. 2008;102:465–471.
160. Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, Zhang Z, Singapuri A, Albert TR, Rajagopal AV, Bond CT, Periasamy M, Adelman J, Chiamvimonvat N. Ablation of a Ca^{2+} -activated K^+ channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol*. 2009;587:1087–1100.
161. Torrente AG, Zhang R, Wang H, Zaini A, Kim B, Yue X, Philipson KD, Goldhaber JI. Contribution of small conductance K^+ channels to sinoatrial node pacemaker activity: insights from atrial-specific Na^+/Ca^{2+} exchange knockout mice. *J Physiol*. 2017;595:3847–3865.
162. Lai MH, Wu Y, Gao Z, Anderson ME, Dalziel JE, Meredith AL. BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2014;307:H1327–H1338.
163. Pineda S, Nikolova-Krstevski V, Leimena C, Atkinson AJ, Altkoester A-K, Cox CD, Jacoby A, Huttner IG, Ju Y-K, Soka M, Ohanian M, Trivedi G, Kalvakuri S, Birker K, Johnson R, Molenaar P, Kuchar D, Allen DG, Van Helden DF, Harvey RP, Hill AP, Bodmer R, Vogler G, Dobrzynski H, Ocorr K, Fatkin D. Conserved Role of the Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channel, $K_{Ca} 1.1$, in Sinus Node Function and Arrhythmia Risk. *Circ Genomic Precis Med*. 2021;14:e003144.

164. Imlach WL, Finch SC, Miller JH, Meredith AL, Dalziel JE. A Role for BK Channels in Heart Rate Regulation in Rodents. *PLoS ONE*. 2010;5:e8698.
165. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983;305:147–148.
166. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of I_{KATP} : An Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. *Science*. 1995;270:1166–1170.
167. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev*. 2010;90:291–366.
168. Van Wagoner DR. Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*. 1993;72:973–983.
169. Friedel HA, Brogden RN. Pinacidil: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Treatment of Hypertension. *Drugs*. 1990;39:929–967.
170. Tominaga M, Horie M, Sasayama S, Okada Y. Glibenclamide, an ATP-Sensitive K⁺ Channel Blocker, Inhibits Cardiac cAMP-Activated Cl⁻ Conductance. *Circ Res*. 1995;77:417–423.
171. Fukuzaki K, Sato T, Miki T, Seino S, Nakaya H. Role of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels in the regulation of sinoatrial node automaticity: an evaluation using Kir6.2-deficient mice. *J Physiol*. 2008;586:2767–2778.
172. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952;117:500–544.
173. Beneski DA, Catterall WA. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci*. 1980;77:639–643.
174. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*. 2000;28:365–368.
175. Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms. *Neuron*. 2000;26:13–25.
176. Maier SKG, 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*. 2003;100:3507–3512.
177. Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SS -M., Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SKG, Noble D, Boyett MR. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol*. 2004;559:835–848.
178. Baruscotti M, Westenbroek R, Catterall WA, DiFrancesco D, Robinson RB. The newborn rabbit sino-atrial node expresses a neuronal type I-like Na⁺ channel. *J Physiol*. 1997;498:641–648.
179. Benson DW, Wang DW, Dyment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest*. 2003;112:1019–1028.

180. Butters TD, Aslanidi OV, Inada S, Boyett MR, Hancox JC, Lei M, Zhang H. Mechanistic Links Between Na⁺ Channel (SCN5A) Mutations and Impaired Cardiac Pacemaking in Sick Sinus Syndrome. *Circ Res*. 2010;107:126–137.
181. Verkerk AO, Wilders R, Van Borren MMGJ, Tan HL. Is sodium current present in human sinoatrial node cells? *Int J Biol Sci*. 2009;201–204.
182. Guo J, Ono K, Noma A. A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 1995;483:1–13.
183. Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Sustained Inward Current During Pacemaker Depolarization in Mammalian Sinoatrial Node Cells. *Circ Res*. 2000;87:88–91.
184. Toyoda F, Mesirca P, Dubel S, Ding W-G, Striessnig J, Mangoni ME, Matsuura H. CaV1.3 L-type Ca²⁺ channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na⁺ current. *Sci Rep*. 2017;7:7869.
185. Cooper PJ, Lei M, Cheng L-X, Kohl P. Selected Contribution: Axial stretch increases spontaneous pacemaker activity in rabbit isolated sinoatrial node cells. *J Appl Physiol*. 2000;89:2099–2104.
186. MacDonald EA, Madl J, Greiner J, Ramadan AF, Wells SM, Torrente AG, Kohl P, Rog-Zielinska EA, Quinn TA. Sinoatrial Node Structure, Mechanics, Electrophysiology and the Chronotropic Response to Stretch in Rabbit and Mouse. *Front Physiol*. 2020;11:809.
187. Quinn TA, Kohl P. Mechano-sensitivity of cardiac pacemaker function: Pathophysiological relevance, experimental implications, and conceptual integration with other mechanisms of rhythmicity. *Prog Biophys Mol Biol*. 2012;110:257–268.
188. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:619–647.
189. Venkatachalam K, Montell C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:387–417.
190. Löf C, Viitanen T, Sukumaran P, Törnquist K. TRPC2: Of Mice But Not Men [Internet]. In: Islam MdS, editor. *Transient Receptor Potential Channels*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011 [cited 2024 Nov 6]. p. 125–134. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-0265-3_6
191. Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2004;1742:21–36.
192. Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Nishida M, Honda A, Ito Y. Transient Receptor Potential Channels in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res*. 2006;99:119–131.
193. Ju Y-K, Chu Y, Chaulet H, Lai D, Gervasio OL, Graham RM, Cannell MB, Allen DG. Store-Operated Ca²⁺ Influx and Expression of TRPC Genes in Mouse Sinoatrial Node. *Circ Res*. 2007;100:1605–1614.
194. Ju Y-K, Lee BH, Trajanovska S, Hao G, Allen DG, Lei M, Cannell MB. The involvement of TRPC3 channels in sinoatrial arrhythmias. *Front Physiol* [Internet]. 2015 [cited 2024 Nov 6];6. Available from: http://www.frontiersin.org/Cardiac_Electrophysiology/10.3389/fphys.2015.00086/abstract

195. Launay P, Fleig A, Perraud A-L, Scharenberg AM, Penner R, Kinet J-P. TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell*. 2002;109:397–407.
196. Demion M, Bois P, Launay P, Guinamard R. TRPM4, a Ca²⁺-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. *Cardiovasc Res*. 2007;73:531–538.
197. Park HS, Hong C, Kim BJ, So I. The Pathophysiologic Roles of TRPM7 Channel. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18:15.
198. Hof T, Simard C, Rouet R, Sallé L, Guinamard R. Implication of the TRPM4 nonselective cation channel in mammalian sinus rhythm. *Heart Rhythm*. 2013;10:1683–1689.
199. Sah R, Mesirca P, Van Den Boogert M, Rosen J, Mably J, Mangoni ME, Clapham DE. Ion channel-kinase TRPM 7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 [cited 2024 Nov 6];110. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1311865110>
200. Maltsev VA, Lakatta EG. Dynamic interactions of an intracellular Ca²⁺ clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc Res*. 2007;77:274–284.
201. 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;87:760–767.
202. Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhu W, Ruknudin AM, Sirenko S, Yang D, Deo S, Barlow M, Johnson S, Caffrey JL, Zhou Y-Y, Xiao R-P, Cheng H, Stern MD, Maltsev VA, Lakatta EG. High Basal Protein Kinase A–Dependent Phosphorylation Drives Rhythmic Internal Ca²⁺ Store Oscillations and Spontaneous Beating of Cardiac Pacemaker Cells. *Circ Res*. 2006;98:505–514.
203. Mattick P, Parrington J, Oda E, Simpson A, Collins T, Terrar D. Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the I_f pacemaker current. *J Physiol*. 2007;582:1195–1203.
204. Younes A, Lyashkov AE, Graham D, Sheydina A, Volkova MV, Mitsak M, Vinogradova TM, Lukyanenko YO, Li Y, Ruknudin AM, Boheler KR, Van Eyk J, Lakatta EG. Ca²⁺-stimulated Basal Adenylyl Cyclase Activity Localization in Membrane Lipid Microdomains of Cardiac Sinoatrial Nodal Pacemaker Cells. *J Biol Chem*. 2008;283:14461–14468.
205. Vinogradova TM, Sirenko S, Lyashkov AE, Younes A, Li Y, Zhu W, Yang D, Ruknudin AM, Spurgeon H, Lakatta EG. Constitutive Phosphodiesterase Activity Restricts Spontaneous Beating Rate of Cardiac Pacemaker Cells by Suppressing Local Ca²⁺ Releases. *Circ Res*. 2008;102:761–769.
206. Vinogradova TM, Lakatta EG. Dual Activation of Phosphodiesterase 3 and 4 Regulates Basal Cardiac Pacemaker Function and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2021;22:8414.
207. Levy MN. Brief Reviews: Sympathetic-Parasympathetic Interactions in the Heart. *Circ Res*. 1971;29:437–445.
208. Armour JA. Potential clinical relevance of the ‘little brain’ on the mammalian heart. *Exp Physiol*. 2008;93:165–176.

