THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Électrophysiologie cardiaque

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2

Unité de recherche UMR 5203 : Institut de Génomique Fonctionnelle
Équipe « Cardioprotection, physiopathologie du rythme cardiaque et ischémie »

Rôle des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ dans le contrôle de la fréquence cardiaque par les catécholamines

Présentée par Julien LOURADOUR
Le 06 décembre 2021

Sous la direction de Matteo Elia MANGONI, Jean-Yves LE GUENNEC et Pietro MESIRCA

Devant le jury composé de

Patrick Bois, Professeur à l'Université de Poitiers, laboratoire STIM, Poitiers	Président du jury, Rapporteur
Michel De Waard, Directeur de Recherche, Institut du Thorax, Nantes	Rapporteur
Ana-Maria Gomez, Directrice de Recherche, INSERM UMRS-1180, Châtenay-Malabry	Examinatrice
Matteo Elia Mangoni, Directeur de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier	Directeur de thèse
Jean-Yves Le Guennec, Professeur à l'Université de Montpellier, INSERM UMRS-1046, Montpellier	Co-Directeur de thèse
Pietro Mesirca, Chargé de Recherche, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier	Co-Encadrant de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Pfffffiiiou…… c'est enfin fini ! Non pas que je souhaite particulièrement que cela se termine mais bon, 3 ans quand même c'est assez long ! Bon allez, quand faut y aller, faut y aller. Parce qu'il y a quand même un sacré paquet de monde à remercier, et ce en espérant que je n'oublie personne…

En tout premier lieu, je tiens à remercier Messieurs Michel De Waard et Patrick Bois, ainsi que Madame Ana-Maria Gomez, pour avoir accepté de juger de la qualité de mes travaux de recherche et de thèse en tant que membres du jury. Je vais essayer de garder cette partie « remerciements » courte car il y a déjà beaucoup à lire dans la suite du manuscrit ! Je dis bien essayer…

Matteo, je vais commencer par toi. Dès le début de ma thèse et les problèmes administratifs de direction tu t'es battu pour que je puisse quand même la réaliser alors que l'école doctorale voulait que je « change de sujet de thèse ». Merci de m'avoir défendu. Merci également de m'avoir proposé un autre projet au bout de 5 mois de thèse lorsqu'on a vu que les résultats préliminaires sur la mitochondrie ne donnaient rien. Je connais des thésards dont les directeurs de thèse s'acharnent et qui se retrouvent en galère à la fin de leur thèse. Grâce à ça j'ai pu finir ma thèse tranquillement et écrire un papier. J'admire énormément ton esprit scientifique et ta façon de raisonner et j'espère un jour être capable de réfléchir de la même manière. Merci pour tout.

Jean-Yves, merci d'avoir été mon co-directeur de thèse. Ce n'était pas prévu au départ mais je pense pourtant que ça a été la meilleure décision prise. Malgré ton emploi du temps de ministre avec les cours et ta recherche tu as toujours trouvé le temps de suivre le projet et de donner de précieux conseils et avis. Tu m'as toujours soutenu et encouragé et j'ai pu me tourner vers toi pour tout et n'importe quoi. J'admire également ton brillant esprit de professeur et j'espère que plus tard je serai un aussi grand prof que toi. Sur une note plus festive, merci pour tous ces moments passés au Drapeau Rouge, les verres, les rires et la joie de vivre ☺

Pietro je souhaite te remercier pour tout, vraiment **TOUT**. Tu m'as formé, suivi, soutenu, aidé, conseillé, encouragé, bref, tu as tout le temps été présent et c'est grâce à toi que j'ai pu finir ce travail. Ta sollicitude, ta générosité, ton écoute et ton altruisme font que tous les étudiants qui passent par notre équipe t'apprécient et savent qu'ils peuvent compter sur toi. Sur un plan plus personnel j'ai énormément apprécié travailler à tes côtés pendant ces 3 années, à pouvoir parler de tout et de rien, rire de tout et de rien, et surtout à apprendre. J'espère sincèrement que mon avenir professionnel nous amènera à nous revoir après mon départ. Merci du fond du cœur ☺

Merci également aux autres membres de l'équipe. Merci Isabelle pour ta constante bonne humeur, tes conseils, ton aide et ta sollicitude. Tu égayes le laboratoire. Merci Angelo pour tes conseils et ton écoute. Merci Christian pour tes conseils et ton soutien et surtout merci

d'avoir été le public forcé de mes blagues ! Merci Laura pour égayer le laboratoire de ton rire, merci pour toutes les blagues (tu es mon public numéro 1 dans le labo), les musiques et la bonne ambiance pendant les manips ☺. Merci Eleonora d'être mon amie, merci pour les soirées « pâtes carbonara », attention, les vraies, les italiennes, et pour les soirées Stranger things ou chrono du rockstore ! Merci Leïla pour nos soutiens mutuels dans les temps durs mais tu vois, on aura réussi finalement ☺. Merci Carlota pour ta bonne humeur et pour apporter une touche de soleil espagnol au labo. Bon courage pour la suite, tu y es presque, et tu sais que jusqu'au bout je continuerai à te faire peur ! Manon, merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme. Courage, la thèse ça se passe bien tu vas y arriver !

Charlotte, ma partenaire indéfectible de labo, cela fait maintenant 1 an que tu as soutenu et que tu as laissé un vide dans le bureau à côté de moi. A chaque fois que je regarde ton ancien bureau, pardon, nos 2 bureaux adjacents qui n'étaient en réalité qu'un seul bureau partagé, je repense à tous ces moments qu'on a passés pendant 2 ans. Tant de chemin parcouru depuis ! Et oui, celui que tu voyais comme le « petit » thésard va soutenir bientôt. Merci pour avoir été là. Je retiens surtout les fous rires qu'on a pu avoir et je ne peux m'empêcher de sourire en repensant au fait que tu volais toujours mes stylos (pas merci pour ça), qu'on était obligé de mettre un post-it « chut » pour se concentrer parce que sinon c'était impossible de ne pas se parler de tout et de rien, qu'on ne pouvait pas être au labo sans s'arroser avec de l'eau, que je t'ai rendu parano avec tes cheveux en te faisant peur, et surtout que ma vie au labo aurait été bien fade sans toi. Merci d'être devenue une amie sur qui je peux compter ☺

Un grand merci à la team MIST pour le soutien de ce dernier mois. Que de rires dans cette salle de travail qu'on a squatté. Agelia, Lulu et Clem merci pour tous les bons moments ! Allez courage, on va tous le faire !

Lulu, merci pour ton amitié et ton soutien depuis le début. Merci d'être toujours partante pour tout même s'il faut que tu apprennes à dire non parfois. Merci pour les soirées films, ciné, jeux, bars, boîtes (un peu trop sous la pluie parfois), merci pour tout ! Courage tu vas y arriver je sais que tu peux le faire ☺.

Merci à ma cousine Ali qui, malgré elle, a dû m'écouter répéter tout le temps. Que ce soit les présentations pour les congrès ou la préparation de MT180, merci pour avoir validé l'humour ☺. Merci pour avoir égayé mes soirées (toutes les soirées) confinement avec nos films en visio.

Merci à l'équipe du Drapeau Rouge (ou DP comme dirait Marie) pour le soutien et les verres ! Merci Jean-Yves, Laura, Marie et notre Odile nationale.

Merci Sophie pour avoir amené de la bonne humeur en TP pendant ces 2 années de monitorat et pour autant aimer les ragots. Je sais que je serai toujours ton MEILLEUR moniteur !

Las Gambas, loin des yeux, près du cœur. Je n'allais certainement pas vous oublier. Thibaut, Estelle, Bastien, Flavie, Leslie, Albin, Raphou, Maud et Max (ma team Koh lanta), Florent, merci pour ces vacances toutes plus merveilleuses les unes que les autres et ô combien appréciées pendant cette thèse. Depuis la fac et l'AGBS et encore pour longtemps !

Danse à 3 crew, l'équipe des pourfendeurs d'escape, merci pour tous ces moments et ces fous rires et surtout pour cette dans mémorable et inoubliable. Julien, Adrien, Laura la perfect team pour squatter le bureau des Jopling ! Je ne rajouterai qu'une seule chose : les films « Le Hobbit » sont très biens, n'en déplaise à toi Adrien ;) !

Merci Anne pour ton amitié, ton soutien et ton écoute, je sais que tu es la fan number 1 de mes blagues en oral.

Merci Alex, Camcam, Pinpin et Youhan pour les soirées, les sorties canoë et l'amitié.

Merci également aux amis de toujours Lou, Chloé, Micka, Laura, Jean-Nicolas, Anastasia.

Merci à mes parents sans qui je ne serais pas là (évidemment) et à mon frère qui m'ont toujours soutenu sans douter.

Merci à Muriel pour avoir organisé la logistique de ma soutenance par visio et surtout merci pour l'illustration de mes débuts de chapitre. Tu as su parfaitement retranscrire ce que j'avais en tête tout en l'améliorant. Grâce à toi mon manuscrit est enfin complet, merci pour tout ☺

Laura, je vais finir par toi. Je pense que le mot « merci » n'est pas suffisant pour décrire à quel point tu as été importante pour ma thèse. Je parle de soutien depuis le début mais mon plus grand soutien au cours de ces 3 années, c'était toi. Soutien dans la thèse mais également soutien en dehors et ça tu le sais bien. Tic et Tac au labo, tu es LA collègue (tout le monde a ce collègue qui le met de bonne humeur et qui rend la vie au travail géniale). Si je tombe, tu tombes, et je te l'ai déjà prouvé avec le SPIN ☺. Je ne compte plus les fous rires qu'on a pu avoir, qué c'nard, sauter de liebherr en liebherr, et j'en passe. Grâce à toi l'équipe Jopling est devenu un peu un repère et j'y rentre beaucoup trop comme dans un moulin. Merci d'être devenue mon amie, si je ne devais retenir qu'une seule personne de ces 3 ans de thèse ça serait toi (bon j'espère quand même avoir le droit de retenir les autres personnes, mais tu as compris le message ☺). J'espère quand même avoir dépassé le stade bouche-trou depuis le temps. Je sais que je t'abandonne en ne faisant pas de 4ème année mais tu sais très bien que notre plan de carrière est tout tracé, on se retrouvera pour être les futurs Adèle et Marie ! En tout cas ces 3 années avec toi c'était tiguidou ! Sincèrement merci pour vraiment tout ☺

Voilà, j'ai terminé, vous pouvez passer à la suite du manuscrit qui sera beaucoup moins sentimentale ☺

Résumé

Le cœur est un organe autonome dont l'activité contractile est dépendante d'une activité électrique intrinsèque spontanée. Au niveau de l'oreillette droite se situe le nœud sinoatrial (NSA) au sein duquel une impulsion électrique spontanée est initiée puis propagée à l'ensemble du tissu cardiaque, provoquant alors la contraction des cardiomyocytes. La clé de l'automaticité cardiaque réside dans le fait que les cellules sinusales (SANC) ou « pacemaker » sont capables de se dépolariser spontanément (dépolarisation diastolique, DD) ce qui amène progressivement leur potentiel de membrane jusqu'au seuil de déclenchement du potentiel d'action (PA) sinusal. Complexe et encore non entièrement comprise, la dépolarisation diastolique est due à une robuste interaction entre l'activation séquentielle de canaux ioniques de la membrane cellulaire (canaux s'ouvrant par hyperpolarisation HCN4, canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ et de type T $Ca_v3.1$) et une dynamique calcique intracellulaire avec des relargages calciques spontanés (LCRs) diastoliques par le réticulum sarcoplasmique *via* les récepteurs à la ryanodine (RyR). En déclenchant la voie de signalisation adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A (AMPc/PKA) la régulation adrénergique par le système nerveux autonome sympathique permet d'accélérer la fréquence de dépolarisation des SANC.

L'objectif de ma thèse était de déterminer le rôle des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique des SANC. La technique de patch-clamp sur SANC isolées de souris a montré que l'inhibition pharmacologique des canaux $Ca_v1.3$ inversait complètement les effets de la stimulation adrénergique sur la fréquence de dépolarisation des SANC. Les expérimentations d'imagerie calcique ont permis de révéler que la synchronisation des LCRs sous stimulation adrénergique était dépendante des canaux $Ca_v1.3$. Ainsi, les canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ semblent être les régulateurs majoritaires de la réponse chronotrope positive chez la souris.

Abstract

The heart is a spontaneously active organ whose contractile activity is dependent of a spontaneous intrinsic electrical activity, which refers to one of the fundamental cardiac properties: cardiac automaticity. The electrical signal is generated in the sino-atrial node tissue (SAN) and is then propagated throughout the heart, triggering cardiomyocytes contraction. Cardiac automaticity relies on the capacity of pacemaker sino-atrial node cells (SANC) to spontaneously depolarize (diastolic depolarization, DD) which brings membrane potential to the threshold of the sinoatrial action potential (AP). Complex and not entirely understood yet, diastolic depolarization results from a robust interplay of membrane ion channels activity (hyperpolarization-activated HCN4 channels, L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ calcium channels) and intracellular calcium dynamics with spontaneous local calcium releases (LCRs) from the sarcoplasmic reticulum *via* the ryanodine receptors (RyR). By triggering cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) catecholaminergic stimulation of pacemaker activity by sympathetic autonomic nervous system accelerates the firing frequency of SANC.

The objective of my PhD was to determine the role of L-type $Ca_v1.3$ calcium channels in the catecholaminergic regulation of SANC. Patch-clamp experiments on isolated mouse SANC showed that pharmacologic inhibition of $Ca_v1.3$ channels completely reversed the effects of adrenergic stimulation on the frequency. Imaging of intracellular calcium further revealed that LCRs synchronization under activation of adrenergic receptors was dependent of $Ca_v1.3$ channels activity. Hence, L-type $Ca_v1.3$ calcium channels seem to be the main mediator of the positive chronotropic response of pacemaker activity in mouse SANC.

Valorisation des travaux de recherche

Publications

Projet de thèse :

Louradour J, Bortolotti O, Torre E, Bidaud I, Le Guennec JY, Mangoni ME, Mesirca P. *L-type $Ca_v1.3$ calcium channels are required for beta-adrenergic triggered automaticity in dormant mouse sino-atrial myocytes*. (**en cours de soumission**)

Projets annexes :

Baudot M, Torre E, Bidaud I, **Louradour J**, Torrente AG, Fossier L, Talssi L, Nargeot J, Barrère-Lemaire S, Mesirca P, Mangoni ME (2020). *Concomitant genetic ablation of L-type $Ca_v1.3$ (α1D) and T-type $Ca_v3.1$ (α1G) Ca^{2+} channels disrupts heart automaticity*. SciRep 10, 18906

Chaigne S, Cardouat G, **Louradour J**, Vaillant F, Charron S, Sacher F, Ducret T, Guinamard R, Vigmond E, Hof T (2021) *Transient receptor potential vanilloid 4 channel participates in mouse electrical activity*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 320, H1156-H1169

Bartolucci C, Mesirca P, Sales Bellès C, Ricci E, Torre E, **Louradour J**, Mangoni ME, Severi S. *A novel computational model of pacemaker activity in the mouse atrioventricular node cell*. (**en préparation**)

Présentations en congrès

- "**How to wake the sinoatrial node cells**" Séminaire interne, *Montpellier*, Avril 2021

- "**Autonomous initiation of pacemaking by L-type $Ca_v1.3$ calcium channels in mouse sino-atrial myocytes**" Printemps de la Cardiologie, *online*, Octobre 2021

- "**Role of L-type $Ca_v1.3$ calcium channels in dormant, dysrhythmically and rhythmically firing single pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node**" SPIN's day, *Montpellier*, Octobre 2019

- "**L-type $Ca_v1.3$ calcium channels as a pacemaker mechanism in sinoatrial node cells**" Séminaire interne, *Montpellier*, Juin 2019

Posters

- « **L-type Cav1.3 calcium channels are key actors in beta-adrenergic triggered automaticity in dormant mouse sino-atrial myocytes** » Printemps de la Cardiologie, *online*, Mai 2021

- « **Autonomous initiation of pacemaking by L-type $Ca_v1.3$ calcium channels in mouse sino-atrial myocytes** » European Heart Rhythm Association (EHRA), *online*, Avril 2021 (Prix poster)

- « **Role of L-type Cav1.3 calcium channels in dormant, dysrhythmically and rhythmically firing single pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node** » 30ème congrès des Canaux Ioniques, *Sète*, Septembre 2019

Formations dans le cadre du doctorat

- Ecole d'électrophysiologie de Montpellier – 25 heures
- Formation Conception et réalisation de projets et procédures expérimentales (rongeurs) – 25 heures
- MOOC intégrité scientifique dans les métiers de la recherche – 15 heures
- Atelier d'improvisation théâtrale – 16 heures
- Concours Ma thèse en 180 secondes – 20 heures

Enseignement

2019-2021 :

- TP de physiologie animale en L3 (40 heures)
- TD de biochimie et métabolisme cellulaire en L2 (24 heures)

2020-2021 :

- TP de physiologie animale en L3 (40 heures)
- TD de biochimie et métabolisme cellulaire en L2 (24 heures)