209. Ardell JL, Armour JA. Neurocardiology: Structure-Based Function [Internet]. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2016 [cited 2024 Nov 6]. p. 1635–1653. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c150046>
210. Wake E, Brack K. Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. *Auton Neurosci*. 2016;199:3–16.
211. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza AG, Inokaitis H, Masaityte A, Rudokaite G, Saburkina I, Plisiene J, Pauza DH. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *J Anat*. 2016;228:26–46.
212. Hanna P, Dacey MJ, Brennan J, Moss A, Robbins S, Achanta S, Biscola NP, Swid MA, Rajendran PS, Mori S, Hadaya JE, Smith EH, Peirce SG, Chen J, Havton LA, Cheng Z (Jack), Vadigepalli R, Schwaber J, Lux RL, Efimov I, Tompkins JD, Hoover DB, Ardell JL, Shivkumar K. Innervation and Neuronal Control of the Mammalian Sinoatrial Node a Comprehensive Atlas. *Circ Res*. 2021;128:1279–1296.
213. Bychkov R, Juhaszova M, Calvo-Rubio Barrera M, Donald LAH, Coletta C, Shumaker C, Moorman K, Sirenko ST, Maltsev AV, Sollott SJ, Lakatta EG. The Heart's Pacemaker Mimics Brain Cytoarchitecture and Function. *JACC Clin Electrophysiol*. 2022;8:1191–1215.
214. Gehrman J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Triedman JK, Berul CI. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2000;279:H733–H740.
215. Coote JH, White MJ. CrossTalk proposal: Bradycardia in the trained athlete is attributable to high vagal tone. *J Physiol*. 2015;593:1745–1747.
216. D'Souza A, Sharma S, Boyett MR. CrossTalk opposing view: Bradycardia in the trained athlete is attributable to a downregulation of a pacemaker channel in the sinus node. *J Physiol*. 2015;593:1749–1751.
217. Gordan R, Gwathmey JK, Xie L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol*. 2015;7:204.
218. Frielle T, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ. Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85:9494–9498.
219. Murphree SS, Saffitz JE. Delineation of the distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in canine myocardium. *Circ Res*. 1988;63:117–125.
220. Michel LYM, Farah C, Balligand J-L. The Beta3 Adrenergic Receptor in Healthy and Pathological Cardiovascular Tissues. *Cells*. 2020;9:2584.
221. Rohrer DK, Schauble EH, Desai KH, Kobilka BK, Bernstein D. Alterations in dynamic heart rate control in the β_1 -adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1998;274:H1184–H1193.
222. DiFrancesco D, Mangoni M. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol*. 1994;474:473–482.
223. Behar J, Ganesan A, Zhang J, Yaniv Y. The Autonomic Nervous System Regulates the Heart Rate through cAMP-PKA Dependent and Independent Coupled-Clock Pacemaker Cell Mechanisms.

- Front Physiol* [Internet]. 2016 [cited 2024 Nov 6];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00419/abstract>
224. Hanoune J, Defer N. Regulation and Role of Adenylyl Cyclase Isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:145–174.
 225. Sirenko ST, Zahanich I, Li Y, Lukyanenko YO, Lyashkov AE, Ziman BD, Tarasov KV, Younes A, Riordon DR, Tarasova YS, Yang D, Vinogradova TM, Maltsev VA, Lakatta EG. Phosphoprotein Phosphatase 1 but Not 2A Activity Modulates Coupled-Clock Mechanisms to Impact on Intrinsic Automaticity of Sinoatrial Nodal Pacemaker Cells. *Cells*. 2021;10:3106.
 226. Robinson RB, Dun W, Boyden PA. Autonomic modulation of sinoatrial node: Role of pacemaker current and calcium sensitive adenylyl cyclase isoforms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2021;166:22–28.
 227. Ren L, Thai PN, Gopireddy RR, Timofeyev V, Ledford HA, Woltz RL, Park S, Puglisi JL, Moreno CM, Santana LF, Conti AC, Kotlikoff MI, Xiang YK, Yarov-Yarovoy V, Zaccolo M, Zhang X-D, Yamoah EN, Navedo MF, Chiamvimonvat N. Adenylyl cyclase isoform 1 contributes to sinoatrial node automaticity via functional microdomains. *JCI Insight*. 2022;7:e162602.
 228. Conti M, Jin S-LC. The Molecular Biology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases [Internet]. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier; 1999 [cited 2024 Nov 6]. p. 1–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660308607187>
 229. Conti M, Beavo J. Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:481–511.
 230. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Relating structure and function [Internet]. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier; 2000 [cited 2024 Nov 6]. p. 1–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660300650018>
 231. Shakur Y, Fong M, Hensley J, Cone J, Movsesian MA, Kambayashi J, Yoshitake M, Liu Y. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002;16:417–427.
 232. Vinogradova TM, Sirenko S, Lukyanenko YO, Yang D, Tarasov KV, Lyashkov AE, Varghese NJ, Li Y, Chakir K, Ziman B, Lakatta EG. Basal Spontaneous Firing of Rabbit Sinoatrial Node Cells Is Regulated by Dual Activation of PDEs (Phosphodiesterases) 3 and 4. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2018;11:e005896.
 233. Mika D, Bobin P, Lindner M, Boet A, Hodzic A, Lefebvre F, Lechène P, Sadoune M, Samuel J-L, Algalarrondo V, Rucker-Martin C, Lambert V, Fischmeister R, Vandecasteele G, Leroy J. Synergic PDE3 and PDE4 control intracellular cAMP and cardiac excitation-contraction coupling in a porcine model. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;133:57–66.
 234. Mika D, Bobin P, Pomérance M, Lechène P, Westenbroek RE, Catterall WA, Vandecasteele G, Leroy J, Fischmeister R. Differential regulation of cardiac excitation–contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc Res*. 2013;100:336–346.
 235. Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin S-LC, Conti M, Marks AR. Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. *Cell*. 2005;123:25–35.

236. Lukyanenko YO, Younes A, Lyashkov AE, Tarasov KV, Riordon DR, Lee J, Sirenko SG, Kobrinsky E, Ziman B, Tarasova YS, Juhaszova M, Sollott SJ, Graham DR, Lakatta EG. Ca²⁺/calmodulin-activated phosphodiesterase 1A is highly expressed in rabbit cardiac sinoatrial nodal cells and regulates pacemaker function. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;98:73–82.
237. Ingebritsen TS, Cohen P. Protein Phosphatases: Properties and Role in Cellular Regulation. *Science.* 1983;221:331–338.
238. Lubbers ER, Mohler PJ. Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;101:127–133.
239. Marks A. Regulation of Ryanodine Receptors via Macromolecular Complexes A Novel Role for Leucine/Isoleucine Zippers. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:166–170.
240. Belevych AE, Sansom SE, Terentyeva R, Ho H-T, Nishijima Y, Martin MM, Jindal HK, Rochira JA, Kunitomo Y, Abdellatif M, Carnes CA, Elton TS, Györke S, Terentyev D. MicroRNA-1 and -133 Increase Arrhythmogenesis in Heart Failure by Dissociating Phosphatase Activity from RyR2 Complex. *PLoS ONE.* 2011;6:e28324.
241. Aye T-T, Soni S, Van Veen TAB, Van Der Heyden MAG, Cappadona S, Varro A, De Weger RA, De Jonge N, Vos MA, Heck AJR, Scholten A. Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:511–518.
242. Kannel WB, Wilson PWF, D’Agostino RB, Cobb J. Sudden coronary death in women. *Am Heart J.* 1998;136:205–212.
243. Adams KF, Sueta CA, Gheorghide M, O’Connor CM, Schwartz TA, Koch GG, Uretsky B, Swedberg K, McKenna W, Soler-Soler J, Califf RM. Gender Differences in Survival in Advanced Heart Failure: Insights From the FIRST Study. *Circulation.* 1999;99:1816–1821.
244. Hoeker GS, Hood AR, Katra RP, Poelzing S, Pogwizd SM. Sex Differences in β -Adrenergic Responsiveness of Action Potentials and Intracellular Calcium Handling in Isolated Rabbit Hearts. *PLoS ONE.* 2014;9:e111411.
245. Parks RJ, Ray G, Bienvenu LA, Rose RA, Howlett SE. Sex differences in SR Ca²⁺ release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;75:162–173.
246. Kravtsov GM, Kam KWL, Liu J, Wu S, Wong TM. Altered Ca²⁺ handling by ryanodine receptor and Na⁺-Ca²⁺ exchange in the heart from ovariectomized rats: role of protein kinase A. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2007;292:C1625–C1635.
247. Machuki JO, Zhang H-Y, Geng J, Fu L, Adzika GK, Wu L, Shang W, Wu J, Kexue L, Zhao Z, Sun H. Estrogen regulation of cardiac cAMP-L-type Ca²⁺ channel pathway modulates sex differences in basal contraction and responses to β 2AR-mediated stress in left ventricular apical myocytes. *Cell Commun Signal.* 2019;17:34.
248. Caldwell JL, Lee I-J, Ngo L, Wang L, Bahriz S, Xu B, Bers DM, Navedo MF, Bossuyt J, Xiang YK, Ripplinger CM. Whole-heart multiparametric optical imaging reveals sex-dependent heterogeneity in cAMP signaling and repolarization kinetics. *Sci Adv.* 2023;9:eadd5799.