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

AC : Adénylate cyclase

Ach : Acétylcholine

ACTH : Hormone adrénocorticotrope

AMPc : Adénosine mono-phosphate cyclique

ATP : Adénosine tri-phosphate

Ca^{2+} : ion calcium

CaMKII : Calcium-calmoduline kinase II

Ca_v : Isoforme des canaux calciques voltage-dépendants

CICR : Calcium-induced calcium release

CM : Cardiomyocytes

CNBD : Cyclic Nucleotide Binding Domain

CO_2 : Dioxyde de carbone

Cx : Connexine

DD : Dépolarisation diastolique

DHP : Dihydropyridines

EAG : Ether-a-go-go (gène)

ECG : Electrocardiogramme

ERG : Ether-a-go-go related gene

GDP : Guanosine di-phosphate

Gi : Protéine G inhibitrice

Gs : Protéine G stimulatrice

GTP : Guanosine tri-phosphate

HCN4 : Canaux activés par hyperpolarization

HVA : Haut seuil d'activation

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

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

$I_{Cav1.3}$: Courant calcique de type L porté par $Ca_v1.3$

$I_{Cl,ir}$: Courant chlore rectifiant entrant

I_f : Courant “funny” porté par les canaux HCN

I_{Kr} : Courant potassique retardé rapide

I_{Ks} : Courant potassique retardé lent

I_{Na} : Courant sodique

I_{NCX} : Courant de l’échangeur NCX

ISO : Isoprénaline

I_{St} : Courant sodique soutenu

LCR : Local calcium releases

LTCC : Canaux calciques de type L

MCU : Canal uniporteur de la mitochondrie

MDP : Dépolarisation diastolique maximale

NAV : Nœud auriculo-ventriculaire

Na_v : Isoforme des canaux sodiques voltage-dépendants

Na^+ : ion sodium

NCX : Echangeur sodium/calcium

NSA : Nœud sinusal

O_2 : Dioxygène

PA : Potentiel d’action

PC : Cellules de Purkinje

PDE : Phosphodiestérase

PFA : Paraformaldéhyde

PF : Fibres de Purkinje

PKA : Protéine kinase A

PLB : Phospholamban

PMCA : Pompe Calcium ATPase plasmatique

PMJ : Jonction Purkinje-muscle

pPLBS16 : Phospholamban phosphorylé sur la sérine 16

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RMP : Potentiel de repos

RS : Réticulum sarcoplasmique

RTCC : Canal calcique de type R

RyR : Récepteurs à la Ryanodine

SANC : Cellules sinusales

SERCA : Pompe ATPase calcique du reticulum sarco/endoplasmique

SOCE : Store-operated calcium entry

SSS : Sick Sinus Syndrome

TRP : Canaux “Transient Receptor Potential”

TTCC : Canaux calciques de type T

TTX : Tétrodotoxine

VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants

Vm : Potentiel membranaire

WT : phénotype « sauvage » (Wild-Type)

$[Ca^{2+}]_i$: Concentration calcique intracellulaire

Table des matières

Remerciements 5

Résumé 9

Abstract 10

Valorisation des travaux de recherche 11

Publications 11

Présentations en congrès 11

Posters 12

Formations dans le cadre du doctorat 12

Enseignement 12

Liste des abréviations 13

Tables des figures 19

Introduction 21

Chapitre 1 : Le cœur, un organe électrique 23

I.1 Physiologie cardiaque 24

I.1.1 Structure, histologie et cytologie du cœur 24

I.1.2 Circulation sanguine 26

I.1.3 Activité électrique cardiaque et conduction du signal électrique 29

I.1.4 Potentiel d'action cardiaque et canaux ioniques 30

I.1.5 Couplage excitation-contraction 33

I.1.6 Electrocardiogramme (ECG) 35

I.2 Centres rythmogènes de l'automatisme cardiaque 37

I.2.1 Nœud sino-atrial ou sinusal 37

I.2.2 Nœud auriculo-ventriculaire 42

I.2.3 Fibres de Purkinje 44

Chapitre 2 : Mécanismes responsables de l'automaticité cardiaque 47

II.1 L'horloge membranaire 48

II.1.1 I_f, le « funny current », ou le courant pacemaker 48

II.1.2 Canaux calciques voltage-dépendants 51

Canaux calciques de type L (LTCC) 53

Canaux calciques de type T (TTCC) 54

Canal calcique de type R (RTCC) 55

II.1.3 Le courant soutenu I_{st} 56

II.1.4 Le courant sodique I_{Na} 57

II.1.5 Courants potassiques 59

Courant K^+ retardé rapide (I_{Kr}) 59

Courant K^+ retardé lent (I_{Ks}) 60

Courant K^+ dépendant de la concentration en ATP I_{KATP} 62

Courant K^+ activé par l'acétylcholine I_{KACh} 63
II.1.6 Les courants chlore Cl^- 64
II.1.7 Les canaux « Transient Receptor Potential » TRP 65
II.2 L'horloge calcique 67
II.2.1 Relargages spontanés de calcium par les RyRs 68
II.2.2 L'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) 70
II.3 Horloge membranaire et horloge calcique : un système couplé 72
II.4 L'horloge membranaire à l'origine de l'horloge calcique ? 74
Chapitre 3 : Régulation de l'automatisme cardiaque 77
III.1 Régulation par le système nerveux autonome 78
III.1.1 Régulation adrénergique 79
III.1.2 Régulation muscarinique 82
III.2 Régulation par le système hormonal 83
Chapitre 4 : Pathologies associées au dysfonctionnement du NSA 85
IV.1 Quand le sinus est malade : Sick Sinus Syndrome 86
IV.2 Quand le sinus a soif : ischémie 87
IV.3 Quand le sinus est vieux 88
Matériel et méthodes 91
Modèles animaux 93
Enregistrement en patch-clamp sur cellule sinusale isolée 93
Prélèvement du cœur 93
Dissection du nœud sinusal 94
Dissociation enzymatique et mécanique des cellules sinusales 95
Acquisition de l'activité électrique en patch-clamp 97
Enregistrement de la dynamique calcique intracellulaire par microscopie confocale sur cellule sinusale isolée 98
Préparation des cellules sinusales isolées 98
Acquisition de l'activité calcique par microscopie confocale 99
Analyse des transitoires et sparks calciques 99
Expériences d'immunomarquage sur tissu sinusal entier et cellules sinusales isolées 100
Immunohistochimie du tissu sinusal intact 100
Immunocytochimie sur cellules sinusales isolées 100
Analyse statistique 102
Résultats 103
Abstract 105
Introduction 106
Methods 108
Results 111

L-type Ca^{2+} channels inhibition reversed the adrenergic-induced acceleration of AP frequency in isolated SANC from WT mice ... 111
Selective inhibition of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels reversed adrenergic-induced acceleration of AP frequency in isolated SANC of $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice ... 113
Selective inhibition of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels disrupts calcium dynamics in isolated $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC ... 115
β-adrenergic activation of SANC automaticity synchronizes LCRs in late diastole and is dependent of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels ... 119
L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels do not regulate phosphorylation level of PLB under β-adrenergic stimulation ... 121
Diminished diastolic currents in dormant SANC ... 121
Different expression of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels in intact NSA and isolated SANC ... 124
Discussion ... 124
$Ca_v1.3$ channels are critical effectors in β-adrenergic-induced firing in dormant SANC ... 124
$Ca_v1.3$ channels regulate enhanced clock coupling in response to β-adrenergic stimulation ... 127
$Ca_v1.3$ channels link M-clock and Ca^{2+}-clock by regulating LCRs ... 128
Physiological relevance of dormant SANC in vivo ... 129
Conclusions ... 130
Acknowledgement ... 130
Author contributions ... 130
Funding ... 130
References ... 131
Supplementary material ... 134
Résultats supplémentaires ... 139
La délétion génétique de $Ca_v1.3$ n'empêche pas l'induction d'une activité spontanée par la stimulation adrénergique dans les SANC dormantes ... 140
L'inhibition pharmacologique de $Ca_v1.3$ peut empêcher l'induction d'une activité spontanée par la stimulation adrénergique dans les SANC dormantes ... 140
Les SANC dormantes et firing ne semblent pas dépendre des mêmes mécanismes de régulation de leur fréquence de dépolarisation par stimulation adrénergique ... 141
Discussion ... 143
Les canaux $Ca_v1.3$ sont des acteurs clés de l'activité spontanée des SANC dormantes en contexte de stimulation adrénergique ... 146
Les canaux $Ca_v1.3$ régulent le couplage des horloges membranaire et calcique en réponse à une stimulation adrénergique ... 147
Les canaux $Ca_v1.3$ font le lien entre l'horloge membranaire et calcique en régulant les LCRs ... 149
Rôle physiologique des SANC dormantes *in vivo* ... 150
Conclusion et perspectives ... 153
Bibliographie ... 157
Annexe ... 171

Tables des figures

Figure 1 : Schéma d'une coupe frontale du cœur 25

Figure 2 : Photo d'un cardiomyocyte ventriculaire 26

Figure 3 : Schéma du système coronarien 28

Figure 4 : Schéma du système de conduction cardiaque 30

Figure 5 : Schéma des différents états des canaux ioniques 31

Figure 6 : Exemple de PAs sinusaux 33

Figure 7 : Schéma du couplage excitation-contraction 34

Figure 8 : Schéma des dérivations d'un ECG 36

Figure 9 : Photos de cellules sinusales 38

Figure 10 : Hétérogénéité du NSA 40

Figure 11 : Déplacements du site d'initiation de l'impulsion électrique au sein du NSA 41

Figure 12 : Modèle informatique 3D du NAV de lapin 43

Figure 13 : Architecture des fibres de Purkinje 45

Figure 14 : Exemple de courant I_f 45

Figure 15 : Classification des canaux calciques voltage-dépendants 51

Figure 16 : Structure de la sous-unité α1 des VDCC 52

Figure 17 : Courbes IV et d'inactivation des courants calciques $Ca_v1.3$, $Ca_v1.2$ et $Ca_v3.1$ 53

Figure 18 : Modèle de la contribution du courant $I_{Ca,R}$ au pacemaking 55

Figure 19 : Classification et structure des canaux Na^+ voltage-dépendants 57

Figure 20 : Inhibition de l'activité automatique des SANC par la TTX 58

Figure 21 : Inhibition du courant I_{Kr} dans des SANC de lapin 61

Figure 22: Structure des canaux Kir et contribution de I_{KATP} au pacemaking 62

Figure 23 : Schéma de l'activation des canaux GIRK1/4 par l'acétylcholine 63

Figure 24 : Classification des canaux TRP et contribution de TRPM4 au pacemaking 65

Figure 25 : Positionnement et distribution des courants ioniques par rapport à la DD 67

Figure 26 : Observation des LCRs dans un cardiomyocyte ventriculaire de rat 69

Figure 27 : Voltage-indépendance des LCRs 70

Figure 28 : Modélisation 3D de la structure de l'échangeur NCX 71

Figure 29 : Schéma de l'interaction des différents acteurs des horloges membranaire et calcique 73

Figure 30 : Diminution et désynchronisation des LCRs dans les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ 74

Figure 31 : Innervation du nœud sinusal de souris 79

Figure 32 : Schéma des voies de signalisation intracellulaires du système nerveux autonome 81

Figure 33 : Augmentation du courant $I_{Ca,L}$ et de l'expression de $Ca_v1.3$ et RyR2 lors de la gestation chez la souris 84

Figure 34 : Les différentes causes du SSS 86

Figure 35 : Mécanismes conduisant à la bradycardie associée au vieillissement 89

Figure 36 : Photo d'une préparation d'oreillettes de souris 95

Figure 37 : Différentes configurations de patch-clamp 98

Figure 38 : Protocole d'incubation des SANC pour l'expression fonctionnelle du PLB total et phosphorylé 101

Figure 1 du papier : L-type Ca^{2+} channels inhibition completely reversed the ISO-induced acceleration of depolarization rate in both dormant and spontaneously firing SANC isolated from WT mice 112

Figure 2 du papier : $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels are required for ISO-induced acceleration of depolarization 20rate in dormant and spontaneously firing SANC isolated from $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice 114

Figure 3 du papier : $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels inhibition decreased spontaneous Ca^{2+} transient rate under β-adrenergic stimulation in isolated $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC 117

Figure 4 du papier : $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels regulate local calcium releases during the diastole 118

Figure 5 du papier : L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels control LCRs synchronization upon β-adrenergic stimulation in late diastole 120

Figure 6 du papier : LCRs regulation by L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels is not due to a decrease in phosphorylated PLB levels 122

Figure 7 du papier : Diminished ionic current densities in dormant SANC 123

Figure 8 du papier : Different expression of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels in mouse SAN 126

Figure supplémentaire 1 du papier : Effect of L-type Ca^{2+} channel inhibition on the automaticity of dormant and firing WT SANC 135

Figure supplémentaire 2 du papier : Comparison of AP parameters under adrenergic stimulation between dormant and firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC 136

Figure supplémentaire 3 du papier : Effect of β-adrenergic stimulation on LCRs in non-responding dormant $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC 137

Figure supplémentaire 4 du papier : Early effect of $Ca_v1.3$ channels inhibition on LCR synchronisation 138

Figure 39 : Effet de la délétion génétique de $Ca_v1.3$ sur l'induction de l'automaticité des SANC dormantes par la stimulation adrénergique 139

Figure 40 : Effet de l'inhibition pharmacologique préalable de $Ca_v1.3$ sur l'induction de l'automaticité des SANC dormantes par la stimulation adrénergique 141

Figure 41 : Effets de l'inhibition pharmacologique du courant I_f en contexte de stimulation adrénergique 142

Figure 42 : Schéma bilan du rôle central de $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique des SANC 156

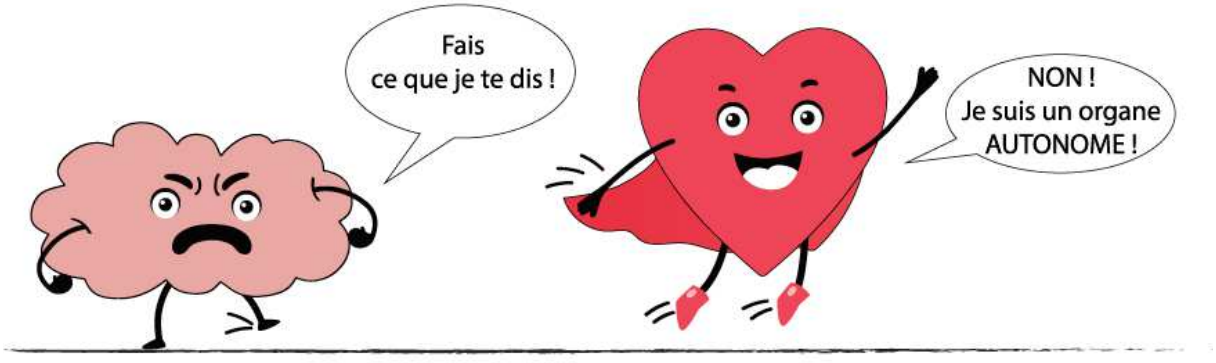
Introduction

<u>Chapitre 1</u> : Le cœur, un organe électrique

« *Le cœur a ses raisons que la raison ne connaît point* », Blaise Pascal, *<u>Pensées</u>*, 1669.

Qui n'a jamais entendu ou utilisé cet aphorisme pour justifier des actes irrationnels dictés par une passion amoureuse ? Les exemples sont nombreux : pourquoi Roméo et Juliette se suicident par amour ? Pourquoi Anakin Skywalker embrasse le côté obscur et devient Dark Vador par amour pour Padmée ? Ou encore pourquoi l'âne de Shrek tombe amoureux d'un dragon ? On répond alors que le cœur a ses raisons que la raison ignore. Pourtant, Blaise Pascal écrivait ces mots pour expliquer la ferveur religieuse qui, selon lui, ne passe pas par la raison mais bien par le cœur. Quoi qu'il en soit, Blaise Pascal ne se doutait certainement pas qu'en écrivant ces mots il décrivait alors une des propriétés fondamentales du cœur : **l'automatisme cardiaque**. Le cerveau, ou la raison, n'est en effet pas responsable des battements cardiaques car le cœur est un organe **autonome**, capable de fonctionner par lui-même.

Ce premier chapitre va donc vous montrer que le cœur a bel et bien ses propres raisons, des raisons qui sont d'ordre **électrique**.



I.1 Physiologie cardiaque

I.1.1 Structure, histologie et cytologie du cœur

Protéger ce qui nous est le plus cher, la Nature l'a très bien compris : exosquelette chez les arthropodes, peau chez les mammifères, tout est fait pour protéger le milieu intérieur et les organes de l'environnement extérieur. Il est d'ailleurs très intéressant de constater que chez les mammifères un soin particulier est apporté pour protéger trois organes précis, avec une double protection comprenant la peau mais également le squelette. Le cerveau est ainsi protégé par la boîte crânienne tandis que le cœur et les poumons le sont par la cage thoracique. Si ces organes sont si bien protégés c'est parce qu'ils sont d'une importance capitale pour notre survie. On ne peut pas vivre sans le cœur ni les poumons et même s'il est possible de « survivre » sans activité cérébrale, on se retrouve dans un état dépendant qui est propice aux prédateurs. En effet, à part l'Homme, les autres espèces ne disposent pas d'un corps médical s'occupant de la survie des individus en état de mort cérébrale.

C'est donc sous les côtes, entre les deux poumons, dans une région anatomique appelée le médiastin que se situe notre organe le plus important, j'ai nommé : le cœur (n'en déplaise aux neuroscientifiques). Affichant une préférence pour la gauche, il est légèrement orienté de ce côté, de telle sorte qu'environ 2/3 de sa masse sont situés du côté gauche. C'est un organe creux composé de quatre cavités distinctes qui servent de réservoirs temporaires au sang et qui sont les oreillettes gauche et droite et les ventricules gauche et droit. Les oreillettes et ventricules d'un même côté sont séparés par une cloison nommée le septum : septum auriculaire entre les 2 oreillettes et septum ventriculaire entre les 2 ventricules. Au contraire, l'oreillette droite communique avec le ventricule droit, de même que l'oreillette gauche avec le ventricule gauche *via* les valves auriculo-ventriculaires (Figure 1).

Le cœur est ancré dans le médiastin par le péricarde qui est formé de deux couches : le péricarde fibreux qui est la couche externe et le péricarde séreux qui est accolé au cœur. Le péricarde séreux, comme toute membrane séreuse, est composé d'un feuillet pariétal directement accolé au péricarde fibreux et d'un feuillet viscéral, l'épicarde, en contact direct avec le tissu musculaire cardiaque. L'espace entre ces deux feuillets est rempli d'un liquide séreux qui a un rôle lubrificateur empêchant les frottements entre les deux feuillets lors des contractions cardiaques. Cette enveloppe externe a donc un rôle de protection à la fois mécanique du tissu cardiaque, en limitant son mouvement ou son expansion en cas de surcharge

volumique, et physique en le protégeant d'infections provenant d'autres organes comme les poumons.

Directement sous l'épicarde se trouve le tissu musculaire cardiaque propre appelé le myocarde. Il est composé des cellules contractiles cardiaques, les cardiomyocytes (CMs), et d'une trame de tissu conjonctif dans laquelle se retrouvent des capillaires sanguins et des nerfs irriguant et innervant le myocarde. L'endocarde est la dernière tunique du cœur, sous le myocarde, en regard des cavités. Il comprend un endothélium en contact avec le sang, une couche sous-endothéliale comprenant des fibroblastes et une couche profonde juxta-myocardique qui comprend également des vaisseaux et des nerfs (Figure 1).

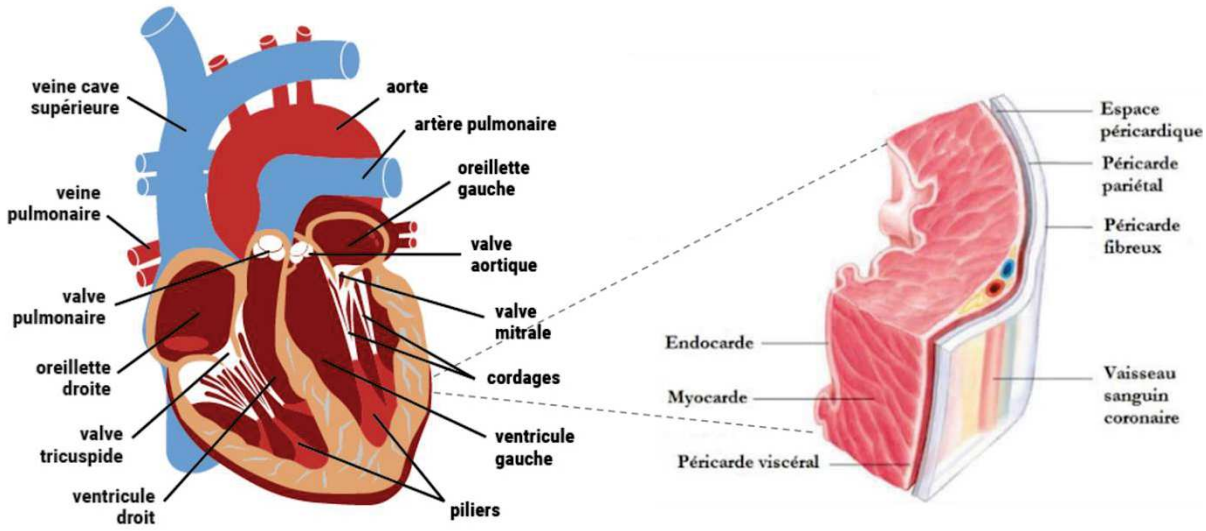


Figure 1 : Schéma d'une coupe frontale du cœur avec zoom sur les différentes tuniques cardiaques. D'après la *Fédération Française de Cardiologie*

En plus du tissu musculaire et conjonctif, il existe au sein du cœur un tissu particulier que je détaillerai un peu plus loin dans cette première partie et qui contient la clé de l'automaticité cardiaque : le tissu de conduction. Il est composé de cardiomyocytes particuliers qui assurent la génération et la propagation d'un signal électrique à tout le cœur.

Les cardiomyocytes sont les cellules fonctionnelles du myocarde qui permettent soit la contraction, soit la propagation du signal électrique. Ce sont des cellules de forme cylindrique et allongée (~ 100 µm) regroupées en fibres musculaires qui forment un syncytium fonctionnel grâce à des jonctions communicantes (connexines, Cx). Elles sont également striées, dû à l'organisation du système contractile des fibres d'actine et de myosine (Figure 2). Bien que les CMs occupent environ 80% du volume, ils ne comptent que pour 40% du nombre de cellules total, le reste étant des cellules endothéliales vasculaires, lymphatiques ou de l'endocarde (60%), des fibroblastes (20%) et des péricytes, neurones et cellules immunitaires (< 20%) (Pinto *et al*., 2016; Zhou and Pu, 2016). Considérées historiquement comme des cellules de soutien du myocarde, ces cellules non-cardiomyocytes ont en réalité une grande influence sur la contractilité du myocarde, son remodelage, sa régénération ou sa protection lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion (Camelliti *et al.*, 2005; Talman and Kivelä, 2018). Les nombreuses interactions entre tous ces types cellulaires permettent alors une contraction optimale du myocarde lors du cycle cardiaque.

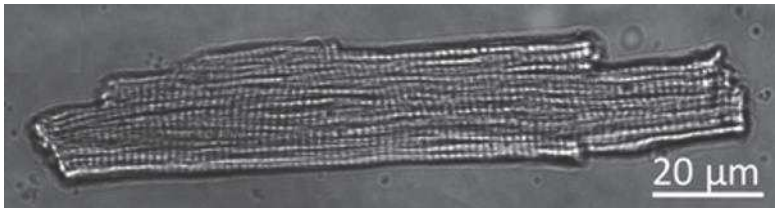


Figure 2 : Photo d'un cardiomyocyte ventriculaire. D'après Jian et al., (2016)

I.1.2 Circulation sanguine

Le cœur est une pompe ! Cette phrase simpliste résume pourtant à elle seule la fonction première du cœur qui consiste à faire circuler le sang dans tout l'organisme. William Harvey a été l'un des premiers à émettre cette idée d'une circulation sanguine dans un système fermé en 1628 dans son ouvrage *de Motu Cordis*. Vivement critiquée au début à cause de l'absence de lien entre les artères et les veines (les capillaires sanguins ne seront décrits pour la première fois qu'en 1661 par Marcello Malpighi : *De pulmonibus observationes anatomicae*), son hypothèse s'est pourtant avérée juste. Le cœur propulse le sang dans le système vasculaire par les artères jusqu'aux capillaires, où s'opèrent des échanges gazeux entre le sang et les tissus environnants (dioxygène (O_2) et dioxyde de carbone (CO_2)), et les veines ramènent ensuite le sang jusqu'au cœur.

La compartimentation du cœur en deux (droit et gauche) implique deux circulations différentes :

- la circulation pulmonaire (ou petite circulation) : le sang appauvri en O_2 et riche en CO_2 revient dans l'oreillette droite par les veines caves, passe par le ventricule droit et est expulsé vers les poumons *via* l'artère pulmonaire où il se recharge en O_2 et rejette le CO_2 avant de revenir au cœur au niveau de l'oreillette gauche par les veines pulmonaires.

- la circulation systémique (ou grande circulation) : le sang riche en O_2 accumulé dans l'oreillette gauche passe par le ventricule gauche d'où il est expulsé via l'aorte pour aller alimenter tous les organes. Au niveau des capillaires sanguins, l'O_2 est fourni aux organes qui rejettent du CO_2. Ce sang veineux est ensuite à nouveau acheminé à l'oreillette droite par les veines caves.

Le cœur, en se contractant, expulse simultanément le sang dans les deux circulations à chaque révolution cardiaque. Celle-ci correspond à la succession d'une systole (contraction) et d'une diastole (relaxation) du cœur. Tout d'abord le sang s'accumule passivement dans les oreillettes et les ventricules lors de la diastole. Ensuite les oreillettes se contractent en premier (systole auriculaire) pour finir de chasser le sang dans les ventricules avant de se relâcher (diastole auriculaire). Les ventricules se contractent à leur tour (systole ventriculaire) et expulsent le sang dans l'aorte et l'artère pulmonaire avant de se relâcher (diastole ventriculaire) terminant ainsi une révolution cardiaque.

Les valves auriculo-ventriculaires (mitrale à gauche et tricuspide à droite) empêchent le sang de refluer dans les oreillettes en se fermant durant la systole ventriculaire, tandis que la valve pulmonaire et la valve aortique (respectivement à l'entrée de l'artère pulmonaire et de l'aorte) empêchent le sang de refluer dans les ventricules en se fermant durant la diastole ventriculaire. Un autre système de valvules se retrouve au niveau des veines empêchant le sang de refluer dans les artères. En effet, la pression sanguine est beaucoup plus faible dans les veines que dans les artères de par leur nature plus élastique. Sans le système de valvule le sang pourrait alors refluer dans les artères, ce qui est d'autant plus vrai lorsqu'en plus de la diminution de la pression dans les veines, le sang doit également affronter la gravité au niveau des membres inférieurs lors d'une posture verticale. Ces deux systèmes de cloisonnement de la circulation sanguine assurent donc un sens unique du sang.

Il ne faut cependant pas oublier que le cœur est un muscle ayant besoin d'O_2 pour fonctionner. Il lui faut donc être alimenté par le système vasculaire au même titre que n'importe

quel autre organe. Cette irrigation du cœur est assurée par les artères coronaires qui sont issues de la base de l'aorte, juste au-dessus de la valve aortique. Elles se propagent à la surface du cœur et se ramifient avant de plonger irriguer le tissu cardiaque en profondeur, ce qui explique pourquoi on les retrouve au niveau du myocarde et de la couche profonde juxta-myocardique de l'endocarde. Le retour du sang désoxygéné est alors assuré par les veines coronariennes qui rejoignent le sinus coronarien qui s'ouvre directement dans l'oreillette droite (Figure 3).

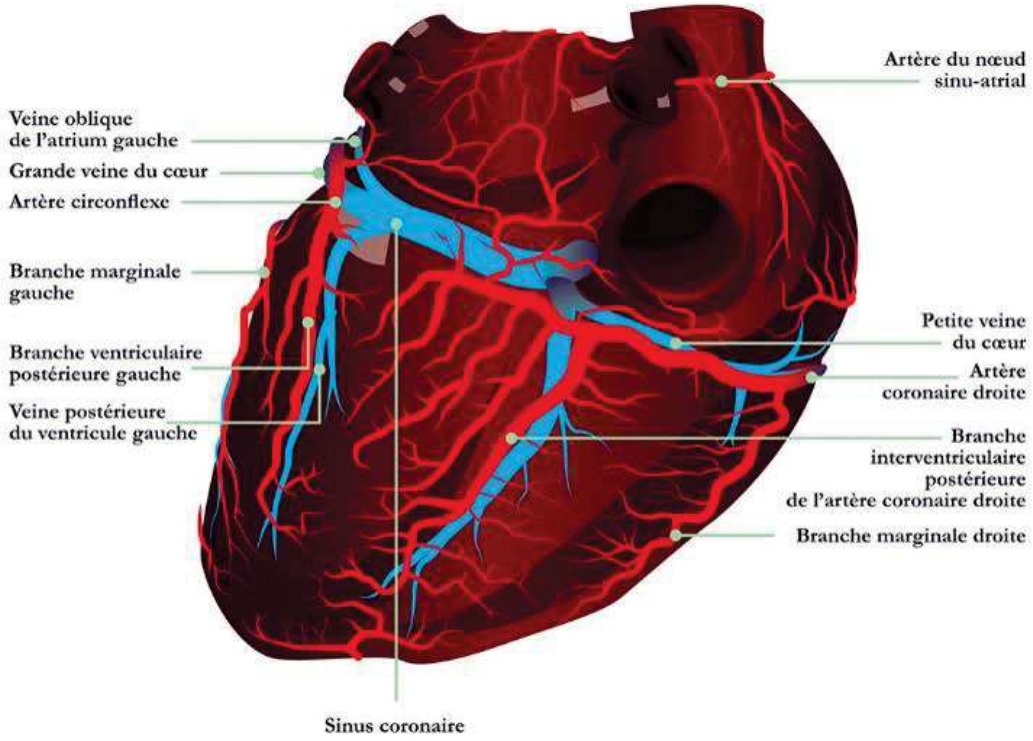


Figure 3 : Schéma du système coronarien

Les besoins constants de l'organisme en O_2 impliquent une activité de contraction cardiaque permanente. Le cœur doit se contracter de manière régulière et si possible harmonieuse (toujours les oreillettes avant les ventricules) pour un fonctionnement optimal. Ces contractions harmonieuses et répétées du myocarde sont commandées par la propagation d'un signal électrique au niveau du tissu conducteur.

I.1.3 Activité électrique cardiaque et conduction du signal électrique

La découverte d'une activité électrique du cœur remonte au XIXe siècle avec les travaux de Carlo Matteucci qui montre qu'une stimulation électrique des nerfs cardiaques augmente la contraction du cœur de grenouille (*Sur un phénomène physiologique produit par les muscles en contraction*, 1842). Voilà assurément une idée des plus intéressantes : une activité électrique serait à l'origine des battements cardiaques ! Augustus D. Waller, médecin britannique, fut le premier à enregistrer cette activité électrique cardiaque intrinsèque en publiant le premier électrocardiogramme (ECG) humain en 1887. Nous savons maintenant que cette activité électrique se manifeste sous forme de potentiels d'action (PA) cardiaques, propagés par le tissu conducteur et qui provoquent la contraction des cardiomyocytes.

Le plus surprenant dans cette histoire est que cette activité électrique cardiaque est spontanée et générée directement par le cœur lui-même, ce que l'on appelle l'automatisme cardiaque. Dès le IIe siècle, le médecin grec Claude Galien suppose l'existence d'une automaticité cardiaque, d'une manière assez barbare, certes, puisqu'il dissèque des animaux vivants en place publique (les romains en sont friands), mais efficace, car ses observations ont révolutionné l'anatomie à son époque. Il observa notamment que le cœur, une fois extrait de la cage thoracique, continuait à battre pendant un certain temps avant de s'arrêter. Les expériences de Sydney Ringer dans les années 1880 et d'Oskar Langendorff en 1895 ont par la suite montré qu'un cœur isolé était parfaitement capable de fonctionner en présence d'un milieu optimal contenant, entre autre, un apport nutritique (glucose), du calcium (Ca^{2+}) et de l'O_2, prouvant encore une fois l'existence d'un automatisme cardiaque. Il a fallu attendre 1907 et la découverte du nœud sinoatrial (NSA), ou sinusal, par Martin Flack et Arthur Keith pour finaliser la description du système de conduction cardiaque et le parcours du signal électrique (Keith and Flack, 1907).

La génération du signal électrique débute par la dépolarisation spontanée des cellules du NSA localisées au niveau de l'oreillette droite entre les veines caves supérieure et inférieure. Le signal est ensuite propagé aux oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire (NAV) qui, comme son nom l'indique, se situe entre les oreillettes et les ventricules. Empruntant ensuite les branches du faisceau de His et les fibres de Purkinje, le signal dépolarise les ventricules de l'apex vers le haut, provoquant une contraction optimale des ventricules de bas en haut pour expulser le sang dans les artères (Figure 4) (Silverman *et al*., 2006).

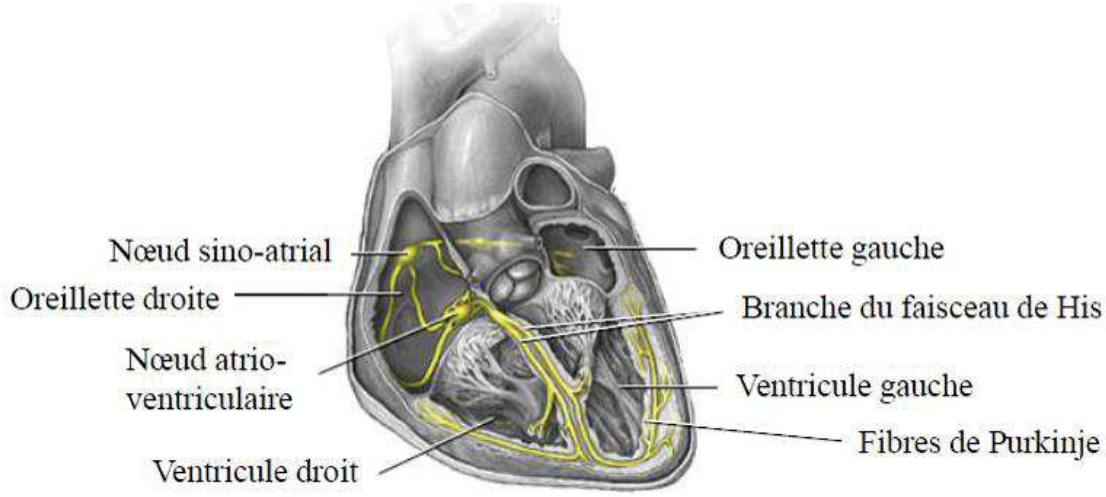


Figure 4 : Schéma du système de conduction cardiaque (en jaune)

La conduction du signal au sein du myocarde se fait grâce aux jonctions communicantes (« *gap junction* » en anglais) qui permettent de relier le cytoplasme de 2 cellules adjacentes. Elles forment un canal qui traverse les 2 membranes et qui constitue une voie de passage pour des molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 1 kDa. Un canal est composé de 2 connexons, chaque cellule fournissant le sien, et un connexon est lui-même composé de 6 protéines transmembranaires appelées des connexines (Cx). Selon les Cx utilisées, les jonctions communicantes ont des propriétés électrophysiologiques distinctes. Par exemple, les CMs du tissu conducteur expriment fortement la Cx40 de forte conduction permettant une vélocité du signal élevée (2-3 m/s contre 0,3-0,4 m/s dans le myocarde contractile) pour une contraction harmonieuse des oreillettes et des ventricules tandis que les CMs contractiles expriment majoritairement la Cx43 et les CMs du NSA et du NAV expriment également la Cx45 de faible conduction (Davis *et al*., 1994; Durrer *et al.*, 1970).