249. Bordallo J, Cantabrana B, Suárez L, Sánchez M. Testosterone Inhibits cAMP-Phosphodiesterases in Heart Extracts from Rats and Increases cAMP Levels in Isolated Left Atria. *Pharmacology*. 2011;87:155–160.
250. Parks RJ, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation–contraction coupling. *Pflug Arch - Eur J Physiol*. 2013;465:747–763.
251. Laasmaa M, Branovets J, Stolova J, Shen X, Rätsepso T, Balodis MJ, Grahv C, Hendrikson E, Louch WE, Birkedal R, Vendelin M. Cardiomyocytes from female compared to male mice have larger ryanodine receptor clusters and higher calcium spark frequency. *J Physiol*. 2023;601:4033–4052.
252. Shibata, E. F., Giles, W., & Pollack, G. H. Threshold effects of acetylcholine on primary pacemaker cells of the rabbit sino-atrial node. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;223:355–378.
253. Harvey RD. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists: Effects on Cardiovascular Function [Internet]. In: Fryer AD, Christopoulos A, Nathanson NM, editors. *Muscarinic Receptors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [cited 2024 Nov 6]. p. 299–316. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23274-9_13
254. Vinogradova TM, Fedorov VV, Yuzyuk TN, Zaitsev AV, Rosenshtraukh LV. Local Cholinergic Suppression of Pacemaker Activity in the Rabbit Sinoatrial Node: *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:413–424.
255. Yamada M. The Role of Muscarinic K⁺ Channels in the Negative Chronotropic Effect of a Muscarinic Agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:681–687.
256. 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. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1993;423–423:21–27.
257. Borren MMGJ, Verkerk AO, Wilders R, Hajji N, Zegers JG, Bourier J, Tan HL, Verheijck EE, Peters SLM, Alewijnse AE, Ravesloot J-H. Effects of muscarinic receptor stimulation on Ca²⁺ transient, cAMP production and pacemaker frequency of rabbit sinoatrial node cells. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:73–87.
258. Misono KS. Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. *Molecular and cellular biochemistry*. 2301-2 49–60. 2002;
259. Springer J, Azer J, Hua R, Robbins C, Adamczyk A, McBoyle S, Bissell MB, Rose RA. The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stimulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:1122–1134.
260. Dorey TW, Mackasey M, Jansen HJ, McRae MD, Bohne LJ, Liu Y, Belke DD, Atkinson L, Rose RA. Natriuretic peptide receptor B maintains heart rate and sinoatrial node function via cyclic GMP-mediated signalling. *Cardiovasc Res*. 2022;118:1917–1931.
261. Hayek S, Nemer M. Cardiac Natriuretic Peptides: From Basic Discovery to Clinical Practice: Cardiac Natriuretic Peptides. *Cardiovasc Ther*. 2011;29:362–376.
262. Renaudon, B., Lenfant, J., Decressac, S., & Bois, P. Thyroid hormone increases the conductance density of f-channels in rabbit sino-atrial node cells. *Receptors & channels*, 7(1), 1–8. 2000;

263. Hunter S, Robson SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Heart*. 1992;68:540–543.
264. El Khoury N, Ross JL, Long V, Thibault S, Ethier N, Fiset C. Pregnancy and oestrogen regulate sinoatrial node calcium homeostasis and accelerate pacemaking. *Cardiovasc Res*. 2018;114:1605–1616.
265. Nieman CJ, Eisner DA. Effects of caffeine, tetracaine, and ryanodine on calcium-dependent oscillations in sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol*. 1985;86:877–889.
266. Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J. J., & Pessah, I. N. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *The Journal of biological chemistry*, 267(33), 23560–23567. 1992;
267. Tinker A, Sutko JL, Ruest L, Deslongchamps P, Welch W, Airey JA, Gerzon K, Bidasee KR, Besch HR, Williams AJ. Electrophysiological effects of ryanodine derivatives on the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Biophys J*. 1996;70:2110–2119.
268. Chu, A., Díaz-Muñoz, M., Hawkes, M. J., Brush, K., & Hamilton, S. L. Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Molecular pharmacology*, 37(5), 735–741. 1990;
269. Sutko, J. L., Airey, J. A., Welch, W., & Ruest, L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacological reviews*, 49(1), 53–98. 1997;
270. Tanna B, Welch W, Ruest L, Sutko JL, Williams AJ. Interactions of a Reversible Ryanoid (21-Amino-9 α -Hydroxy-Ryanodine) with Single Sheep Cardiac Ryanodine Receptor Channels. *J Gen Physiol*. 1998;112:55–69.
271. Xu L, Jones R, Meissner G. Effects of local anesthetics on single channel behavior of skeletal muscle calcium release channel. *J Gen Physiol*. 1993;101:207–233.
272. Laver DR, Van Helden DF. Three independent mechanisms contribute to tetracaine inhibition of cardiac calcium release channels. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:357–369.
273. Györke S, Lukyanenko V, Györke I. Dual effects of tetracaine on spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1997;500:297–309.
274. Overend CL, O'Neill SC, Eisner DA. The effect of tetracaine on stimulated contractions, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content and membrane current in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1998;507:759–769.
275. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Potentiation of Fractional Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release by Total and Free Intra-Sarcoplasmic Reticulum Calcium Concentration. *Biophys J*. 2000;78:334–343.
276. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative Assessment of the SR Ca²⁺ Leak-Load Relationship. *Circ Res*. 2002;91:594–600.
277. Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:12185–12189.

278. Fajloun Z, Kharrat R, Chen L, Lecomte C, Di Luccio E, Bichet D, El Ayeb M, Rochat H, Allen PD, Pessah IN, De Waard M, Sabatier JM. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 2000;469:179–185.
279. Tripathy A, Resch W, Le Xu, Valdivia HH, Meissner G. Imperatoxin A Induces Subconductance States in Ca²⁺ Release Channels (Ryanodine Receptors) of Cardiac and Skeletal Muscle. *J Gen Physiol.* 1998;111:679–690.
280. Ramos-Franco J, Fill M. Approaching ryanodine receptor therapeutics from the calcin angle. *J Gen Physiol.* 2016;147:369–373.
281. Varro A, Negretti N, Hester SB, Eisner DA. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 1993;423–423:158–160.
282. Trafford AW, Díaz ME, Eisner DA. A novel, rapid and reversible method to measure Ca buffering and time-course of total sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac ventricular myocytes. *Pflüg Arch.* 1999;437:501.
283. Sasajima H, Wang X, Van Breemen C. Fractional Ca²⁺Release from the Endoplasmic Reticulum Activates Ca²⁺Entry in Freshly Isolated Rabbit Aortic Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241:471–475.
284. Trafford AW, Díaz ME, Sibbring GC, Eisner DA. Modulation of CICR has no maintained effect on systolic Ca²⁺ : simultaneous measurements of sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal Ca²⁺ fluxes in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 2000;522:259–270.
285. Inui, M., Saito, A., & Fleischer, S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 262(4), 1740–1747. 1987;
286. Anthony Lai F, Erickson HP, Rousseau E, Liu Q-Y, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature.* 1988;331:315–319.
287. Van Petegem F. Ryanodine Receptors: Structure and Function. *J Biol Chem.* 2012;287:31624–31632.
288. Mattei MG, Giannini G, Moscatelli F, Sorrentino V. Chromosomal Localization of Murine Ryanodine Receptor Genes RYR1, RYR2, and RYR3 by in Situ Hybridization. *Genomics.* 1994;22:202–204.
289. Takeshima H. Primary Structure and Expression from cDNAs of the Ryanodine Receptor^a. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;707:165–177.
290. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a003996–a003996.
291. Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M., & MacLennan, D. H.. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 265(23), 13472–13483. 1990;

292. Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol.* 1995;128:893–904.
293. Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 1992;312:229–235.
294. Perez CF, Mukherjee S, Allen PD. Amino Acids 1–1,680 of Ryanodine Receptor Type 1 Hold Critical Determinants of Skeletal Type for Excitation-Contraction Coupling. *J Biol Chem.* 2003;278:39644–39652. n
295. Du GG, Khanna VK, MacLennan DH. Mutation of Divergent Region 1 Alters Caffeine and Ca²⁺ Sensitivity of the Skeletal Muscle Ca²⁺-Release Channel (Ryanodine Receptor). *J Biol Chem.* 2000;275:11778–11783.
296. Hayek SM, Zhao J, Bhat M, Xu X, Nagaraj R, Pan Z, Takeshima H, Ma J. A negatively charged region of the skeletal muscle ryanodine receptor is involved in Ca²⁺-dependent regulation of the Ca²⁺ release channel. *FEBS Lett.* 1999;461:157–164.
297. O'Brien J, Meissner G, Block BA. The fastest contracting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor. *Biophys J.* 1993;65:2418–2427.
298. Oyamada, H., Murayama, T., Takagi, T., Iino, M., Iwabe, N., Miyata, T., Ogawa, Y., & Endo, M. Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 269(25), 17206–17214. 1994;
299. Radermacher M, Rao V, Grassucci R, Frank J, Timmerman AP, Fleischer S, Wagenknecht T. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1994;127:411–423.
300. Sharma MR, Jeyakumar LH, Fleischer S, Wagenknecht T. Three-dimensional Structure of Ryanodine Receptor Isoform Three in Two Conformational States as Visualized by Cryo-electron Microscopy. *J Biol Chem.* 2000;275:9485–9491.
301. Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, Ohkusa T, Ikeda Y, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective Regulation of Interdomain Interactions Within the Ryanodine Receptor Plays a Key Role in the Pathogenesis of Heart Failure. *Circulation.* 2005;111:3400–3410.
302. Yamamoto T, El-Hayek R, Ikemoto N. Postulated Role of Interdomain Interaction within the Ryanodine Receptor in Ca²⁺ Channel Regulation. *J Biol Chem.* 2000;275:11618–11625.
303. Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Is Caused by Mutation-Linked Defective Conformational Regulation of the Ryanodine Receptor. *Circ Res.* 2010;106:1413–1424.
304. MacLENNAN DH, Chen SRW. The Role of the Calcium Release Channel of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum in Malignant Hyperthermia^a. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;707:294–304.
305. Borko L, Bauerová-Hlinková V, Hostinová E, Gašperík J, Beck K, Lai FA, Zahradníková A, Ševčík J. Structural insights into the human RyR2 N-terminal region involved in cardiac arrhythmias. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70:2897–2912.