I.1.4 Potentiel d'action cardiaque et canaux ioniques

Les cardiomyocytes, comme toutes les cellules de l'organisme, sont polarisés au niveau de leur membrane. C'est-à-dire qu'il existe une différence de potentiel transmembranaire (ou potentiel membranaire Vm) due à une différence de charges électriques à proximité du feuillet interne de la membrane et à proximité du feuillet externe. L'extérieur de la membrane est plus positif que l'intérieur qui, lui, est considéré comme négatif, créant un Vm négatif, dépendant

du type cellulaire considéré, mais généralement aux alentours de -70/-80 mV (-80 mV pour les CMs ventriculaires) et que l'on appelle potentiel de repos (en anglais « resting membrane potential » RMP). Un potentiel d'action (PA) est une inversion brusque et temporaire du Vm qui est due à l'activité de protéines transmembranaires : les canaux ioniques.

Les canaux ioniques forment des pores dans la membrane qui permettent le passage d'ions, ce qui crée un courant électrique noté *I.* Le courant est dit entrant et dépolarisant s'il rend Vm plus positif (entrée de charges positives ou sortie de charges négatives) et sortant et repolarisant s'il rend Vm plus négatif (sortie de charges positives ou entrée de charges négatives). Le sens de déplacement des ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est régi par deux forces que sont le gradient de concentration (du compartiment le plus concentré au moins concentré) et le gradient électrique (attirance par une charge opposée à celle de l'ion). L'équation de Nernst permet alors de déterminer le potentiel d'équilibre d'un ion considéré (E_{ion}), c'est-à-dire le potentiel auquel le courant I_{ion} est nul car l'ion se déplace indifféremment dans les deux sens. Elle est donnée par :

$$E_{ion} = \frac{RT}{ZF}\ ln\frac{[ion]ext}{[ion]int}$$

R = constante des gaz parfaits

T = température en °K

Z = valence de l'ion considéré

F = Constante de Faraday

$[ion]_{ext}$ et $[ion]_{int}$ = concentration de l'ion considéré extra- et intracellulaire

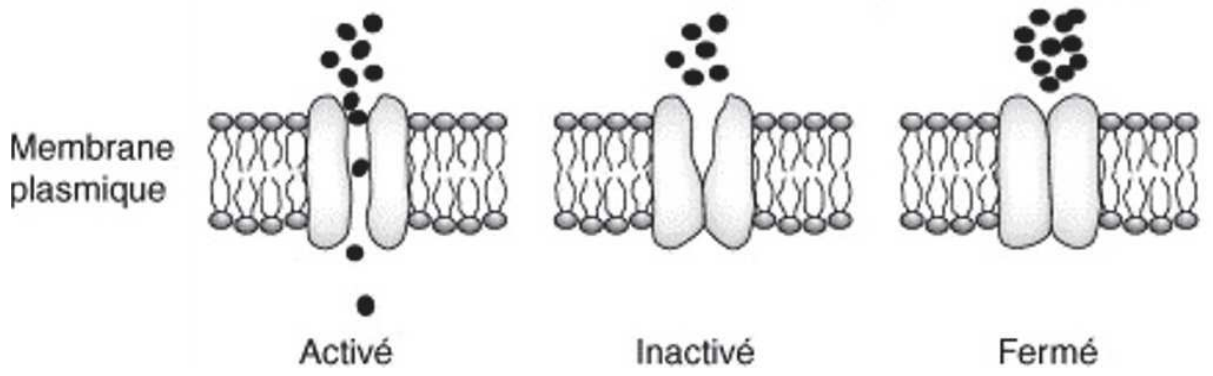


Figure 5 : Schéma des différents états (ouvert, inactivé, fermé) des canaux ioniques

Les canaux ioniques, en changeant de conformation, sont soit ouverts (les ions traversent le canal), soit fermés (les ions sont bloqués). Certains canaux possèdent également un troisième état qui est dit inactivé, obtenu après ouverture du canal, et qui empêche également les ions de traverser (Figure 5). Un canal inactivé ne peut être ouvert à nouveau, il faut impérativement qu'il revienne à un état fermé avant de pouvoir se rouvrir. Cette limitation de l'état inactivé est à l'origine de la période réfractaire d'une cellule, qui correspond au temps pendant lequel la cellule ne peut plus se dépolariser car les canaux ne peuvent pas se rouvrir. L'état de conformation des canaux ioniques peut dépendre de plusieurs facteurs : voltage (canaux voltage-dépendants), fixation d'un ligand (ligands-dépendants), étirement de la membrane (mécano-sensibles) ou même messagers secondaires (Adénosine tri-phosphate (ATP)-dépendants, Ca^{2+}-dépendants).

Ainsi, le PA généré par dépolarisation spontanée des cellules du NSA est propagé jusqu'aux CMs contractiles par le tissu conducteur. Ce PA sinusal qui nous intéresse particulièrement est composé de 3 phases distinctes (Figure 6) :

- (1) une phase de dépolarisation qui est due à une entrée de Ca^{2+} par un canal calcique de type L voltage-dépendant ($Ca_v1.2$)

- (2) une phase de repolarisation impliquant des canaux potassiques voltage-dépendants. Au cours de cette phase les canaux calciques s'inactivent tandis que des courants potassiques K^+ sortants repolarisent la cellule. Il s'agit des courants I_{Kr} (ERG), I_{Ks} (KCNQ1), I_{to} (K_v1 et K_v4). Le courant potassique activé par l'acétylcholine I_{KACh} participe également à la repolarisation.

- (3) une phase de dépolarisation spontanée à la fin de la repolarisation appelée dépolarisation diastolique (DD) composée d'une première partie linéaire et d'une dernière partie exponentielle permettant au Vm d'atteindre le seuil de déclenchement du PA. Contrairement aux CMs ventriculaires et atriaux qui retournent au RMP après la repolarisation, il n'y a point de repos possible pour les cellules sinusales. Après avoir atteint un potentiel de repolarisation maximal appelé potentiel diastolique maximal (MDP, ~ -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). Cette DD est due à l'influence d'un grand nombre de courants dépolarisants (I_f, $I_{Ca,L}$, $I_{Ca,T}$, I_{NCX}, etc …) que je détaillerai dans une deuxième partie, et à l'inactivation des courants potassiques (Mangoni and Nargeot, 2008).

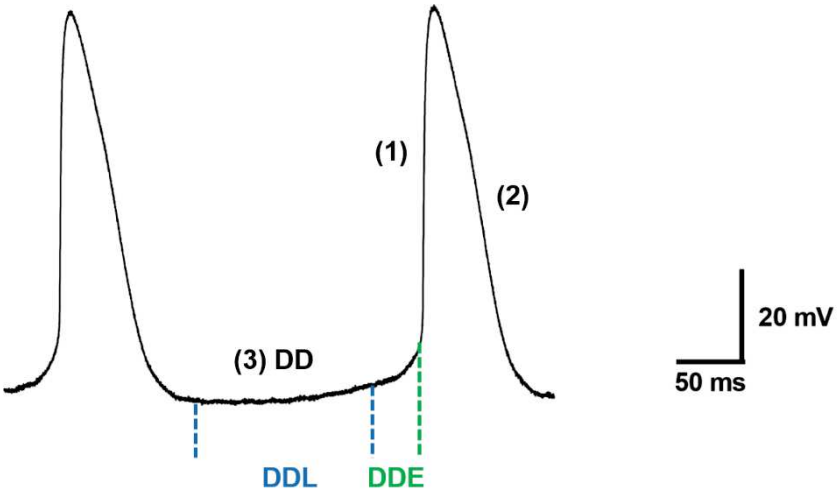


Figure 6 : Exemple de PAs sinusaux. (1) phase de dépolarisation, (2) phase de repolarisation, (3) dépolarisation diastolique (DD). *DDL : DD linéaire, DDE : DD exponentielle*

I.1.5 Couplage excitation-contraction

A la différence des cellules sinusales, les CMs contractiles sont au repos tant qu'ils ne reçoivent pas de signal électrique déclenchant l'apparition d'un PA et leur contraction. Le processus de conversion de l'activité électrique en activité mécanique au sein des CMs contractiles est appelé le couplage excitation-contraction et est rendu possible par l'excitabilité des CMs. C'est-à-dire qu'ils peuvent modifier leur activité par variation de leur potentiel membranaire suite à une stimulation (ici contraction de la cellule suite à une dépolarisation).

Le couplage excitation-contraction se déroule principalement au niveau des tubules transverses (tubules-T) qui sont des invaginations de la membrane plasmique riches en protéines impliquées dans ce couplage. Il peut se décomposer en deux phases. La première consiste à convertir le signal électrique en dynamique calcique. La dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes contractiles entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants de type L au niveau des tubules-T et donc une entrée d'ions calcium (Ca^{2+}). Cette entrée calcique dans la cellule est responsable d'une sortie massive de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) au cytosol par le phénomène de « calcium-induced calcium release » (CICR). C'est-à-dire que le Ca^{2+} déclenche l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR), canaux calciques présents à la surface du RS qui est très proche de la membrane plasmique au niveau de tubules-T. Le RS étant un véritable réservoir de Ca^{2+}, son ouverture entraîne une extrusion du Ca^{2+} suivant son gradient de concentration ce qui va augmenter la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$) (Fabiato, 1985; Tinker and Williams, 1992).

La seconde phase du couplage est la contraction de la cellule qui est dépendante d'une élévation de calcium intracellulaire. Les fibres d'actine et de myosine sont disposées parallèlement dans la cellule musculaire cardiaque et c'est le coulissement de la fibre de myosine sur la fibre d'actine qui provoque le raccourcissement du sarcomère (unité fonctionnelle contractile) et par conséquent la contraction de la cellule. En absence de calcium, la liaison actine-myosine est empêchée par la troponine, une protéine régulatrice liée à l'actine. L'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ permet la levée de l'inhibition et la contraction de la cellule.

La relaxation des cardiomyocytes est réalisée par extrusion du calcium cytosolique, initiée dès la repolarisation de la cellule, ce qui permet de rétablir l'inhibition du complexe actine-myosine par la troponine. Le Ca^{2+} est principalement repompé dans le RS par la pompe calcique ATPase du RS (en anglais « Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase » ou SERCA) pour remplir à nouveau les stocks calciques en attente de la prochaine contraction. Cependant, le Ca^{2+} peut également être extrudé dans le milieu extracellulaire par l'échangeur sodium (Na^+)/calcium (NCX) et la pompe calcium-ATPase plasmatique (PMCA), ou bien être capté par la mitochondrie par l'uniport calcique mitochondrial (en anglais « mitochondrial calcium uniporter » MCU) (Figure 7) (Bers, 2002).

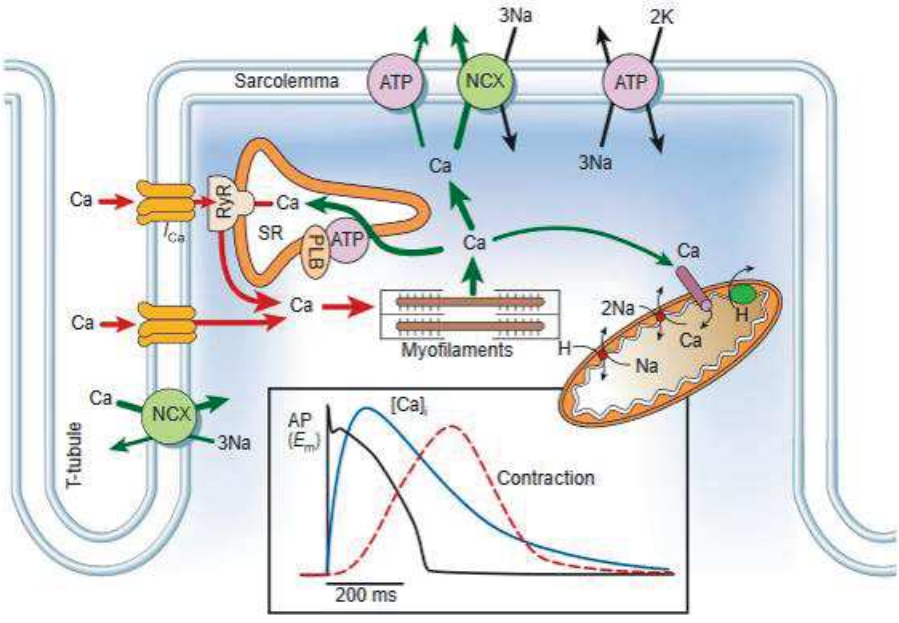


Figure 7 : Schéma du couplage excitation-contraction cardiaque d'après *Bers et al. 2002*

L'activité électrique cardiaque en tant que déclencheur de la contraction est donc un indicateur de la fonctionnalité du cœur, mais encore faut-il être capable de pouvoir l'enregistrer et l'analyser.

I.1.6 Electrocardiogramme (ECG)

Si Augustus D. Waller a été le premier à enregistrer un ECG sur l'être humain, celui qui est considéré comme le père de l'ECG n'est autre que le médecin néerlandais Willem Einthoven, et ce, pour deux raisons. La première, pour avoir mis au point un galvanomètre à corde pour enregistrer des ECG qui est à la fois plus précis et plus pratique que l'électromètre capillaire utilisé par Waller (Ces deux appareils de mesure de l'ECG sont détaillés dans la revue de S. Barold (Barold, 2003)). La seconde raison est qu'il est le premier à avoir décrit un ECG caractéristique normal tel que nous le connaissons aujourd'hui dans son ouvrage « *le télécardiogramme* » de 1906, ce qui lui vaudra tout de même l'obtention du prix Nobel de physiologie ou médecine en 1924.

Un ECG s'obtient en enregistrant l'activité électrique cardiaque sous forme de différence de potentiel (ddp) selon un axe donné grâce à des électrodes de surface posées sur la peau. Pour avoir un diagnostic optimal du cœur, 12 mesures différentes (appelées dérivations) sont enregistrées en positionnant les électrodes sur des zones bien précises du thorax du patient. Les dérivations les plus connues sont les 3 dérivations bipolaires DI, DII et DIII qui forment le triangle d'Einthoven qui est un triangle équilatéral ayant pour centre le cœur (Figure 8). 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 autre dérivations appelées dérivations précordiales V1, V2, V3, V4, V5, V6 permettent, elles, d'étudier l'activité électrique dans le plan transversal. Ainsi, ces 12 dérivations donnent des informations différentes pour une vue d'ensemble de l'activité électrique du cœur dans le temps et l'espace.

Un ECG normal se présente sous la forme d'une succession de complexes d'ondes (déflexions du tracé positives ou négatives), chaque complexe correspondant à un cycle cardiaque. On distingue donc au sein d'un même complexe :

- l'onde P qui correspond à la dépolarisation des oreillettes

- le complexe QRS qui correspond à la dépolarisation des ventricules.

- l'onde T qui correspond à la repolarisation des ventricules

La repolarisation des oreillettes est, elle, cachée par le complexe QRS. De plus, certains tracés ECG montrent également une déflexion qui suit l'onde T et qui est appelée onde U. Elle correspond à la repolarisation des fibres de Purkinje mais n'apparaît pas forcément pour tout le monde.

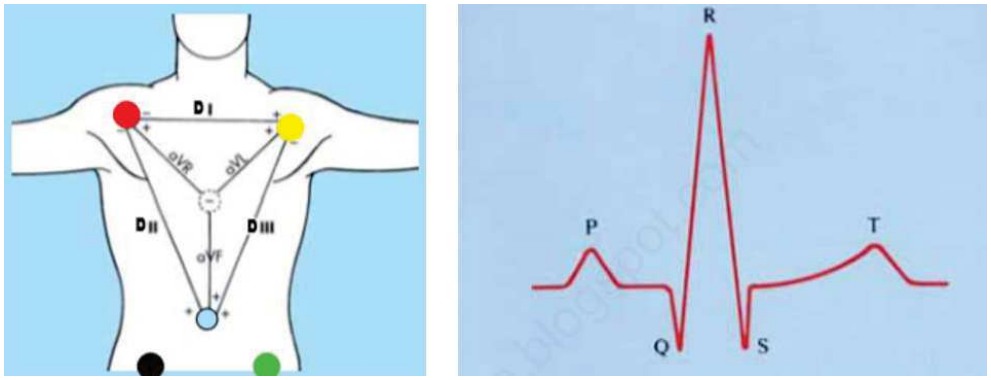


Figure 8 : Schéma des dérivations bipolaires (triangle d'Einthoven) et unipolaires (gauche). Exemple d'un tracé d'ECG avec les différentes ondes (droite).

Ces ondes sont de véritables mines d'informations sur l'activité électrique cardiaque. Les dérivations peuvent être considérées comme une vue de la propagation de l'activité électrique cardiaque dans une certaine direction. Une onde positive s'observe lorsque le signal électrique se propage vers l'électrode tandis qu'une onde négative s'obtient lorsque le signal s'éloigne de l'électrode. Le sens des ondes est donc différent en fonction des dérivations considérées renseignant sur la propagation spatiale du signal électrique. Ceci étant dit, un changement de forme de l'onde par rapport à un ECG normal caractéristique indique alors un changement de parcours du signal ce qui peut se produire lors des phénomènes d'ischémie. Si une zone du myocarde n'est plus irriguée par obstruction d'une artère coronaire (athérome), celle-ci se nécrose, entraîne une fibrose et par conséquent crée un bloc sur le chemin du signal électrique qui se traduit par un changement de forme de l'onde sur l'ECG. En plus des informations spatiales, les informations temporelles comme la durée d'une onde ou l'intervalle entre deux ondes sont également très importantes. L'intervalle PR renseigne par exemple sur le temps de conduction du signal entre les oreillettes et les ventricules tandis que l'intervalle QT reflète la durée du PA ventriculaire.

Ainsi, tous ces paramètres fournis par un ECG sont autant d'informations essentielles sur la fonctionnalité du myocarde. Les cardiologues sont alors entraînés à interpréter un ECG de manière à pouvoir distinguer un cœur sain d'un cœur malade. Les arythmies, par exemple, sont des troubles du rythme cardiaque dont les conséquences sont facilement observables sur un ECG.

I.2 Centres rythmogènes de l'automatisme cardiaque

L'activité électrique spontanée du cœur est donc générée au niveau des centres rythmogènes (ou pacemaker) du cœur que sont le nœud sinoatrial (NSA), le nœud auriculo-ventriculaire (NAV) et les fibres de Purkinje. Le NSA est appelé pacemaker primaire car sa fréquence de dépolarisation spontanée plus élevée que celle du NAV ou des fibres de Purkinje impose le rythme de contraction du cœur en supprimant l'activité pacemaker des deux autres centres. Le NAV et les fibres de Purkinje sont, eux, appelés des pacemaker secondaires car ils peuvent prendre le relai en cas de défaillance du NSA, selon leur fréquence de dépolarisation décroissante (NAV > fibres de Purkinje) (James, 2003). Ces centres rythmogènes possèdent donc des structures et cellules spécialisées dans la génération d'un signal électrique et sa propagation.

I.2.1 Nœud sino-atrial ou sinusal

La majeure partie du tissu pacemaker du NSA est localisée dans l'oreillette droite entre la veine cave supérieure et la veine cave inférieure chez tous les mammifères (Figure 4, 10). Cependant quelques différences entres espèces s'observent au niveau de l'extension du NSA. Alors que le NSA s'arrête au niveau de la *crista terminalis* (crête épaisse de tissu atrial délimitant la jonction entre l'oreillette droite et l'auricule) chez le chien, le NSA s'étend jusqu'à la face épicardique de la *crista terminalis* chez le chat tandis qu'on le retrouve sur la face endocardique chez le lapin et l'Homme. De même, si au niveau de la région intercavale le NSA occupe toute l'épaisseur du tissu de l'endocarde à l'épicarde chez le lapin, le cobaye et le singe, ce n'est pas le cas chez l'Homme, le chien et le porc où on observe une fine couche de cellule atriale entre le NSA et l'endocarde (Boyett *et al*., 2000).

Au niveau cellulaire on retrouve une population hétérogène de cellules cardionectrices (ou pacemaker) au sein du NSA. Une fois isolés, ces CMs spécialisés se présentent sous 3 formes différentes (Figure 9) (Verheijck *et al*., 1998) :

- cellule en fuseau (spindle) : cellule de forme effilée.
- cellule allongée (elongated) : cellule ressemblant à la cellule en fuseau, faiblement striée et allongée.
- cellule en « araignée » (spider) : cellule effilée possédant plusieurs prolongements cytoplasmiques à chaque extrémité.

Récemment, une équipe à Baltimore aux Etats-Unis a décrit une 4ème forme de cellule sinusale, observée en regardant l'activité calcique intracellulaire au sein d'un tissu NSA intact de souris. Selon eux, certaines cellules sinusales seraient en forme de « pyramide » avec des projections ressemblant à celles des cellules « spider » en direction des cellules voisines (Figure 9) (Bychkov *et al*., 2020). Cependant, il serait plus vraisemblable que cette forme *in situ* soit imposée par les points d'ancrage des cellules « spider » ou « spindle » aux cellules adjacentes.

En plus de ces 4 morphologies différentes, des cellules en « transition » entre un phénotype sinusal et atrial ont également été observées, notamment en périphérie du NSA (James *et al.*, 1966). Ces cellules sont généralement de forme sinusale, bien que se rapprochant de la taille d'une cellule atriale, et possèdent un appareil contractile plus achevé, observable par son organisation en stries, absentes chez les cellules sinusales.

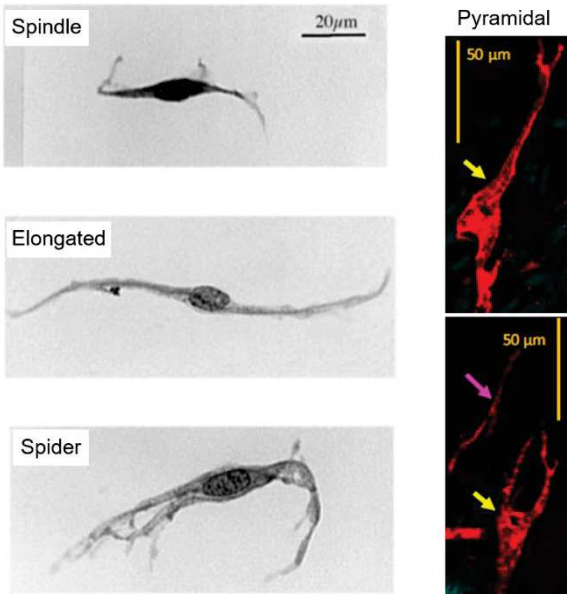


Figure 9 : Photos de cellules sinusales de forme « spindle », « elongated » et « spider » (gauche) d'après *Verheijck et al., 1998*. Image de cellules pyramidales (flèches jaunes) immunomarquées pour HCN4 (rouge) d'après *Bychkov et al., 2020*.

Ces cellules pacemaker présentent également des propriétés électrophysiologiques qui leur sont propres. Alors que la dépolarisation des CMs atriaux et ventriculaires est majoritairement due à une entrée de sodium Na^+ (canaux $Na_v1.5$), celle des cellules sinusales est majoritairement calcique ($Ca_v1.2$). La force électromotrice (« driving force » en anglais) étant plus importante pour le Na^+ que pour le Ca^{2+} considérant leurs concentrations physiologiques respectives, la phase de montée du PA sinusale est plus lente que celle des PAs atriaux et ventriculaires. De plus, les cellules pacemaker se dépolarisent spontanément entre deux systoles grâce à la DD. Cette DD est ainsi la clé de l'automaticité cardiaque et la découverte de ses mécanismes sous-jacent est un enjeu majeur dans la compréhension de la génération spontanée d'un signal électrique dans le cœur.

Cependant l'organisation fonctionnelle du NSA reste encore largement incomprise et demeure un challenge de taille à résoudre. Quelle est la cellule sinusale entre la cellule « spindle », « elongated », « spider », ou « pyramidale », à supposer qu'il n'y en ait qu'une seule ? En effet, en théorie, une seule cellule pacemaker suffirait à générer un signal permettant la contraction entière du cœur par le jeu des jonctions communicantes. Ce qui est certain c'est que ces trois types de cellules sont capables d'automaticité une fois isolées (*N.B.* : à ce jour la cellule « pyramidale » n'a pas été observée isolée). Il a par ailleurs été montré en 1986 que l'activité du NSA du chat n'était pas perturbée quand celui-ci était réduit à moins de 500 cellules (estimation basée sur le volume de tissu étudié) sur les 2000 qu'il contient (Opthof *et al*., 1986). Alors pourquoi un tissu aussi important avec une population de cellules pacemaker aussi diversifiée si un faible nombre de cellules suffit pour un fonctionnement normal ?

Il est important ici d'insister sur le fait que le NSA est un tissu **hétérogène** (Boyett *et al.,* 2000). Que ce soit au niveau du type cellulaire, des protéines exprimées ou des propriétés électrophysiologiques, il n'y pas de modèle unique. Au sein du NSA on observe ainsi des morphologies de PAs différentes en fonction de la localisation de l'enregistrement (Figure 10) (Verheijck *et al*., 2001). De plus, l'orientation des cellules sinusales montre qu'il existe un NSA central avec des cellules organisées en maillage et un NSA périphérique (la « zone paranodale ») avec des cellules organisées en parallèles (Figure 10). Non seulement la disposition des cellules mais également l'expression de protéines telles que les connexines sont différentes entre ces deux zones (Chandler *et al.*, 2011; Dobrzynski *et al.*, 2005; Stephenson *et al*., 2017). En 1997, *Kodama et al., (1997)* ont par ailleurs montré que le NSA central et périphérique n'avait pas la même sensibilité à la Nifédipine (bloqueur des canaux Ca^{2+} de type L) et à la tétrodotoxine (TTX, bloqueur des canaux Na^+). En effet, la Nifédipine supprime les

PAs spontanés dans le NSA central mais pas dans le NSA périphérique, tandis que la TTX n'a pas d'effet sur le NSA central alors qu'elle ralentit la fréquence de dépolarisation du NSA périphérique. Cela montre donc que le courant Ca^{2+} de type L est obligatoire dans le NSA central et que le courant Na^{+} joue un rôle important dans le NSA périphérique. En d'autres termes, on introduit ici la notion de **mécanismes pacemaker différents** dont je reparlerai dans la partie « discussion ».

Cette idée de mécanismes pacemaker différents au sein du NSA est appuyée par les changements de localisation du site initiateur de l'impulsion électrique (« **leading site** » en anglais). En fonction des conditions de stimulation du NSA, le leading site n'est pas statique mais est capable de se déplacer dans différentes zones du NSA (figure 11) (Boyett *et al.*, 1998, 1999, 2000; Kodama *et al.*, 1997; Opthof, 1988). Ces changements pourraient être le reflet de l'adaptabilité du NSA à des stimuli extérieurs qui déplaceraient le leading site vers des zones avec des mécanismes pacemaker plus ou moins sensibles à tel ou tel stimulus. Ce phénomène de déplacement du leading site est d'ailleurs observé en clinique par un changement de l'onde P sinusal sur un ECG et est traduit de l'anglais par pacemaker « baladeur », bien que je lui préfère le terme de pacemaker « errant » (Monfredi *et al.*, 2010).

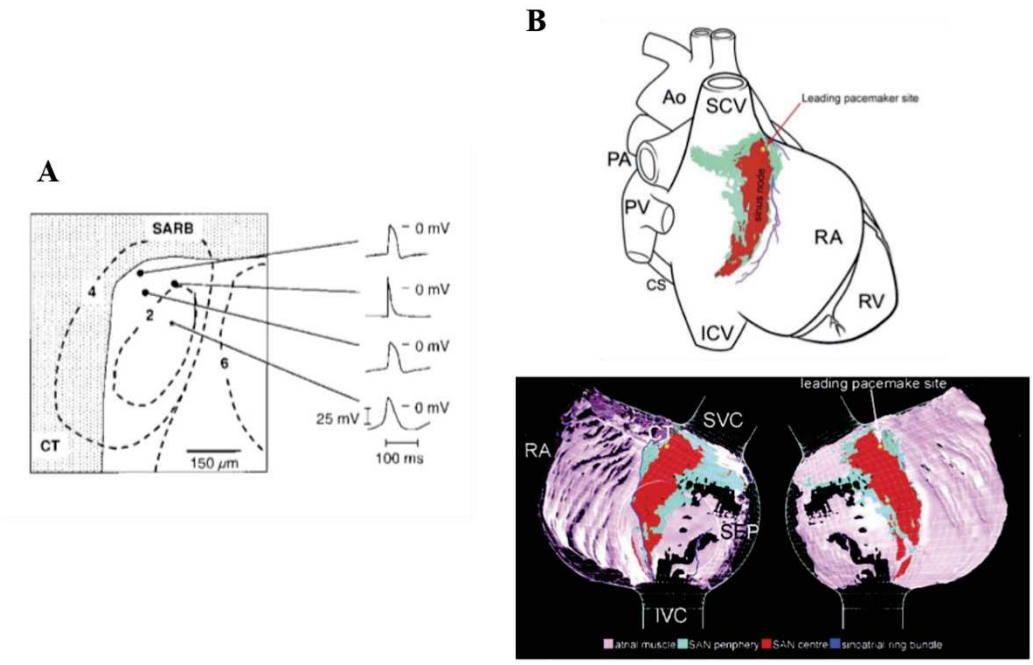


Figure 10 : Exemple de tracés enregistrés par microélectrode dans différentes zones du NSA d'après *Verheijck et al., 2001*. SARB : branche droite de l'anneau sinoatrial, CT : *crista terminalis*. (A) Reconstruction 3D du nœud sinusal avec le NSA central en rouge et la zone paranodale en verte, d'après *Dobrzynnski et al., 2005* (B). Ra : oreillette droite, SVC : veine cave supérieure, IVC : veine cave inférieure, SEP : septum interatrial.

Deux modèles ont alors été proposés pour tenter d'expliquer l'organisation fonctionnelle du NSA. Le modèle de « gradient » postule qu'il y a une transition progressive dans la taille et les propriétés électrophysiologiques des cellules pacemaker entre le centre du NSA et sa périphérie. Les cellules pacemaker en tant que telles seraient concentrées au centre tandis que des cellules en transition entre cellule sinusale « pure » et atriale occuperaient la périphérie (Boyett *et al*., 2000). Le modèle « mosaïque », quant à lui, postule qu'il n'y a pas de distribution préférentielle des cellules pacemaker au sein du NSA et que des cellules pacemaker possédant des degrés différents d'automaticité et configuration de PA seraient éparpillées dans tout le tissu (Verheijck *et al*., 1998). Cependant la fonctionnalité du NSA ne peut être réduite à seulement l'un ou l'autre de ces modèles. En effet, bien que des critères électrophysiologiques et histochimiques définissent bel et bien un NSA central et périphérique (Dobrzynski *et al*., 2005), l'existence d'un site initiateur de l'impulsion électrique qui n'est pas statique mais peut se déplacer au sein du NSA en fonction de stimuli extérieurs (régulation neuronale, température, etc …) supporte le modèle de « mosaïque » (Schuessler *et al*., 1996).

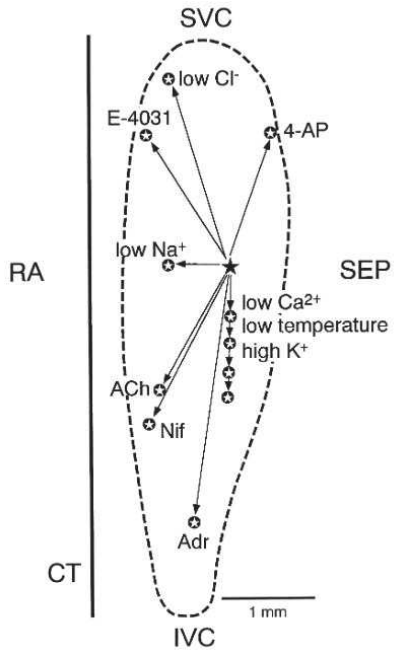


Figure 11 : Déplacements du site d'initiation au sein du NSA en réponse à différents stimuli extérieurs (bloqueurs pharmacologiques de canaux et changements de conditions physiologiques), d'après *Boyett et al., 2000*. RA : oreillette droite, CT : *crista terminalis*, SVC : veine cave supérieure, IVC : veine cave inférieure, SEP : septum interatrial.

Une organisation structurelle et fonctionnelle aussi complexe pourrait pourtant avoir un simple rôle protecteur du NSA. Le tissu atrial environnant est en effet très inhibiteur de l'automaticité du NSA par hyperpolarisation électrotonique. C'est-à-dire que le potentiel hyperpolarisé des cellules atriales (RP environ -70 mV) a tendance à hyperpolariser les cellules sinusales adjacentes, ce qui agit contre la DD. En effet, une accélération de la fréquence de dépolarisation du NSA est observée après séparation de l'oreillette droite tandis que coupler une cellule atriale à une cellule sinusale supprime son automaticité (Joyner *et al*., 1998; Kirchhof *et al.*, 1987). L'organisation structurelle du NSA permettrait donc de le protéger de cette inhibition électrotonique, notamment avec une expression spatiale différentielle de connexines. Les cellules pacemaker du NSA central expriment la Cx45 et la Cx30,2 qui ont une faible conductance tandis qu'on trouve une expression de la Cx43 à plus forte conductance au niveau du NSA périphérique. Le NSA périphérique formerait ainsi une zone transitionnelle entre la zone centrale à faible conductance et le tissu atrial à forte conductance exprimant fortement la Cx43. Le faible couplage électrique du NSA central protègerait donc le tissu de l'inhibition électrotonique du tissu atrial tandis que la zone périphérique, où une conduction rapide est rétablie serait une voie d'échappement du signal électrique vers les oreillettes et le nœud auriculo-ventriculaire (Boyett *et al.*, 2006).