306. Bannister ML, Hamada T, Murayama T, Harvey PJ, Casarotto MG, Dulhunty AF, Ikemoto N. Malignant hyperthermia mutation sites in the Leu2442–Pro2477 (DP4) region of RyR1 (ryanodine receptor 1) are clustered in a structurally and functionally definable area. *Biochem J.* 2007;401:333–339.
307. Cabra V, Murayama T, Samsó M. Ultrastructural Analysis of Self-Associated RyR2s. *Biophys J.* 2016;110:2651–2662.
308. Baddeley D, Jayasinghe I, Lam L, Rossberger S, Cannell MB, Soeller C. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:22275–22280.
309. Shen X, Van Den Brink J, Hou Y, Colli D, Le C, Kolstad TR, MacQuaide N, Carlson CR, Kekenus-Huskey PM, Edwards AG, Soeller C, Louch WE. 3D dSTORM imaging reveals novel detail of ryanodine receptor localization in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2019;597:399–418.
310. Asghari P, Scriven DRL, Sanatani S, Gandhi SK, Campbell AIM, Moore EDW. Nonuniform and Variable Arrangements of Ryanodine Receptors Within Mammalian Ventricular Couplons. *Circ Res.* 2014;115:252–262.
311. Sobie E, Guatimosim S, Gomezviquez L, Song L, Hartmann H, Saleetjafri M, Lederer W. The Ca²⁺ leak paradox and “rogue ryanodine receptors”: SR Ca²⁺ efflux theory and practice. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;90:172–185.
312. Asghari P, Scriven DRL, Shahrsebi S, Valdivia HH, Alsina KM, Valdivia CR, Navarro-Garcia JA, Wehrens XHT, Moore EDW. Phosphorylation of RyR2 simultaneously expands the dyad and rearranges the tetramers. *J Gen Physiol.* 2024;156:e202213108.
313. Shen X, Van Den Brink J, Bergan-Dahl A, Kolstad TR, Norden ES, Hou Y, Laasmaa M, Aguilar-Sanchez Y, Quick AP, Espe EK, Sjaastad I, Wehrens XH, Edwards AG, Soeller C, Louch WE. Prolonged β -adrenergic stimulation disperses ryanodine receptor clusters in cardiomyocytes and has implications for heart failure. *eLife.* 2022;11:e77725.
314. Kolstad TR, Van Den Brink J, MacQuaide N, Lunde PK, Frisk M, Aronsen JM, Norden ES, Cataliotti A, Sjaastad I, Sejersted OM, Edwards AG, Lines GT, Louch WE. Ryanodine receptor dispersion disrupts Ca²⁺ release in failing cardiac myocytes. *eLife.* 2018;7:e39427.
315. Macquaide N, Tuan H-TM, Hotta J, Sempels W, Lenaerts I, Holemans P, Hofkens J, Jafri MS, Willems R, Sipido KR. Ryanodine receptor cluster fragmentation and redistribution in persistent atrial fibrillation enhance calcium release. *Cardiovasc Res.* 2015;108:387–398.
316. Galice S, Xie Y, Yang Y, Sato D, Bers DM. Size Matters: Ryanodine Receptor Cluster Size Affects Arrhythmogenic Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e008724.
317. Pancaroglu R, Van Petegem F. Calcium Channelopathies: Structural Insights into Disorders of the Muscle Excitation–Contraction Complex. *Annu Rev Genet.* 2018;52:373–396.
318. Des Georges A, Clarke OB, Zalk R, Yuan Q, Condon KJ, Grassucci RA, Hendrickson WA, Marks AR, Frank J. Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. *Cell.* 2016;167:145–157.e17.
319. Welch W, Rheault S, West DJ, Williams AJ. A Model of the Putative Pore Region of the Cardiac Ryanodine Receptor Channel. *Biophys J.* 2004;87:2335–2351.

320. Lindsay AR, Manning SD, Williams AJ. Monovalent cation conductance in the ryanodine receptor-channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*. 1991;439:463–480.
321. Tinker A, Williams AJ. Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 1992;100:479–493.
322. Shannon TR, Guo T, Bers DM. Ca²⁺ Scraps: Local Depletions of Free [Ca²⁺] in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum During Contractions Leave Substantial Ca²⁺ Reserve. *Circ Res*. 2003;93:40–45.
323. Williams AJ. Ion conduction and discrimination in the sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor/calcium-release channel. *J Muscle Res Cell Motil*. 1992;13:7–26.
324. Paludan-Müller C, Ahlberg G, Ghouse J, Herfelt C, Svendsen JH, Haunsø S, Kanters JK, Olesen MS. Integration of 60,000 exomes and ACMG guidelines question the role of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-associated variants. *Clin Genet*. 2017;91:63–72.
325. Reid DS, Tynan M, Braidwood L, Fitzgerald GR. Bidirectional tachycardia in a child. A study using His bundle electrography. *Heart*. 1975;37:339–344.
326. Coumel P., Fidelle J., Lucet V., Attuel P., Bouvrain Y. Catecholamine-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: Report of four cases. *Br. Heart J.*;40:28–37. 1978;
327. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children: A 7-Year Follow-up of 21 Patients. *Circulation*. 1995;91:1512–1519.
328. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck K-H, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekvål TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J*. 2015;36:2793–2867.
329. Domingo D, Neco P, Fernández-Pons E, Zissimopoulos S, Molina P, Olagüe J, Suárez-Mier MP, Lai FA, Gómez AM, Zorio E. Non-ventricular, Clinical, and Functional Features of the RyR2R420Q Mutation Causing Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Rev Esp Cardiol Engl Ed*. 2015;68:398–407.
330. Swan H, Piippo K, Viitasalo M, Heikkilä P, Paavonen T, Kainulainen K, Kere J, Keto P, Kontula K, Toivonen L. Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42–q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:2035–2042.
331. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (*hRyR2*) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*. 2001;103:196–200.
332. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang C-E, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C.

- HRS/EHRA/APHS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm*. 2013;10:1932–1963.
333. Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancet D, Eldar M. A Missense Mutation in a Highly Conserved Region of CASQ2 Is Associated with Autosomal Recessive Catecholamine-Induced Polymorphic Ventricular Tachycardia in Bedouin Families from Israel. *Am J Hum Genet*. 2001;69:1378–1384.
 334. Lahat H, Pras E, Eldar M. A missense mutation in CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Ann Med*. 2004;36:87–91.
 335. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*. 2017;120:1969–1993.
 336. Bezzina CR, Lahrouchi N, Priori SG. Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circ Res*. 2015;116:1919–1936.
 337. Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, Van Tintelen JP, Mannens MMAM, Wilde AAM, Ackerman MJ. The RYR2-Encoded Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel in Patients Diagnosed Previously With Either Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia or Genotype Negative, Exercise-Induced Long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2065–2074.
 338. Baltogiannis GG, Lysitsas DN, Di Giovanni G, Ciconte G, Sieira J, Conte G, Kolettis TM, Chierchia G-B, De Asmundis C, Brugada P. CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:92.
 339. Fernández-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah J-P, Colombi B, Napolitano C, Priori SG, Richard S, Gómez AM. Increased Ca²⁺ Sensitivity of the Ryanodine Receptor Mutant RyR2^{R4496C} Underlies Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ Res*. 2009;104:201–209.
 340. Liu N, Colombi B, Memmi M, Zissimopoulos S, Rizzi N, Negri S, Imbriani M, Napolitano C, Lai FA, Priori SG. Arrhythmogenesis in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia: Insights From a RyR2 R4496C Knock-In Mouse Model. *Circ Res*. 2006;99:292–298.
 341. Zhao Y-T, Valdivia CR, Gurrola GB, Powers PP, Willis BC, Moss RL, Jalife J, Valdivia HH. Arrhythmogenesis in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation that depresses ryanodine receptor function. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2015 [cited 2024 Nov 6];112. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1419795112>
 342. Jiang D, Xiao B, Yang D, Wang R, Choi P, Zhang L, Cheng H, Chen SRW. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca²⁺ release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:13062–13067.
 343. Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P, Zhang L, Chen SRW. Enhanced Store Overload-Induced Ca²⁺ Release and Channel Sensitivity to Luminal Ca²⁺ Activation Are Common Defects of RyR2 Mutations Linked to Ventricular Tachycardia and Sudden Death. *Circ Res*. 2005;97:1173–1181.
 344. Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, Lindegger N, Chen B-X, Hsueh W, Reiken S, Wronska A, Drew LJ, Ward CW, Lederer WJ, Kass RS, Morley G, Marks AR. Leaky Ca²⁺ release

- channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest*. 2008;JCI35346.
345. Kimlicka L, Tung C-C, Carlsson A-CC, Lobo PA, Yuchi Z, Van Petegem F. The Cardiac Ryanodine Receptor N-Terminal Region Contains an Anion Binding Site that Is Targeted by Disease Mutations. *Structure*. 2013;21:1440–1449.
 346. Tang Y, Tian X, Wang R, Fill M, Chen SRW. Abnormal Termination of Ca²⁺ Release Is a Common Defect of RyR2 Mutations Associated With Cardiomyopathies. *Circ Res*. 2012;110:968–977.
 347. Bauer JA, Borko L, Pavlović J, Kutejová E, Bauerová-Hlinková V. Disease-associated mutations alter the dynamic motion of the N-terminal domain of the human cardiac ryanodine receptor. *J Biomol Struct Dyn*. 2020;38:1054–1070.
 348. Okudaira N, Kuwahara M, Hirata Y, Oku Y, Nishio H. A knock-in mouse model of N-terminal R420W mutation of cardiac ryanodine receptor exhibits arrhythmogenesis with abnormal calcium dynamics in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452:665–668.
 349. Tester DJ, Spoon DB, Valdivia HH, Makielski JC, Ackerman MJ. Targeted Mutational Analysis of the RyR2-Encoded Cardiac Ryanodine Receptor in Sudden Unexplained Death: A Molecular Autopsy of 49 Medical Examiner/Coroner's Cases. *Mayo Clin Proc*. 2004;79:1380–1384.
 350. Yin L, Zahradnikova A, Rizzetto R, Boncompagni S, Rabesahala De Meritens C, Zhang Y, Joanne P, Marqués-Sulé E, Aguilar-Sánchez Y, Fernández-Tenorio M, Villejoubert O, Li L, Wang YY, Mateo P, Nicolas V, Gerbaud P, Lai FA, Perrier R, Álvarez JL, Niggli E, Valdivia HH, Valdivia CR, Ramos-Franco J, Zorio E, Zissimopoulos S, Protasi F, Benitah J-P, Gómez AM. Impaired Binding to Junctophilin-2 and Nanostructural Alteration in CPVT Mutation. *Circ Res* [Internet]. 2021 [cited 2024 Nov 6];129. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.121.319094>
 351. Xiao RP, Valdivia HH, Bogdanov K, Valdivia C, Lakatta EG, Cheng H. The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat heart. *J Physiol*. 1997;500:343–354.
 352. Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL. Regulation of Ryanodine Receptors by FK506 Binding Proteins. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:227–234.
 353. 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 Ca²⁺ Leak Through Ryanodine Receptor in Heart Failure. *Circulation*. 2000;102:2131–2136.
 354. Balshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, Meissner G. Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *J Biol Chem*. 2001;276:20144–20153.
 355. Yang Y, Guo T, Oda T, Chakraborty A, Chen L, Uchinoumi H, Knowlton AA, Fruen BR, Cornea RL, Meissner G, Bers DM. Cardiac Myocyte Z-Line Calmodulin Is Mainly RyR2-Bound, and Reduction Is Arrhythmogenic and Occurs in Heart Failure. *Circ Res*. 2014;114:295–306.
 356. Xu X, Yano M, Uchinoumi H, Hino A, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective calmodulin binding to

- the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:660–666.
357. Meyers MB, Pickel VM, Sheu S-S, Sharma VK, Scotto KW, Fishman GI. Association of Sorcin With the Cardiac Ryanodine Receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:26411–26418.
 358. Lokuta AJ, Meyers MB, Sander PR, Fishman GI, Valdivia HH. Modulation of Cardiac Ryanodine Receptors by Sorcin. *J Biol Chem.* 1997;272:25333–25338.
 359. Farrell EF, Antaramian A, Rueda A, Gómez AM, Valdivia HH. Sorcin Inhibits Calcium Release and Modulates Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *J Biol Chem.* 2003;278:34660–34666.
 360. Huke S, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376:80–85.
 361. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR. Protein Kinase A Phosphorylation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) in Normal and Failing Hearts. *J Biol Chem.* 2003;278:444–453.
 362. Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J. Purification, Primary Structure, and Immunological Characterization of the 26-kDa Calsequestrin Binding Protein (Junctin) from Cardiac Junctional Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem.* 1995;270:30787–30796.
 363. Kobayashi YM, Jones LR. Identification of Triadin 1 as the Predominant Triadin Isoform Expressed in Mammalian Myocardium. *J Biol Chem.* 1999;274:28660–28668.
 364. Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR. Localization and Characterization of the Calsequestrin-binding Domain of Triadin 1. *J Biol Chem.* 2000;275:17639–17646.
 365. Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S. The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophys J.* 2004;86:2121–2128.
 366. Meissner G, Darling E, Eveleth J. Kinetics of rapid calcium release by sarcoplasmic reticulum. Effects of calcium, magnesium, and adenine nucleotides. *Biochemistry.* 1986;25:236–244.
 367. Fill M, Copello JA. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol Rev.* 2002;82:893–922.
 368. Copello JA, Barg S, Onoue H, Fleischer S. Heterogeneity of Ca²⁺ gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys J.* 1997;73:141–156.
 369. Jeyakumar LH, Copello JA, O'Malley AM, Wu G-M, Grassucci R, Wagenknecht T, Fleischer S. Purification and Characterization of Ryanodine Receptor 3 from Mammalian Tissue. *J Biol Chem.* 1998;273:16011–16020.
 370. Schiefer A, Meissner G, Isenberg G. Ca²⁺ activation and Ca²⁺ inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channels. *J Physiol.* 1995;489:337–348.
 371. Zahradníková A, Zahradník I, Györke I, Györke S. Rapid Activation of the Cardiac Ryanodine Receptor by Submillisecond Calcium Stimuli. *J Gen Physiol.* 1999;114:787–798.

372. Laver DR. Luminal Ca²⁺ activation of cardiac ryanodine receptors by luminal and cytoplasmic domains. *Eur Biophys J.* 2009;39:19–26.
373. Laver DR. Ca²⁺ Stores Regulate Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release Channels via Luminal and Cytosolic Ca²⁺ Sites. *Biophys J.* 2007;92:3541–3555.
374. Meissner G. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J Gen Physiol.* 2017;149:1065–1089.
375. Chirasani VR, Elferdink M, Kral M, Carter JS, Heitmann S, Meissner G, Yamaguchi N. Structural and functional interactions between the EF hand domain and S2–S3 loop in the type-1 ryanodine receptor ion channel. *J Biol Chem.* 2024;300:105606.
376. Guo W, Sun B, Xiao Z, Liu Y, Wang Y, Zhang L, Wang R, Chen SRW. The EF-hand Ca²⁺ Binding Domain Is Not Required for Cytosolic Ca²⁺ Activation of the Cardiac Ryanodine Receptor. *J Biol Chem.* 2016;291:2150–2160.
377. Xu L, Meissner G. Regulation of Cardiac Muscle Ca²⁺ Release Channel by Sarcoplasmic Reticulum Luminal Ca²⁺. *Biophys J.* 1998;75:2302–2312.
378. Györke I, Györke S. Regulation of the Cardiac Ryanodine Receptor Channel by Luminal Ca²⁺ Involves Luminal Ca²⁺ Sensing Sites. *Biophys J.* 1998;75:2801–2810.
379. Priori SG, Chen SRW. Inherited Dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Handling and Arrhythmogenesis. *Circ Res.* 2011;108:871–883.
380. Meissner, G., & Henderson, J. S. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca²⁺ and is modulated by Mg²⁺, adenine nucleotide, and calmodulin. *The Journal of biological chemistry*, 262(7), 3065–3073. 1987;
381. Laver DR, Baynes TM, Dulhunty AF. Magnesium Inhibition of Ryanodine-Receptor Calcium Channels: Evidence for Two Independent Mechanisms. *J Membr Biol.* 1997;156:213–229.
382. Buri A, McGuigan J. Intracellular free magnesium and its regulation, studied in isolated ferret ventricular muscle with ion-selective microelectrodes. *Exp Physiol.* 1990;75:751–761.
383. Zahradníková A, Dura M, Györke I, Escobar AL, Zahradník I, Györke S. Regulation of dynamic behavior of cardiac ryanodine receptor by Mg²⁺ under simulated physiological conditions. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2003;285:C1059–C1070.
384. Laver DR, Honen BN. Luminal Mg²⁺, A Key Factor Controlling RYR2-mediated Ca²⁺ Release: Cytoplasmic and Luminal Regulation Modeled in a Tetrameric Channel. *J Gen Physiol.* 2008;132:429–446.
385. Meissner G. Adenine nucleotide stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 259(4), 2365–2374. 1984;
386. Ahern GP, Junankar PR, Dulhunty AF. Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett.* 1994;352:369–374.
387. Kaftan E, Marks AR, Ehrlich BE. Effects of Rapamycin on Ryanodine Receptor/Ca²⁺ -Release Channels From Cardiac Muscle. *Circ Res.* 1996;78:990–997.

388. Timerman AP, Onoue H, Xin H-B, Barg S, Copello J, Wiederrecht G, Fleischer S. Selective Binding of FKBP12.6 by the Cardiac Ryanodine Receptor. *J Biol Chem*. 1996;271:20385–20391.
389. Bultynck G, De Smet P, Rossi D, Callewaert G, Missiaen L, Sorrentino V, De Smedt H, Parys JB. Characterization and mapping of the 12 kDa FK506-binding protein (FKBP12)-binding site on different isoforms of the ryanodine receptor and of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J*. 2001;354:413–422.
390. Brillantes A-MB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriašová E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*. 1994;77:513–523.
391. Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng M-J, Mathews LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature*. 1998;391:489–492.
392. Li N, Wang T, Wang W, Cutler MJ, Wang Q, Voigt N, Rosenbaum DS, Dobrev D, Wehrens XHT. Inhibition of CaMKII Phosphorylation of RyR2 Prevents Induction of Atrial Fibrillation in FKBP12.6 Knockout Mice. *Circ Res*. 2012;110:465–470.
393. Gellen B, Fernández-Velasco M, Briec F, Vinet L, LeQuang K, Rouet-Benzineb P, Bénitah J-P, Pezet M, Palais G, Pellegrin N, Zhang A, Perrier R, Escoubet B, Marniquet X, Richard S, Jaisser F, Gómez AM, Charpentier F, Mercadier J-J. Conditional FKBP12.6 Overexpression in Mouse Cardiac Myocytes Prevents Triggered Ventricular Tachycardia Through Specific Alterations in Excitation- Contraction Coupling. *Circulation*. 2008;117:1778–1786.
394. Gómez AM, Schuster I, Fauconnier J, Prestle J, Hasenfuss G, Richard S. FKBP12.6 overexpression decreases Ca²⁺ spark amplitude but enhances [Ca²⁺]_i transient in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1987–H1993.
395. Yuchi Z, Yuen SMWK, Lau K, Underhill AQ, Cornea RL, Fessenden JD, Van Petegem F. Crystal structures of ryanodine receptor SPRY1 and tandem-repeat domains reveal a critical FKBP12 binding determinant. *Nat Commun*. 2015;6:7947.
396. Meli AC, Refaat MM, Dura M, Reiken S, Wronska A, Wojciak J, Carroll J, Scheinman MM, Marks AR. A Novel Ryanodine Receptor Mutation Linked to Sudden Death Increases Sensitivity to Cytosolic Calcium. *Circ Res*. 2011;109:281–290.
397. Lehnart SE, Wehrens XHT, Laitinen PJ, Reiken SR, Deng S-X, Cheng Z, Landry DW, Kontula K, Swan H, Marks AR. Sudden Death in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia Associated With Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Leak. *Circulation*. 2004;109:3208–3214.
398. Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song L-S, Rosembli N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR. FKBP12.6 Deficiency and Defective Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function Linked to Exercise-Induced Sudden Cardiac Death. *Cell*. 2003;113:829–840.
399. Zhao Y-T, Guo Y-B, Gu L, Fan X-X, Yang H-Q, Chen Z, Zhou P, Yuan Q, Ji G-J, Wang S-Q. Sensitized signalling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2017;cvw247.
400. Walweel K, Beard N, Van Helden DF, Laver DR. Dantrolene inhibition of ryanodine channels (RyR2) in artificial lipid bilayers depends on FKBP12.6. *J Gen Physiol*. 2023;155:e202213277.