I.2.2 Nœud auriculo-ventriculaire

A l'instar du NSA, le NAV est une structure hétérogène située dans l'oreillette droite, au niveau du triangle de Koch, qui est une région anatomique comprise entre l'orifice du sinus coronarien, le tendon de Todaro et la valve tricuspide. Il comprend le nœud compact (compact node), le faisceau nodal inférieur (lower nodal bundle) et une extension postérieure nodale (posterior nodal extension) qui n'est pas présente chez toutes les espèces (Figure 12) (Anderson *et al*., 2009; Boyett *et al*., 2006; Kurian *et al*., 2010).

Au niveau cellulaire, il est retrouvé une population hétérogène de cellules du NAV dont les morphologies (« spindle », « spider ») ne sont pas sans rappeler celles des cellules du NSA (Ren *et al.*, 2006). De même, des morphologies différentes des PAs enregistrés au sein du NAV sont observées pouvant être classées en 3 phénotypes : nodal (pacemaker pur), atrio-nodal et nodal-His. Des zones de transition entre un phénotype pacemaker pur et atrial ou pacemaker et His (tissu conducteur) sont donc également retrouvées dans le NAV (Efimov *et al*., 2004).

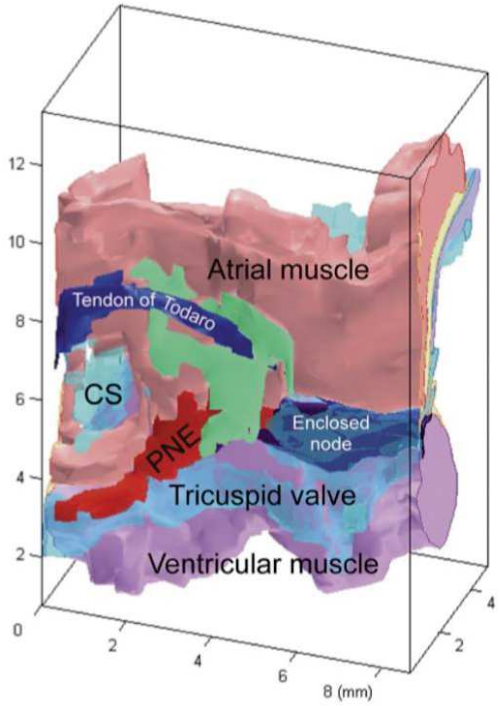


Figure 12 : Modèle informatique 3D du NAV de lapin d'après *Boyett et al., 2005*.
CS : sinus coronarien, PNE : extension postérieure nodale.

Si l'organisation fonctionnelle du NSA est complexe, celle du NAV l'est encore plus. En 2000, Douglas Zipes illustrait cette complexité en empruntant une citation de Winston Churchill pour qualifier le NAV de « *riddle wrapped in a mystery inside an enigma* », ce qui pourrait se traduire par une énigme entourée de mystère et de secrets. Le rôle premier du NAV est de filtrer le signal électrique lors de sa transition entre les oreillettes et les ventricules. Celui-ci est en effet fortement ralenti lors de son passage, notamment dû à l'expression de la Cx45 à faible conductance, ce qui est responsable du délai entre l'activation des oreillettes et celle du faisceau de His et compte pour pratiquement la moitié de l'intervalle PR sur un ECG normal (Boyett *et al*., 2006). La conduction du signal à l'intérieur du NAV est un phénomène complexe qui n'est pas encore entièrement compris. Elle fait intervenir au moins deux voies différentes (rapide et lente) qui sont très bien détaillées dans une revue récente de J. Billette et R. Tadros (Billette and Tadros, 2019). Cette capacité de filtre du NAV permet également de protéger le cœur contre les phénomènes de tachycardie (accélération de la fréquence cardiaque) ventriculaire. En cas de tachycardie atriale, la faible conduction du signal ainsi qu'une longue période réfractaire du NAV bloque le signal à haute fréquence afin de transmettre un signal avec une fréquence compatible avec une contraction optimale des ventricules.

En tant que pacemaker secondaire, le NAV est également capable d'automaticité. En absence de rythme sinusal, des foyers d'automaticité sont observés au niveau de l'extension postérieure et du nœud compact avec, cependant, une fréquence de dépolarisation plus faible que celle du NSA.

I.2.3 Fibres de Purkinje

Le signal électrique en sortie du NAV est ensuite conduit par les deux branches du faisceau de His à travers le septum ventriculaire jusqu'aux fibres de Purkinje (PF) qui se ramifient et forment un véritable maillage électrique au niveau de la couche sous-endocardique des ventricules (Haissaguerre *et al*., 2016). Il existe par ailleurs une grande variabilité d'architecture de cette ramification entre les espèces mais également chez l'Homme (Figure 13) (Demoulin and Kulbertus, 1972; Ono *et al.*, 2009). L'organisation structurelle de ce réseau permet une contraction harmonieuse des ventricules en remontant le signal électrique de l'apex du cœur vers les oreillettes, conduisant à une éjection optimale du sang dans les artères.

Contrairement aux cellules du NSA et du NAV, les cellules de Purkinje (PC) isolées possèdent une morphologie et une taille spécifiques. Ce sont des cellules cylindriques ressemblant aux CMs ventriculaires mais d'une plus petite taille (Figure 13) (Callewaert *et al*., 1984; Miquerol *et al*., 2004). Le PA de ces cellules présente également une morphologie particulière avec un long plateau et une MDP plus hyperpolarisée (- 75 à - 90 mV selon les espèces) que celle des cellules du NSA ou du NAV (environ - 60 mV) (Figure 13).

La fonction première des PF est d'assurer une propagation rapide du signal électrique, la vitesse de conduction des CMs ventriculaires étant insuffisante pour une contraction synchronisée des ventricules. Cette conduction rapide au sein des PFs est due à une forte expression de la Cx40 ainsi qu'à une très faible résistance intercellulaire (~100 Ω/cm) (Callewaert *et al*., 1984; Mobley and Page, 1972). Les jonctions communicantes étant concentrées aux extrémités des PC, c'est dans le sens longitudinal que la conduction est la plus rapide (~ 2 fois plus rapide que dans le sens transversal) (Desplantez *et al*., 2007). La conduction transversale du signal au myocarde ventriculaire est assurée par des cellules de transition entre les PF et les CMs ventriculaires qui sont appelées des jonctions Purkinje-muscle (PMJ). Bien qu'ayant été identifiés visuellement et électrophysiologiquement (Tranum-Jensen *et al*., 1991), ces PMJ qui possèdent des propriétés communes aux PFs et aux CMS ventriculaires n'ont encore jamais été isolées à ce jour. A l'instar des zones de transition au sein du NSA et du NAV, les PMJ sont des voies d'échappement du signal.

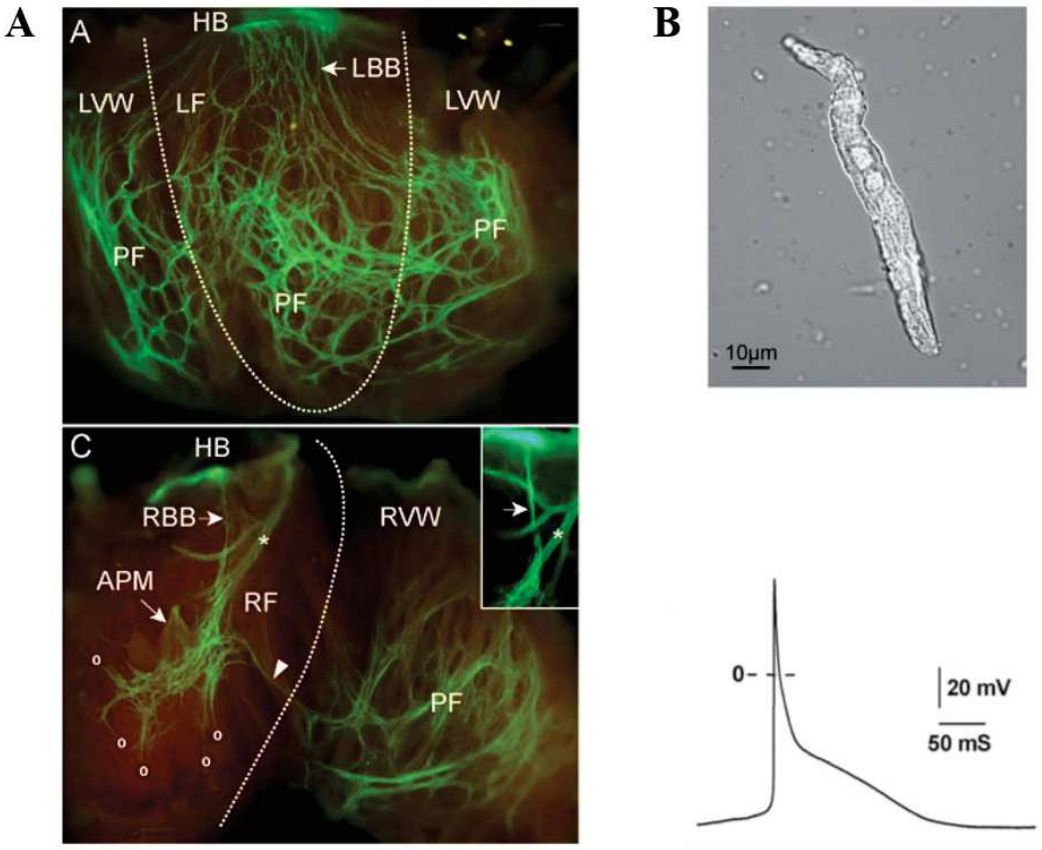


Figure 13 : Architecture des fibres de Purkinje révélée par marquage de la Cx40 par la GFP (Knock-in). HB : faisceau de His, PF : fibres de Purkinje, LVW : paroi du ventricule gauche, RVW : paroi du ventricule droit, LBB : branche gauche du faisceau de His, RBB : branche droite du faisceau de His, APM : muscles papillaires (A). Photo et activité automatique d'une cellule de Purkinje (B). D'après *Miquerol et al., 2004.*

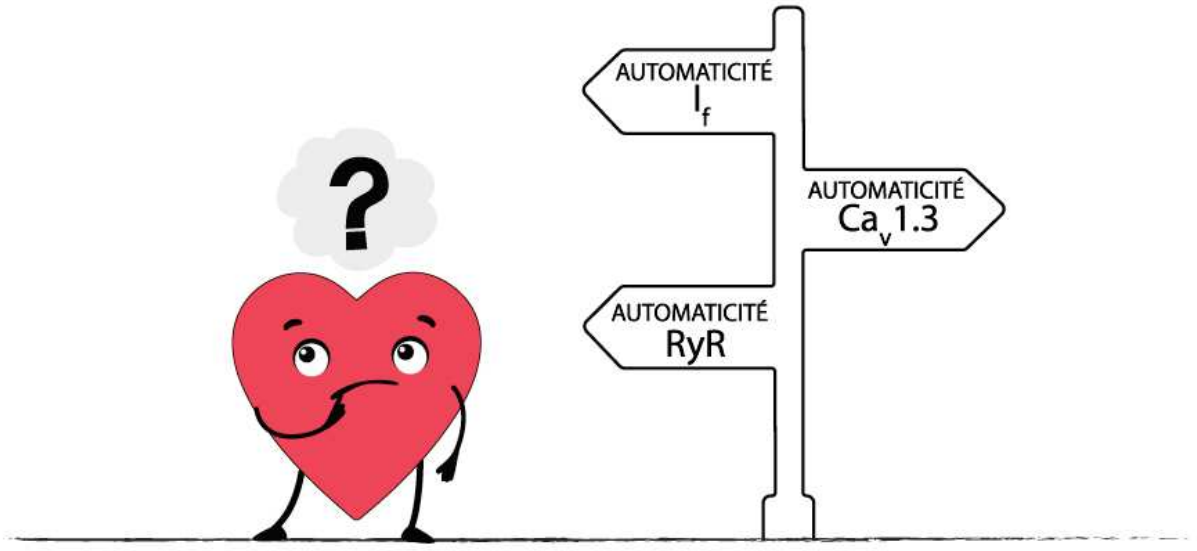
Les PF sont également capable d'automaticité en cas de bloc de conduction atrio-ventriculaire afin de permettre aux ventricules de continuer à se contracter. Cependant, la fréquence de dépolarisation des PF, bien que suffisante pour assurer un fonctionnement cardiaque viable, reste dans les valeurs basses de la fréquence cardiaque (~ 40 battements/min chez l'Homme). Cela peut s'expliquer par la MDP hyperpolarisée des PF, obligeant les mécanismes responsables de la DD à générer une dépolarisation dans un intervalle de potentiel plus négatif que ceux du NSA ou du NAV.

<u>Chapitre 2</u> : Mécanismes responsables de l'automaticité cardiaque

« Que de routes prend et que de raison se donne le cœur pour en arriver à ce qu'il veut ! », Alexandre Dumas (fils), *<u>La Dame aux camélias</u>*, 1848

Ainsi, comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, le cœur possède ses propres raisons, raisons qui prennent la forme d'une impulsion électrique spontanée. Mais que sont-elles ? Quelles sont les raisons de notre cœur ? Roméo et Juliette se suicident car ils ne se sentent plus capable de vivre dans un monde où l'être aimé n'est plus présent. Anakin Skywalker devient Dark Vador afin de devenir assez puissant pour protéger Padmée contre la mort elle-même. Pour l'âne de Shrek, j'avoue que je n'ai pas encore trouvé ses raisons de tomber amoureux d'un dragon, mais ne dit-on pas que l'amour est aveugle ? Quoi qu'il en soit, Blaise Pascal n'était pas le seul visionnaire en matière d'électrophysiologie cardiaque. Cette citation d'Alexandre Dumas fils résume parfaitement les mécanismes responsables de **l'automatisme cardiaque**. Les raisons du cœur sont **multiples**, il n'y a pas une seule route pour arriver à un signal électrique spontané.

Ce second chapitre vous exposera donc ces différentes routes, routes qui sont en réalité les acteurs responsables de l'automatisme cardiaque, des acteurs **ioniques**.



En 1949, Silvio Weidmann et Edouard Coraboeuf enregistraient le premier PA sur cœur de mammifère : l'électrophysiologie cardiaque était née ! Avec elle, des champs de recherche sur la conduction du signal électrique, le couplage excitation-contraction et l'automaticité cardiaque sont également apparus. De nos jours la compréhension des mécanismes responsables de cette automaticité cardiaque a bien avancé avec notamment deux modèles majeurs de l'automatisme : celui de l'horloge membranaire et celui de l'horloge calcique.

II.1 L'horloge membranaire

La théorie de l'horloge membranaire stipule que ce sont les canaux ioniques présents à la surface de la cellule qui sont responsables de la dépolarisation diastolique spontanée des cellules sinusales. Le potentiel membranaire à un instant « t » n'étant que le reflet de la somme des courants ioniques dépolarisants et repolarisants transitant à travers la membrane, l'idée derrière cette théorie est que l'activité de ces canaux ioniques permet de faire pencher la balance en faveur d'une dépolarisation qui entraîne progressivement Vm au seuil de déclenchement du PA suivant. La première hypothèse émise dans les année 50 par S. Weidmann était que la DD était due à une diminution de la conductance potassique à la fin de la repolarisation (Weidmann, 1951). Cette hypothèse sera mise à mal 30 ans plus tard avec la découverte du courant I_f (f pour « funny ») en 1979, pilier de la théorie de l'horloge membranaire (Carmeliet, 2019; DiFrancesco, 2019) .

II.1.1 I_f, le « funny current », ou le courant pacemaker

Nommé ainsi en 1979 par Hillary Brown et Dario DiFrancesco, I_f est un courant entrant qui s'active par hyperpolarisation (Figure 14) (Brown *et al*., 1979). Quelle surprise ! Alors que tous les courants observés jusqu'à ce jour étaient activés par dépolarisation, I_f, lui, agit de manière totalement opposée, lui valant le surnom de « funny ». D. DiFrancesco n'hésite pas à également l'appeler le courant pacemaker, celui qui serait responsable de l'automaticité cardiaque. En effet ses propriétés électrophysiologiques permettent d'expliquer la DD observée dans les cellules pacemaker. A la fin de la repolarisation, les canaux K^+ voltage-dépendants s'inactivent et se ferment, ce qui diminue la conductance potassique. Ajoutez un courant entrant dépolarisant qui s'active par hyperpolarisation (donc au cours de la repolarisation) à cette diminution de courants repolarisants et vous obtenez un équilibre des courants en faveur d'une dépolarisation.

Cette importance d'I_f en tant que courant pacemaker n'a pourtant pas été directement acceptée par la communauté scientifique. Le fait que ce courant ait été observé les premières fois pour des potentiels plus négatifs que la MDP avec des cinétiques d'activation lente ne jouait pas en sa faveur. Cependant D. DiFrancesco et ses collègues ont montré qu'I_f pouvait être activé à partir de potentiels plus dépolarisés (-40 mV) dans les cellules sinusales de lapin, donc dans la gamme de potentiels de la DD (-60 mV à -40 mV) (DiFrancesco *et al.*, 1986). De plus, l'environnement intracellulaire peut modifier l'activation et l'amplitude du courant, notamment la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (Hagiwara and Irisawa, 1989). Il est maintenant communément admis qu'I_f joue un rôle très important dans la génération spontanée de PA dans les cellules pacemaker.