401. Oo YW, Gomez-Hurtado N, Walweel K, Van Helden DF, Imtiaz MS, Knollmann BC, Laver DR. Essential Role of Calmodulin in RyR Inhibition by Dantrolene. *Mol Pharmacol*. 2015;88:57–63.
402. Tang W. Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci*. 2002;7:d1583.
403. Fruen BR, Bardy JM, Byrem TM, Strasburg GM, Louis CF. Differential Ca²⁺ sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2000;279:C724–C733.
404. Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Chen SRW, Meissner G. Calmodulin Regulation and Identification of Calmodulin Binding Region of Type-3 Ryanodine Receptor Calcium Release Channel. *Biochemistry*. 2005;44:15074–15081.
405. Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Meissner G. Molecular Basis of Calmodulin Binding to Cardiac Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor). *J Biol Chem*. 2003;278:23480–23486.
406. Brohus M, Søndergaard MT, Wayne Chen SR, Van Petegem F, Overgaard MT. Ca²⁺-dependent calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor (RyR2) calmodulin-binding domains. *Biochem J*. 2019;476:193–209.
407. Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448:1–7.
408. Nyegaard M, Overgaard MT, Søndergaard MT, Vranas M, Behr ER, Hildebrandt LL, Lund J, Hedley PL, Camm AJ, Wettrell G, Fosdal I, Christiansen M, Børghlum AD. Mutations in Calmodulin Cause Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death. *Am J Hum Genet*. 2012;91:703–712.
409. Søndergaard MT, Tian X, Liu Y, Wang R, Chazin WJ, Chen SRW, Overgaard MT. Arrhythmogenic Calmodulin Mutations Affect the Activation and Termination of Cardiac Ryanodine Receptor-mediated Ca²⁺ Release. *J Biol Chem*. 2015;290:26151–26162.
410. Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Nov 6];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00101/abstract>
411. Farrell EF, Antaramian A, Benkusky N, Zhu X, Rueda A, Gómez AM, Valdivia HH. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by sorcin, a novel modulator of ryanodine receptors. *Biol Res* [Internet]. 2004 [cited 2024 Nov 6];37. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602004000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=en
412. Seidler T, Miller SLW, Loughrey CM, Kania A, Burow A, Kettlewell S, Teucher N, Wagner S, Kögler H, Meyers MB, Hasenfuss G, Smith GL. Effects of Adenovirus-Mediated Sorcin Overexpression on Excitation-Contraction Coupling in Isolated Rabbit Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2003;93:132–139.
413. Zamparelli C, Macquaide N, Colotti G, Verzili D, Seidler T, Smith GL, Chiancone E. Activation of the cardiac Na⁺–Ca²⁺ exchanger by sorcin via the interaction of the respective Ca²⁺-binding domains. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:132–141.

414. Matsumoto T, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Inoue N, Sato T, Suzuki S, Ikeda Y, Matsuzaki M. Sorcin interacts with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Basic Res Cardiol*. 2005;100:250–262.
415. Suarez J, Belke DD, Gloss B, Dieterle T, McDonough PM, Kim Y-K, Brunton LL, Dillmann WH. In vivo adenoviral transfer of sorcin reverses cardiac contractile abnormalities of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2004;286:H68–H75.
416. Frank K, Bolck B, Ding Z, Krause D, Hattebuhr N, Malik A, Brixius K, Hajjar R, Schrader J, Schwinger R. Overexpression of sorcin enhances cardiac contractility in vivo and in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:607–615.
417. Collis LP, Meyers MB, Zhang J, Phoon CKL, Sobie EA, Coetzee WA, Fishman GI. Expression of a sorcin missense mutation in the heart modulates excitation-contraction coupling. *FASEB J*. 2007;21:475–487.
418. Chen X, Weber C, Farrell ET, Alvarado FJ, Zhao Y-T, Gómez AM, Valdivia HH. Sorcin ablation plus β -adrenergic stimulation generate an arrhythmogenic substrate in mouse ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;114:199–210.
419. Takeshima H. Junctophilins: A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins. *Mol Cell*. 2000;6:11–22.
420. Van Oort RJ, Garbino A, Wang W, Dixit SS, Landstrom AP, Gaur N, De Almeida AC, Skapura DG, Rudy Y, Burns AR, Ackerman MJ, Wehrens XHT. Disrupted Junctional Membrane Complexes and Hyperactive Ryanodine Receptors After Acute Junctophilin Knockdown in Mice. *Circulation*. 2011;123:979–988.
421. Minamisawa S, Oshikawa J, Takeshima H, Hoshijima M, Wang Y, Chien KR, Ishikawa Y, Matsuoka R. Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325:852–856.
422. Landstrom AP, Kellen CA, Dixit SS, Van Oort RJ, Garbino A, Weisleder N, Ma J, Wehrens XHT, Ackerman MJ. Junctophilin-2 Expression Silencing Causes Cardiocyte Hypertrophy and Abnormal Intracellular Calcium-Handling. *Circ Heart Fail*. 2011;4:214–223.
423. Hou Y, Bai J, Shen X, De Langen O, Li A, Lal S, Dos Remedios CG, Baddeley D, Ruygrok PN, Soeller C, Crossman DJ. Nanoscale Organisation of Ryanodine Receptors and Junctophilin-2 in the Failing Human Heart. *Front Physiol*. 2021;12:724372.
424. Luo T, Yan N, Xu M, Dong F, Liang Q, Xing Y, Fan H. Junctophilin-2 allosterically interacts with ryanodine receptor type 2 to regulate calcium release units in mouse cardiomyocytes. *Gen Physiol Biophys*. 2023;41:133–140.
425. Munro ML, Jayasinghe I, Wang Q, Quick A, Wang W, Baddeley D, Wehrens XHT, Soeller C. Junctophilin-2 in the nanoscale organisation and functional signalling of ryanodine receptor clusters in cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2016;129:4388–4398.
426. Landstrom AP, Yang Q, Sun B, Perelli RM, Bidzimu M-T, Zhang Z, Aguilar-Sanchez Y, Alsina KM, Cao S, Reynolds JO, Word TA, Van Der Sagen NMR, Wells Q, Kannankeril PJ, Ludwig A, Kim JJ, Wehrens XHT. Reduction in Junctophilin 2 Expression in Cardiac Nodal Tissue Results in Intracellular Calcium-Driven Increase in Nodal Cell Automaticity. *Circ Arrhythm Electrophysiol*

- [Internet]. 2023 [cited 2024 Nov 6];16. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCEP.122.010858>
427. Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang C. Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol.* 1998;5:476–483.
 428. Wei L, Hanna AD, Beard NA, Dulhunty AF. Unique isoform-specific properties of calsequestrin in the heart and skeletal muscle. *Cell Calcium.* 2009;45:474–484.
 429. Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff J-M, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MMAM, Wilde AAM, Guicheney P. Absence of Calsequestrin 2 Causes Severe Forms of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ Res* [Internet]. 2002 [cited 2024 Nov 6];91. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000038886.18992.6B>
 430. Faggioni M, Kryshtal DO, Knollmann BC. Calsequestrin Mutations and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Pediatr Cardiol.* 2012;33:959–967.
 431. Knollmann BC. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest.* 2006;JCI29128.
 432. Sumitomo N, Sakurada H, Taniguchi K, Matsumura M, Abe O, Miyashita M, Kanamaru H, Karasawa K, Ayusawa M, Fukamizu S, Nagaoka I, Horie M, Harada K, Hiraoka M. Association of Atrial Arrhythmia and Sinus Node Dysfunction in Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ J.* 2007;71:1606–1609.
 433. Glukhov AV, Kalyanasundaram A, Lou Q, Hage LT, Hansen BJ, Belevych AE, Mohler PJ, Knollmann BC, Periasamy M, Györke S, Fedorov VV. Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex1. *Eur Heart J.* 2015;36:686–697.
 434. Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Györke I, Volpe P, Williams SC, Györke S. Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:11759–11764.
 435. Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleemann L, Morad M. Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest.* 1998;101:1385–1393.
 436. Cho M-C, Rapacciuolo A, Koch WJ, Kobayashi Y, Jones LR, Rockman HA. Defective β -Adrenergic Receptor Signaling Precedes the Development of Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice with Calsequestrin Overexpression. *J Biol Chem.* 1999;274:22251–22256.
 437. Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dorn GW, Kadambi VJ, Yatani A, Hoit BD, Walsh RA, Kranias EG. Cardiac-specific Overexpression of Mouse Cardiac Calsequestrin Is Associated with Depressed Cardiovascular Function and Hypertrophy in Transgenic Mice. *J Biol Chem.* 1998;273:28470–28477.
 438. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;85:33–69.