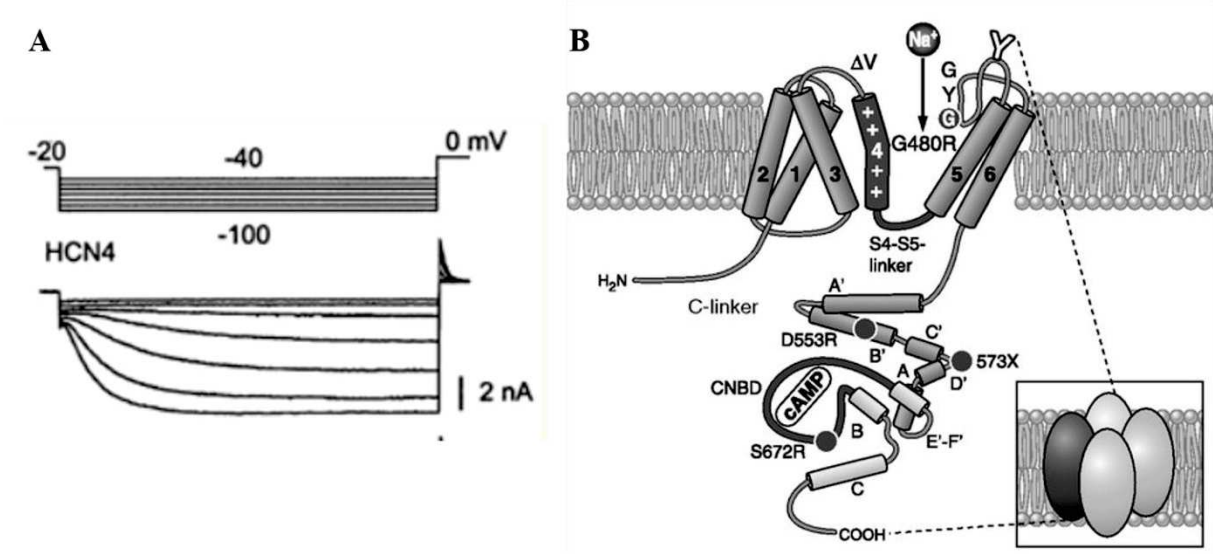


Figure 14 : (A) Courant I_f enregistré dans des cellules COS-7 préalablement transfectées avec le gène codant pour la sous-unité du canal HCN4 murin, d'après *Ishii et al., (2001)*. (B). Structure des canaux HCN, représentation d'une sous-unité. CNBD : domaine de liaison aux nucléotides cycliques, d'après *Biel et al., 2009*.

Activable à partir de -40/-50 mV avec un potentiel d'inversion aux alentours de -10/-20 mV, c'est un courant cationique mixte Na^+/K^+ avec une perméabilité au Na^+ plus importante et dont la conductance dépend de la concentration potassique extracellulaire (DiFrancesco, 1981). L'activation est également dépendante du temps avec un état stable atteint au bout de 1 à 2 secondes, dépendant de l'isoforme du canal. Le courant est porté par des canaux appelés en anglais « Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels » (HCN) comprenant 4 isoformes allant de HCN1 à HCN4 retrouvées chez tous les mammifères (Biel *et al*., 2009; Ludwig *et al.*, 1998; Santoro *et al*., 1998).

Chaque canal fonctionnel est constitué de 4 sous-unités protéiques qui forment un homo- ou hétérotétramère. Chaque sous-unité possède 6 segments transmembranaires (S1 à S6) avec une extrémité N et C-terminale intracellulaire et une boucle entre S4 et S5 appelée le linker S4-S5. A l'instar de la plupart des canaux voltage-dépendants, les domaines S5-S6 composent le pore du canal tandis que le segment S4 constitue le senseur de voltage. L'extrémité C-terminale contient également un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD) sur lequel peut se fixer l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et qui est conservé parmi les 4 isoformes (Figure 14) (Santoro *et al*., 1998).

Etrangement, le segment S4 des canaux HCN contient 9 acides aminés (AA) chargés positivement (arginine et lysine) espacés tous les 3 AA, particularité également retrouvée dans le senseur de voltage des canaux activés par dépolarisation (Biel *et al*., 2009). Comment expliquer alors une ouverture différente pour une structure identique ? Pour les canaux s'ouvrant par dépolarisation, il semblerait que le changement de voltage déplace les charges positives à l'intérieur de S4, ce qui tire le linker S4-S5 et permet l'ouverture du pore. Une étude de 2018 a montré que ce n'était pas le cas pour les canaux HCN et que le linker S4-S5 n'intervenait pas dans l'ouverture dépendante de l'hyperpolarisation (Flynn and Zagotta, 2018). Les auteurs suggèrent plutôt que le segment S4 a un rôle inhibiteur sur le domaine du pore (S5-S6) et que le déplacement de charges à l'intérieur de S4 lève cette inhibition et permet son ouverture.

En ce qui concerne l'expression des canaux HCN au niveau du NSA, l'isoforme majoritairement retrouvée est HCN4 comptant pour environ 80% des ARNs messagers HCN totaux, suivie d'HCN1 et HCN2. Cependant les patterns d'expression diffèrent avec une expression d'HCN4 et HCN1 dans tout le NSA tandis que HCN2 est plutôt retrouvé au niveau de la périphérie. HCN3 semble lui très peu exprimé au niveau du cœur adulte. Le même profil d'expression des HCN a également été observé au niveau du NAV (Herrmann *et al*., 2012; Marionneau *et al*., 2005). Les canaux HCN sont donc majoritairement exprimés au niveau des centres rythmogènes et, bien que les CMs atriaux et ventriculaires expriment HCN2, le seuil d'activation du courant I_f correspondant se situe à des potentiels plus négatifs (~ -110 mV) que ceux auxquels les cellules sont soumises en conditions physiologiques (Robinson *et al.*, 1997).

Cette restriction d'I_f aux centres rythmogènes n'est qu'un argument de plus en faveur de l'hypothèse d'un courant pacemaker. Cependant, même s'il est maintenant reconnu qu'I_f a un rôle prédominant dans la genèse de l'activité électrique cardiaque, d'autres canaux ioniques sont également impliqués dans la génération de la DD.

II.1.2 Canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC en anglais) permettent de convertir des variations de potentiel membranaire (dépolarisation) en signal calcique intracellulaire. Il existe 10 membres de cette famille classés selon plusieurs sous-types, en anglais : type L (long-lasting : $Ca_v1.1$ à 1.4), type N (neuronal : $Ca_v2.2$), type P/Q (Purkinje : $Ca_v2.1$), type R (pharmacoresistant : $Ca_v2.3$) et type T (transient : $Ca_v3.1$ à 3.3). Les VDCC sont de plus séparés en 3 grandes catégories selon leur seuil d'activation : à haut seuil (HVA, aux alentours de -30 mV) de type L, à haut seuil de type non L (type N, R et P/Q) et à bas seuil (LVA, aux alentours de -60 mV, type T) (Figure 15) (Catterall, 2011). Cependant, cette dernière classification peut être nuancée car $Ca_v1.3$ et $Ca_v2.3$, tous les deux considérés à haut seuil, s'activent pourtant à des potentiels relativement hyperpolarisés (Mangoni *et al.*, 2003; Soong *et al.*, 1993).

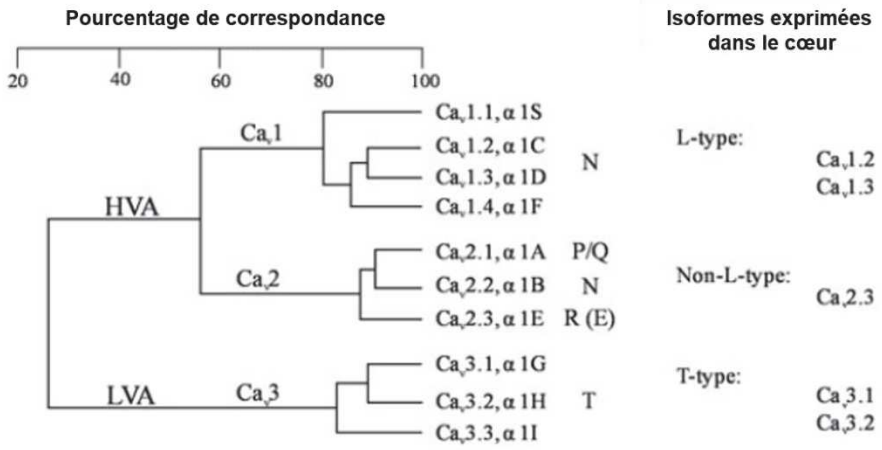


Figure 15 : Classification des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, adapté d'après *Tevoufouet et al., 2014*.

Les VDCC sont formés par une sous-unité protéique α1 comprenant 4 domaines répétitifs chacun constitué de 6 segments transmembranaires. Au contraire des canaux HCN, une seule sous-unité α1 forme le canal, avec pourtant une structure tridimensionnelle qui ressemble aux tétramères HCN. En effet, les segments S5 et S6 de chaque domaine forment le pore-même du canal et le segment 4, positivement chargé, est le senseur de voltage (Figure 16). Les protéines auxiliaires β (1 à 4), α2δ (1 à 4) et γ (1 à 8) sont également associées à la sous-unité α1 et jouent un rôle dans le trafic à la membrane et modulent les propriétés biophysiques du canal (Arikkath and Campbell, 2003).

Dans le cœur, seuls 5 VDCC sont exprimés : $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ de type L, $Ca_v2.3$ de type R et $Ca_v3.1$ et 3.2 de type T (Mesirca *et al*., 2015; Schneider *et al*., 2015). Alors que $Ca_v1.2$ est ubiquitaire et joue un rôle dans le couplage excitation-contraction des CMs contractiles, $Ca_v1.3$, lui, est restreint aux centres rythmogènes (Marionneau *et al*., 2005). $Ca_v3.2$ est exprimé au stade embryonnaire et son expression décroît au stade adulte tandis que $Ca_v3.1$ est l'isoforme de type T prédominante chez l'adulte et est exprimé dans les oreillettes, le tissu conducteur et les centres rythmogènes (Bohn *et al*., 2000; Ferron *et al*., 2002). L'expression de $Ca_v2.3$ a également été montrée dans les CMs atriaux et ventriculaires (Weiergräber *et al*., 2005). De manière intéressante, ces 5 VDCC sont tous exprimés au niveau du NSA et peuvent donc potentiellement jouer un rôle dans la génération spontanée de PA dans les cellules pacemaker.

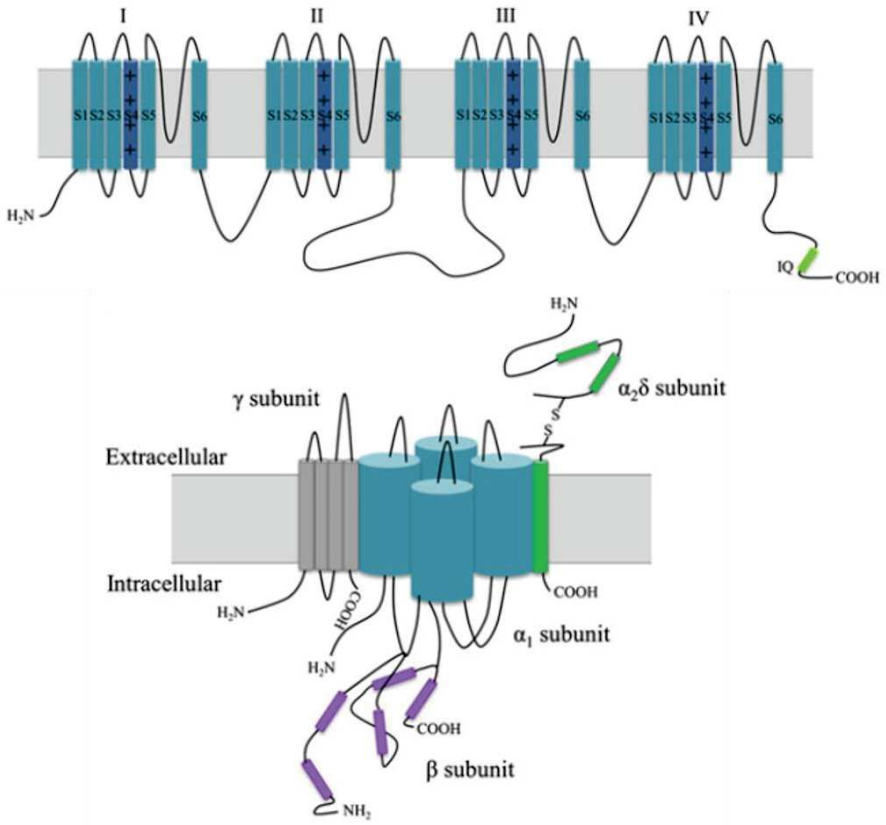


Figure 16 : Structure de la sous-unité α1 des VDCC, d'après *Tevoufouet et al., 2014*.

Canaux calciques de type L (LTCC)

Les LTCC sont considérés comme des canaux calciques à haut seuil et sont responsables du courant calcique de type L $I_{Ca,L}$. Ils sont sensibles à 3 familles de bloqueurs spécifiques : les dihydropyridines (DHP, Nifédipine par exemple), les phénylalkylamines et les benzothiazépines. Au contraire, il existe également des DHP synthétiques tel que le BayK8644 qui sont capables d'activer et d'augmenter le courant calcique transitant par les LTCC (Thomas *et al*., 1985).

Au niveau des cellules sinusales, $Ca_v1.2$ (sous-unité α1C) et $Ca_v1.3$ (α1D) ont des rôles différents dû à des propriétés électrophysiologiques différentes. $Ca_v1.2$ a un haut seuil d'activation à -30 mV avec un pic d'activation autour de 0 mV (Figure 17). Par conséquent il ne participe pas directement à la DD. Cependant, il est responsable de la phase ascendante du PA sinusal qui est un PA majoritairement calcique contrairement au PA des CMs contractiles qui est majoritairement sodique.

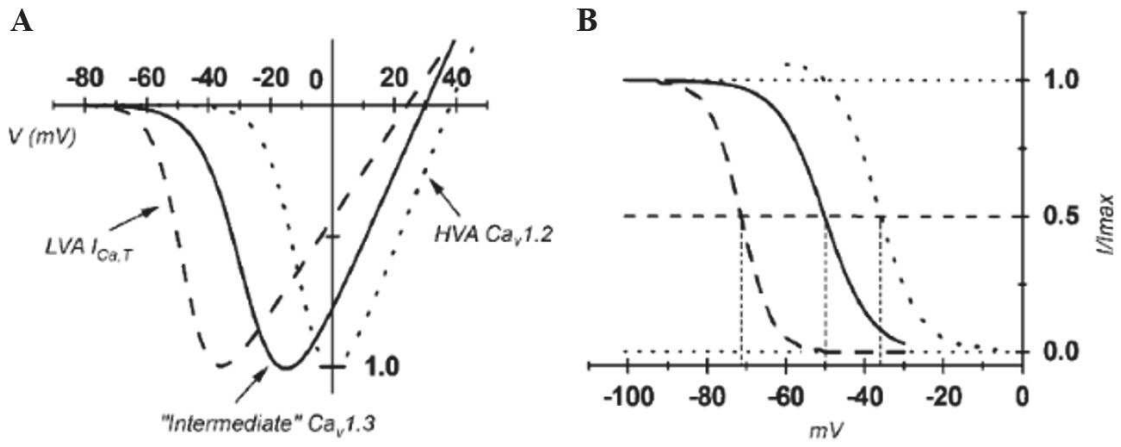


Figure 17 : (A) Courbes IV des courants Ca^{2+} de type T ($Ca_v1.3$) et de type L porté par $Ca_v1.2$ ou $Ca_v1.3$. (B) Courbes d'inactivation des 3 courants précédents. D'après *Mangoni et al., (2006a)*

En 1999, Verheijck et collaborateurs ont enregistré un courant $I_{Ca,L}$ sensible à la Nifédipine dans les cellules sinusales de lapin qui possède un seuil d'activation de -60 mV (Verheijck *et al*., 1999). Bien qu'ils ne le savaient pas à l'époque, ils ont décrit le courant $I_{Ca,L}$ porté par $Ca_v1.3$, qui a un seuil d'activation plus hyperpolarisé que $Ca_v1.2$ (Figure 17), et ont montré qu'il était activé au cours de la phase initiale de la DD. Depuis, plusieurs études ont prouvé que $Ca_v1.3$ avait un rôle important dans l'automaticité cardiaque au même titre que

HCN4. *In vivo*, l'inhibition pharmacologique de $Ca_v1.3$ ou son ablation génétique (souris knock-out (KO) $Ca_v1.3$) provoque une bradycardie et des dysfonctionnements sinusales observables par ECG (Lande *et al*., 2001; Platzer *et al*., 2000). Chez l'Homme, ces mêmes dysfonctions cardiaques sont observées chez des patients présentant une mutation perte de fonction de $Ca_v1.3$ (Baig *et al*., 2011). De plus, *in vitro* l'activation de $I_{Ca,L}$ aux potentiels de la DD n'est plus observée sur des cellules sinusales isolées de souris KO $Ca_v1.3$, le courant s'activant à partir du seuil d'activation de $Ca_v1.2$ (Mangoni *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2002b). Ainsi, $Ca_v1.3$, par son bas seuil d'activation (-60/-50 mV) entre celui des canaux calciques de type T et celui de $Ca_v1.2$ participe à la dépolarisation diastolique dans les cellules pacemaker.