439. Handhle A, Ormonde CE, Thomas NL, Bralesford C, Williams AJ, Lai FA, Zissimopoulos S. Calsequestrin interacts directly with the cardiac ryanodine receptor luminal domain. *J Cell Sci.* 2016;129:3983–3988.
440. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:23389–23397.
441. Chopra N, Yang T, Asghari P, Moore ED, Huke S, Akin B, Cattolica RA, Perez CF, Hlaing T, Knollmann-Ritschel BEC, Jones LR, Pessah IN, Allen PD, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC. Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation–contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:7636–7641.
442. Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvain A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I, Durand P, Guicheney P, Kyndt F, Leenhardt A, Le Marec H, Lucet V, Mabo P, Probst V, Monnier N, Ray PF, Santoni E, Trémeaux P, Lacampagne A, Fauré J, Lunardi J, Marty I. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 2012;21:2759–2767.
443. Altmann HM, Tester DJ, Will ML, Middha S, Evans JM, Eckloff BW, Ackerman MJ. Homozygous/Compound Heterozygous Triadin Mutations Associated With Autosomal-Recessive Long-QT Syndrome and Pediatric Sudden Cardiac Arrest: Elucidation of the Triadin Knockout Syndrome. *Circulation.* 2015;131:2051–2060.
444. Clemens DJ, Ye D, Wang L, Kim CSJ, Zhou W, Dotzler SM, Tester DJ, Marty I, Knollmann BC, Ackerman MJ. Cellular and electrophysiological characterization of triadin knockout syndrome using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rep.* 2023;18:1075–1089.
445. Callewaert G, Cleemann L, Morad M. Epinephrine enhances Ca²⁺ current-regulated Ca²⁺ release and Ca²⁺ reuptake in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:2009–2013.
446. Vinogradova TM, Bogdanov KYu, Lakatta EG. β -Adrenergic Stimulation Modulates Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release During Diastolic Depolarization to Accelerate Pacemaker Activity in Rabbit Sinoatrial Nodal Cells. *Circ Res.* 2002;90:73–79.
447. Rigg L. Localisation and functional significance of ryanodine receptors during β -adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node. *Cardiovasc Res.* 2000;48:254–264.
448. Strand MA, Louis CF, Mickelson JR. Phosphorylation of the porcine skeletal and cardiac muscle sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1993;1175:319–326.
449. Takasago T, Imagawa T, Shigekawa M. Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor by cAMP-Dependent Protein Kinase1. *J Biochem (Tokyo).* 1989;106:872–877.
450. 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;266:11144–11152.
451. Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GCR, Lederer WJ. Rapid Adaptation of Cardiac Ryanodine Receptors: Modulation by Mg²⁺ and Phosphorylation. *Science.* 1995;267:1997–2000.

452. Grimm M, Brown JH. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:322–330.
453. Zaza A, Robinson RB, DiFrancesco D. Basal responses of the L-type Ca^{2+} and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 1996;491:347–355.
454. Tanaka, H., Clark, R. B., & Giles, W. R. Positive chronotropic responses of rabbit sino-atrial node cells to flash photolysis of caged isoproterenol and cyclic AMP. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1996;263:241–248.
455. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM. Identification of the Sites Phosphorylated by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase on the β_2 Subunit of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels[†]. *Biochemistry.* 1999;38:10361–10370.
456. Kamp TJ, Hell JW. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Res.* 2000;87:1095–1102.
457. Wang G, Zhu X, Xie W, Han P, Li K, Sun Z, Wang Y, Chen C, Song R, Cao C, Zhang J, Wu C, Liu J, Cheng H. Rad As a Novel Regulator of Excitation–Contraction Coupling and β -Adrenergic Signaling in Heart. *Circ Res.* 2010;106:317–327.
458. Levitan BM, Ahern BM, Aloysius A, Brown L, Wen Y, Andres DA, Satin J. Rad-GTPase contributes to heart rate via L-type calcium channel regulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2021;154:60–69.
459. Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem.* 1986;261:13333–13341.
460. Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular Cloning and Functional Expression of the Cardiac Sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} Exchanger. *Science.* 1990;250:562–565.
461. Ginsburg KS, Bers DM. Isoproterenol does not enhance Ca-dependent Na/Ca exchange current in intact rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:972–981.
462. Wu Y, Gao Z, Chen B, Koval OM, Singh MV, Guan X, Hund TJ, Kutschke W, Sarma S, Grumbach IM, Wehrens XHT, Mohler PJ, Song L-S, Anderson ME. Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:5972–5977.
463. Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, Van Oort RJ, Brown JH, Wehrens XHT, Chen J, Bers DM. Epac2 Mediates Cardiac β_1 -Adrenergic–Dependent Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak and Arrhythmia. *Circulation.* 2013;127:913–922.
464. Lee T-S, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T, Welling A. Calmodulin Kinase II Is Involved in Voltage-dependent Facilitation of the L-type Cav1.2 Calcium Channel. *J Biol Chem.* 2006;281:25560–25567.
465. Grueter CE, Abiria SA, Wu Y, Anderson ME, Colbran RJ. Differential Regulated Interactions of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II with Isoforms of Voltage-Gated Calcium Channel β Subunits. *Biochemistry.* 2008;47:1760–1767.

466. Sergeant GP, Ohya S, Reihill JA, Perrino BA, Amberg GC, Imaizumi Y, Horowitz B, Sanders KM, Koh SD. Regulation of Kv4.3 currents by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288:C304-313.
467. Xiao L, Coutu P, Villeneuve LR, Tadevosyan A, Maguy A, Le Bouter S, Allen BG, Nattel S. Mechanisms underlying rate-dependent remodeling of transient outward potassium current in canine ventricular myocytes. *Circ Res*. 2008;103:733–742.
468. Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM, Maier LS. Ca/Calmodulin Kinase II Differentially Modulates Potassium Currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2:285–294.
469. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*. 2006;116:3127–3138.
470. Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J. Stoichiometric Phosphorylation of Cardiac Ryanodine Receptor on Serine 2809 by Calmodulin-dependent Kinase II and Protein Kinase A. *J Biol Chem*. 2003;278:38593–38600.
471. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ Res* [Internet]. 2004 [cited 2024 Nov 6];94. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2>
472. Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, ter Keurs H, Chen SRW. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon β -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J*. 2006;396:7–16.
473. Potenza DM, Janicek R, Fernandez-Tenorio M, Camors E, Ramos-Mondragón R, Valdivia HH, Niggli E. Phosphorylation of the ryanodine receptor 2 at serine 2030 is required for a complete β -adrenergic response. *J Gen Physiol*. 2019;151:131–145.
474. Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I Holoenzyme Structure Reveals a Mechanism for cAMP-Dependent Activation. *Cell*. 2007;130:1032–1043.
475. Krall J, Taskén K, Staheli J, Jahnsen T, Movsesian MA. Identification and Quantitation of cAMP-dependent Protein Kinase R Subunit Isoforms in Subcellular Fractions of Failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:971–980.
476. Cadd GG, Uhler MD, McKnight GS. Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*. 1990;265:19502–19506.
477. Sadeghian F, Castaneda PG, Amin MR, Cram EJ. Functional Insights into Protein Kinase A (PKA) Signaling from *C. elegans*. *Life*. 2022;12:1878.
478. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell*. 2000;101:365–376.

479. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:511–518.
480. Shan J, Betzenhauser MJ, Kushnir A, Reiken S, Meli AC, Wronska A, Dura M, Chen B-X, Marks AR. Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:4375–4387.
481. Shan J, Kushnir A, Betzenhauser MJ, Reiken S, Li J, Lehnart SE, Lindegger N, Mongillo M, Mohler PJ, Marks AR. Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:4388–4398.
482. Ginsburg KS, Bers DM. Modulation of excitation–contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *J Physiol*. 2004;556:463–480.
483. Carter S, Colyer J, Sitsapesan R. Maximum Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine-2809 by Protein Kinase A Produces Unique Modifications to Channel Gating and Conductance Not Observed at Lower Levels of Phosphorylation. *Circ Res*. 2006;98:1506–1513.
484. Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, Powers PA, Valdivia HH. Intact β -Adrenergic Response and Unmodified Progression Toward Heart Failure in Mice With Genetic Ablation of a Major Protein Kinase A Phosphorylation Site in the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ Res*. 2007;101:819–829.
485. MacDonnell SM, García-Rivas G, Scherman JA, Kubo H, Chen X, Valdivia H, Houser SR. Adrenergic Regulation of Cardiac Contractility Does Not Involve Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808. *Circ Res* [Internet]. 2008 [cited 2024 Nov 6];102. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.108.174722>
486. Zhang H, Makarewich CA, Kubo H, Wang W, Duran JM, Li Y, Berretta RM, Koch WJ, Chen X, Gao E, Valdivia HH, Houser SR. Hyperphosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808 Is Not Involved in Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2012;110:831–840.
487. Houser SR. Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias: Protein Kinase A–Mediated Hyperphosphorylation of the Ryanodine Receptor at Serine 2808 Does Not Alter Cardiac Contractility or Cause Heart Failure and Arrhythmias. *Circ Res*. 2014;114:1320–1327.
488. Alvarado FJ, Chen X, Valdivia HH. Ablation of the cardiac ryanodine receptor phospho-site Ser2808 does not alter the adrenergic response or the progression to heart failure in mice. Elimination of the genetic background as critical variable. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;103:40–47.
489. Stange M, Xu L, Balshaw D, Yamaguchi N, Meissner G. Characterization of Recombinant Skeletal Muscle (Ser-2843) and Cardiac Muscle (Ser-2809) Ryanodine Receptor Phosphorylation Mutants. *J Biol Chem*. 2003;278:51693–51702.
490. Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SRW. Protein Kinase A Phosphorylation at Serine-2808 of the Cardiac Ca^{2+} -Release Channel (Ryanodine Receptor) Does Not Dissociate 12.6-kDa FK506-Binding Protein (FKBP12.6). *Circ Res*. 2004;94:487–495.
491. Xiao J, Tian X, Jones PP, Bolstad J, Kong H, Wang R, Zhang L, Duff HJ, Gillis AM, Fleischer S, Kotlikoff M, Copello JA, Chen SRW. Removal of FKBP12.6 Does Not Alter the Conductance and

- Activation of the Cardiac Ryanodine Receptor or the Susceptibility to Stress-induced Ventricular Arrhythmias. *J Biol Chem*. 2007;282:34828–34838.
492. Ono K, Yano M, Ohkusa T, Kohno M, Hisaoka T, Tanigawa T, Kobayashi S, Kohno M, Matsuzaki M. Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca²⁺ release in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000;48:323–331.
493. Gómez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, Pereira L, Zissimopoulos S, Zhu X, Schaub R, Perrier E, Perrier R, Latouche C, Richard S, Picot M-C, Jaisser F, Lai FA, Valdivia HH, Benitah J-P. Mineralocorticoid Modulation of Cardiac Ryanodine Receptor Activity Is Associated With Downregulation of FK506-Binding Proteins. *Circulation*. 2009;119:2179–2187.
494. Yuchi Z, Lau K, Van Petegem F. Disease Mutations in the Ryanodine Receptor Central Region: Crystal Structures of a Phosphorylation Hot Spot Domain. *Structure*. 2012;20:1201–1211.
495. Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Warltier DC, Cheng H, Chen SRW. Characterization of a Novel PKA Phosphorylation Site, Serine-2030, Reveals No PKA Hyperphosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor in Canine Heart Failure. *Circ Res*. 2005;96:847–855.
496. Wang Y, Li C, Shi L, Chen X, Cui C, Huang J, Chen B, Hall DD, Pan Z, Lu M, Hong J, Song L-S, Zhao S. Integrin β 1D Deficiency–Mediated RyR2 Dysfunction Contributes to Catecholamine-Sensitive Ventricular Tachycardia in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation*. 2020;141:1477–1493.
497. Chao LH, Stratton MM, Lee I-H, Rosenberg OS, Levitz J, Mandell DJ, Kortemme T, Groves JT, Schulman H, Kuriyan J. A Mechanism for Tunable Autoinhibition in the Structure of a Human Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II Holoenzyme. *Cell*. 2011;146:732–745.
498. Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*. 2000;10:322–328.
499. Lai Y, Nairn AC, Gorelick F, Greengard P. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca²⁺/calmodulin-independence. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84:5710–5714.
500. Rosenberg OS, Deindl S, Sung R-J, Nairn AC, Kuriyan J. Structure of the Autoinhibited Kinase Domain of CaMKII and SAXS Analysis of the Holoenzyme. *Cell*. 2005;123:849–860.
501. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin Trapping by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Science*. 1992;256:1199–1202.
502. Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ. Differential Inactivation of Postsynaptic Density-Associated and Soluble Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II by Protein Phosphatases 1 and 2A. *J Neurochem*. 1997;68:2119–2128.
503. Tombes RM, Faison MO, Turbeville JM. Organization and evolution of multifunctional Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase genes. *Gene*. 2003;322:17–31.
504. Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol*. 2005;171:537–547.

505. Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM. The effect of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol*. 1997;501:17-31.
506. Currie S, Loughrey CM, Craig M-A, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J*. 2004;377:357-366.
507. Guo T, Zhang T, Mestril R, Bers DM. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation of Ryanodine Receptor Does Affect Calcium Sparks in Mouse Ventricular Myocytes. *Circ Res*. 2006;99:398-406.
508. Wu Y, Valdivia HH, Wehrens XHT, Anderson ME. A Single Protein Kinase A or Calmodulin Kinase II Site Does Not Control the Cardiac Pacemaker Ca²⁺ Clock. *Circ Arrhythm Electrophysiol* [Internet]. 2016 [cited 2024 Nov 6];9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCEP.115.003180>
509. Benitah J-P, Perrier R, Mercadier J-J, Pereira L, Gómez AM. RyR2 and Calcium Release in Heart Failure. *Front Physiol*. 2021;12:734210.
510. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Heart Failure. *Circ Res*. 2005;97:1314-1322.
511. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, Heller Brown J. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:1230-1240.
512. Van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, Wang Q, De Almeida AC, Skapura DG, Anderson ME, Bers DM, Wehrens XHT. Ryanodine Receptor Phosphorylation by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice With Heart Failure. *Circulation*. 2010;122:2669-2679.
513. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, Chen-Izu Y, Cornea RL, Wehrens XHT, Bers DM. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;98:62-72.
514. Campbell HM, Quick AP, Abu-Taha I, Chiang DY, Kramm CF, Word TA, Brandenburg S, Hulsurkar M, Alsina KM, Liu H-B, Martin B, Uhlenkamp D, Moore OM, Lahiri SK, Corradini E, Kamler M, Heck AJR, Lehnart SE, Dobrev D, Wehrens XHT. Loss of SPEG Inhibitory Phosphorylation of Ryanodine Receptor Type-2 Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2020;142:1159-1172.
515. Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, Villén J, Haas W, Sowa ME, Gygi SP. A Tissue-Specific Atlas of Mouse Protein Phosphorylation and Expression. *Cell*. 2010;143:1174-1189.
516. Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Nov 6];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00101/abstract>
517. Haji-Ghassemi O, Yuchi Z, Van Petegem F. The Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation Hotspot Embraces PKA in a Phosphorylation-Dependent Manner. *Mol Cell*. 2019;75:39-52.e4.

518. Janicek R, Camors EM, Potenza DM, Fernandez-Tenorio M, Zhao Y, Dooge HC, Loaiza R, Alvarado FJ, Egger M, Valdivia HH, Niggli E. Dual ablation of the RyR2-Ser2808 and RyR2-Ser2814 sites increases propensity for pro-arrhythmic spontaneous Ca²⁺ releases. *J Physiol*. 2024;602:5179–5201.
519. Shetty P, Mu L, Shi Y. Fat mimicking compounds as grease thickeners in Poly(ethylene glycol)/water: Adopting the solution from history. *J Colloid Interface Sci*. 2020;578:619–628.
520. Lin R, Hiscott J. A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol Cell Biochem*. 1999;191:169–180.
521. Xiao B, Tian X, Xie W, Jones PP, Cai S, Wang X, Jiang D, Kong H, Zhang L, Chen K, Walsh MP, Cheng H, Chen SRW. Functional Consequence of Protein Kinase A-dependent Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor. *J Biol Chem*. 2007;282:30256–30264.
522. Kujala K, Paavola J, Lahti A, Larsson K, Pekkanen-Mattila M, Viitasalo M, Lahtinen AM, Toivonen L, Kontula K, Swan H, Laine M, Silvennoinen O, Aalto-Setälä K. Cell Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Reveals Early and Delayed Afterdepolarizations. *PLoS ONE*. 2012;7:e44660.
523. Cerrone M, Colombi B, Santoro M, Di Barletta MR, Scelsi M, Villani L, Napolitano C, Priori SG. Bidirectional Ventricular Tachycardia and Fibrillation Elicited in a Knock-In Mouse Model Carrier of a Mutation in the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ Res* [Internet]. 2005 [cited 2024 Nov 6];96. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000169067.51055.72>
524. Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, Suetomi T, Susa T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Yamamoto T, Matsuzaki M. Dantrolene, a Therapeutic Agent for Malignant Hyperthermia, Inhibits Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in a RyR2R2474S/+ Knock-In Mouse Model. *Circ J*. 2010;74:2579–2584.
525. Lopez R, Janicek R, Fernandez-Tenorio M, Courtehoux M, Matas L, Gerbaud P, Gomez AM, Egger M, Niggli E. Uptake-leak balance of SR Ca²⁺ determines arrhythmogenic potential of RyR2R420Q+/- cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2022;170:1–14.
526. Butler TAJ, Paul JW, Chan E-C, Smith R, Tolosa JM. Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures. *BioMed Res Int*. 2019;2019:1–15.
527. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2013;433:105–111.
528. Wei J, Guo W, Wang R, Paul Estillore J, Belke D, Chen Y-X, Vallmitjana A, Benitez R, Hove-Madsen L, Chen SRW. RyR2 Serine-2030 PKA Site Governs Ca²⁺ Release Termination and Ca²⁺ Alternans. *Circ Res* [Internet]. 2023 [cited 2024 Nov 6];132. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.122.321177>
529. St. Pierre SR, Peirlinck M, Kuhl E. Sex Matters: A Comprehensive Comparison of Female and Male Hearts. *Front Physiol*. 2022;13:831179.
530. Molina DK, DiMaio VJM. Normal Organ Weights in Women: Part I—The Heart. *Am J Forensic Med Pathol*. 2015;36:176–181.

531. Gray H. *Anatomy of the Human Body*, Vol. 8. Philadelphia, PA: Lea & Febiger. 1878.
532. James AF, Choisy SCM, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;94:265–319.
533. Dart A. Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2002;53:678–687.