Canaux calciques de type T (TTCC)

Les TTCC sont des canaux calciques à bas seuil d'activation (~ -70/-60 mV) (Figure 17), qui s'inactivent rapidement et qui sont responsables du courant calcique de type T $I_{Ca,T}$. Ils sont bloqués par le mibéfradil et le nickel (Ni^{2+}), avec $Ca_v3.2$ (α1H) y étant plus sensible que $Ca_v3.1$ (α1G) (respectivement EC_{50} de 5 et 150 µM).

$Ca_v3.2$ est très peu exprimé au niveau du cœur adulte et ne semble pas avoir d'effets significatifs sur la génération du signal électrique. Les souris KO $Ca_v3.2$ ne présentent en effet aucun changement de fréquence cardiaque ou de morphologie de l'ECG, ni aucun signe d'arythmies (Chen *et al*., 2003). Au contraire, l'ablation génétique de $Ca_v3.1$ provoque une bradycardie modérée *in vivo* avec une réduction d'environ 10% de la fréquence cardiaque ainsi qu'un ralentissement de la conduction du signal entre les oreillettes et les ventricules (Mangoni et al., 2006a). *In vitro*, la fréquence de dépolarisation spontanée des cellules sinusales isolées de souris KO $Ca_v3.1$ est réduite de 30% comparée à des souris sauvages (wild-type WT). Cette différence de réduction de la fréquence souligne un effet compensatoire de la perte de $Ca_v3.1$ *in vivo* afin de garder une fréquence assez élevée. Cela pourrait être expliqué par un changement du site initiateur de l'impulsion électrique au sein du NSA au niveau de cellules sinusales moins dépendantes du courant $I_{Ca,T}$ (Mesirca *et al*., 2015). On retrouve ainsi encore une fois cette idée de **mécanismes pacemaker différents**.

Il est donc clair que $Ca_v3.1$ participe également à la DD dans les cellules pacemaker mais aussi à la conduction du signal électrique.

Canal calcique de type R (RTCC)

$Ca_v2.3$ (α1E) est classé parmi les canaux à haut seuil de type non L et est responsable du courant $I_{Ca,R}$. Il est bloqué par le SNX-482 qui est un peptide présent dans le venin de la tarantule africaine *Hysterocrates gigas*.

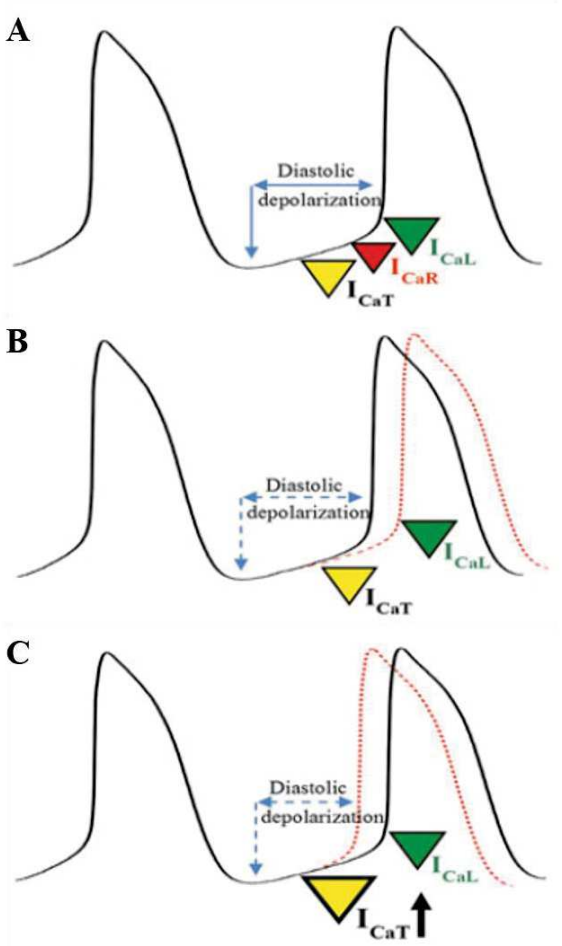


Figure 18 : Modèle proposé par *Tevoufouet et al., 2014* pour la contribution de $Ca_v2.3$ à la DD. (A) La présence de $Ca_v2.3$ ferait le lien entre le courant $I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$ chez des souris contrôle. (B) L'absence de $Ca_v2.3$ conduirait à un délai qui ne serait pas totalement compensé par une augmentation de l'expression des canaux Ca^{2+} de type T (C).

A la différence de $Ca_v1.3$ et 3.1, il n'y a aucune preuve directe de l'implication de $Ca_v2.3$ dans la génération de PA dans les cellules pacemaker. Cependant, des études récentes sur des souris KO $Ca_v2.3$ semblent indiquer un potentiel rôle. En effet, les enregistrements ECG *in vitro* sur cœur isolé et *in vivo* par télémétrie montrent que ces souris présentent des arythmies avec des rythmes d'échappement et des troubles de l'activation atriale qui peuvent indiquer un

défaut de génération du signal électrique (Galetin *et al*., 2013; Lu *et al*., 2004; Weiergräber *et al*., 2005). Sachant que $Ca_v2.3$ est exprimé dans les cellules pacemaker et que son seuil d'activation aux environ de -50 mV se situe dans la gamme de potentiels de la DD, on pourrait supposer que le courant $I_{Ca,R}$ contribue à la dépolarisation spontanée des cellules pacemaker. E. Tevoufouet propose d'ailleurs un modèle dans lequel $Ca_v2.3$ ferait le lien entre les TTCC et les LTCC ($Ca_v1.2$) et que son activation au milieu de la DD aiderait à amener le potentiel membranaire au seuil d'activation de $Ca_v1.2$ (Figure 18) (Tevoufouet *et al*., 2014). Le fait que la perte de $Ca_v2.3$ chez ces souris soit compensée par une augmentation de l'expression du TTCC $Ca_v3.1$ dans le cœur pourrait appuyer cette hypothèse (Weiergräber *et al.,* 2005).

II.1.3 Le courant soutenu I_{st}

En 1995, J. Guo et collaborateurs décrivent un courant entrant s'activant à -70 mV qui est « soutenu », c'est-à-dire avec une inactivation tellement lente (~ 5s) que si on considère l'échelle de temps d'un PA sinusal, ce courant ne s'inactive pas (Guo *et al*., 1995). Nommé I_{st} pour « sustained » en anglais, c'est un courant sodique qui est pourtant insensible à la Tétrodotoxine (TTX, inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants) mais sensible aux DHP (bloqueur et activateur) à l'instar des LTCC. I_{st} est retrouvé dans le NSA et est observé sur des cellules sinusales spontanément actives une fois isolées mais est absent des cellules quiescentes (Mitsuiye *et al*., 2000). Ceci ajouté à un bas seuil d'activation indique que ce courant pourrait contribuer à la génération de la DD. Cependant, l'absence d'inhibiteur spécifique d'I_{st} a empêché jusqu'à présent d'étudier son rôle physiologique bien que des modèles informatiques montrent que la présence d'I_{st} accélère la fréquence de dépolarisation spontanée des cellules pacemaker (Zhang *et al*., 2002a).

Même si cela fait maintenant 25 ans qu'I_{st} a été découvert, on ne sait toujours pas quel est son déterminant moléculaire. Courant sodique sensible à des antagonistes de canaux calciques, I_{st} reste un véritable mystère. Néanmoins, une récente étude de 2017 a montré qu'I_{st} était indéniablement lié à $Ca_v1.3$ (Toyoda *et al*., 2017). En effet, l'ablation génétique de $Ca_v1.3$ chez les souris KO supprime également le courant *Ist*. De plus, *Ist* et le courant $I_{Ca,L}$ porté par $Ca_v1.3$ montrent une même sensibilité aux DHP avec une dose-réponse identique. Toujours est-il qu'une question demeure. Est-ce que $Ca_v1.3$ est directement responsable du courant I_{st} avec possiblement un complexe multimérique de sous-unités spécifiques (β, α2δ, γ) avec la sous-unité α1D, ou bien I_{st} est porté par un autre canal qui serait dépendant de la présence de $Ca_v1.3$?

II.1.4 Le courant sodique I_{Na}

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables du courant entrant I_{Na} qui est d'une grande importance dans la propagation du signal électrique cardiaque et la dépolarisation des CMs contractiles. De même que les VDCC, les canaux sodiques sont composés d'une sous-unité α formant le canal lui-même qui est associée à une ou plusieurs sous-unité auxiliaire β (β1 à 4 plus β1B). Il existe 10 isoformes de sous-unités α ($Na_v1.1$ à 1.9 plus Na_x) qui sont structurellement semblables aux sous-unités α1 des VDCC avec 4 domaines répétitifs chacun constitué de 6 segments transmembranaires (Figure 19). Leur seuil d'activation est bas (-70 mV) et ils sont inhibés par la Tétrodotoxine (TTX). Les canaux sodiques inhibés par des doses de l'ordre du nanomolaire de TTX sont dits TTX-sensible tandis que ceux inhibés par des doses plus élevées de l'ordre du micromolaire sont dits TTX-résistant (Figure 19) (Yu and Catterall, 2003).

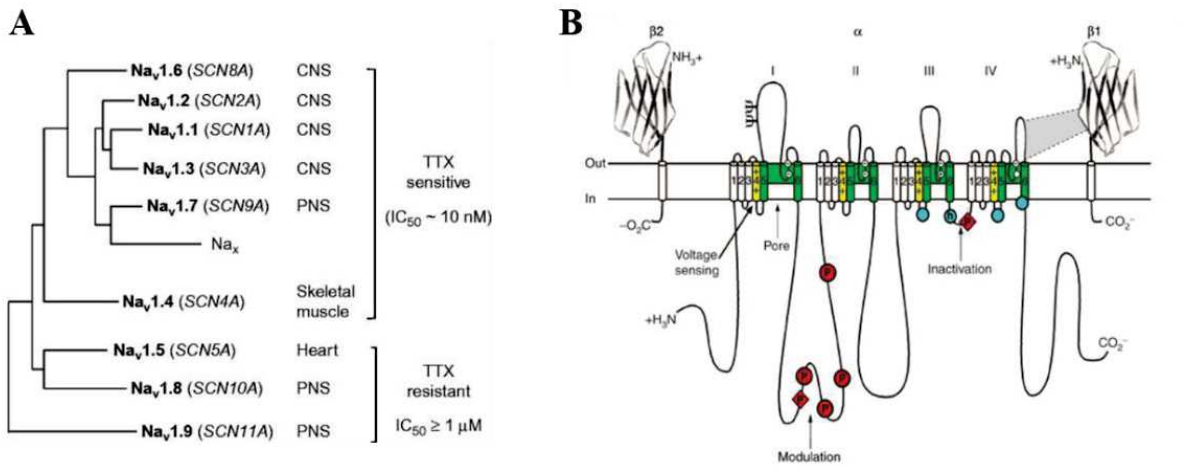


Figure 19 : (A) Classification des canaux Na^+ voltage-dépendants et leur localisation principale. CNS : système nerveux central, PNS : système nerveux périphérique. (B) Structure de la sous-unité α, d'après *Yu et Catterall, 2003.*

Au sein du NSA, deux courants I_{Na} voltage-dépendants ont été enregistrés, l'un sensible à la TTX et l'autre résistant. Le courant TTX-résistant est porté par l'isoforme cardiaque $Na_v1.5$ majoritairement exprimée dans le cœur tandis que le courant TTX-sensible est porté par l'isoforme dite neuronale $Na_v1.1$. $Na_v1.5$ est exprimé dans la zone périphérique du NSA alors que $Na_v1.1$ est exprimé au centre et en périphérie du NSA (Lei *et al*., 2004).

Deux études chez le lapin et la souris ont montré l'implication de I_{Na} dans l'automaticité des cellules sinusales. Chez le lapereau, l'application de 3 µM de TTX ralentit l'activité

pacemaker des cellules sinusales isolées de 63%, ou bien la stoppe totalement. Au contraire, aucun effet n'est observé après application de TTX sur les cellules sinusales isolées de lapin adulte (Figure 20) (Baruscotti *et al.*, 1996, 2000). Or cette absence d'effets de la TTX sur les cellules adultes est accompagnée d'une absence de courant I_{Na} TTX-sensible, donc de l'isoforme $Na_v1.1$. Chez la souris, *Lei et collaborateurs* ont montré par technique de patch-clamp en PA imposé que le courant I_{Na} TTX-sensible était présent durant la phase exponentielle de la DD (Figure 20) (Lei *et al.*, 2004). De plus, de faibles doses de TTX (10 ou 100 nM), suffisantes pour inhiber spécifiquement $Na_v1.1$, ralentissent l'automaticité au niveau du NSA intact ou sur cellules sinusales isolées. De fortes doses de TTX (30 µM), qui inhibent donc à la fois $Na_v1.1$ et $Na_v1.5$, ralentissent quant à elle à la fois l'automaticité et la conduction du signal au sein du NSA.

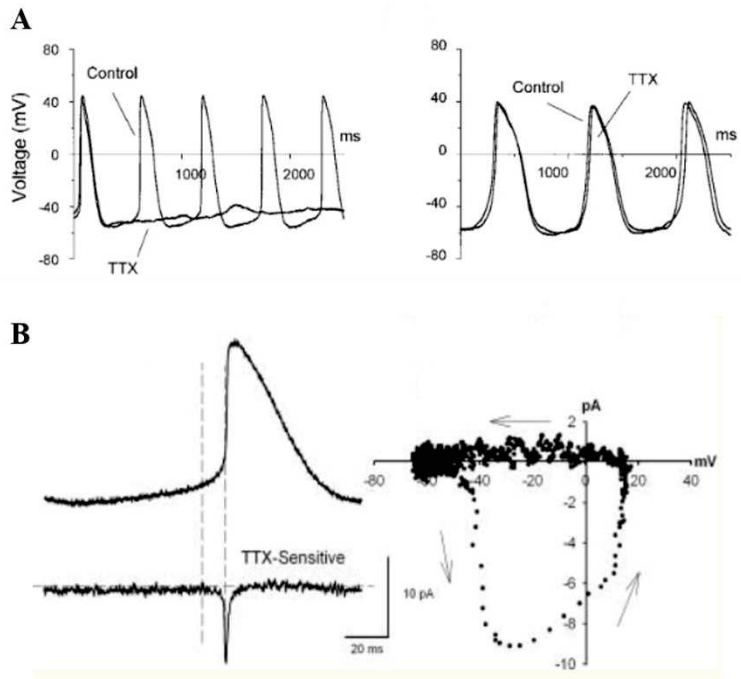


Figure 20 : (A) La TTX stoppe totalement l'activité spontanée de cellules sinusales isolées chez le lapereau (gauche) mais pas chez le lapin adulte (droite), d'après *Baruscotti et al., 1996, 2000*. (B) Enregistrement du courant TTX-sensible par AP imposé et courbe IV associée qui montrent que le courant est activé dans la phase exponentielle de la DD, d'après *Lei et al., 2004*.

Ainsi, le courant I_{Na} porté par l'isoforme $Na_v1.1$ est impliqué dans la génération du signal électrique dans les cellules pacemaker et permet d'accélérer la DD lors de la phase exponentielle afin d'atteindre le seuil d'activation de $Ca_v1.2$. L'isoforme $Na_v1.5$ quant à elle joue plutôt un rôle dans la conduction intranodale du signal.

II.1.5 Courants potassiques

Les conductances potassiques sont une part importante des conductances enregistrées au sein des cellules du NSA. On retrouve notamment des courants voltage-dépendants tels que le courant transitoire sortant I_{to} et les courants retardés rapide I_{Kr} et lent I_{Ks}, mais aussi le courant activé par l'acétylcholine I_{KACh} dû à l'ouverture d'un canal ligand-dépendant, ou encore le courant dépendant de la concentration en ATP intracellulaire $I_{K,ATP}$. Si les courants K^+ sont majoritairement responsables de la phase de repolarisation de la cellule sinusale car étant sortants dans les conditions physiologiques, certains participent également à l'automaticité cardiaque (I_{Kr}, I_{Ks}, I_{KACh} et $I_{K,ATP}$) (Mangoni and Nargeot, 2008).

Courant K^+ retardé rapide (I_{Kr})

Les courants potassiques retardés (I_{Kr} et I_{Ks}) sont responsables d'une augmentation progressive et tardive de la conductance K^+ après dépolarisation de la membrane (Noble and Tsien, 1969). Parmi ces courants retardés, I_{Kr} montre quand même une activation considérée comme rapide comparée à I_{Ks}. Les canaux « ether-a-go-go related » ERG codés par les gènes de même nom (ERG1 à 3) sont responsables de ce courant I_{Kr}. Leur nom plutôt insolite provient de leur similitude avec le gène « ether-a-go-go » EAG présent chez la drosophile *Drosophila melanogaster*. Or, de manière surprenante, les drosophiles possédant une mutation de ce gène ont tendance à agiter rapidement leurs pattes sous anesthésie à l'éther. Il n'en fallait pas plus à W. Kaplan et W. Trout pour nommer ce gène ether-a-go-go en référence humoristique au comportement de ces drosophiles qui se « tortillaient comme des go-go danseurs » (Kaplan and Trout, 1969).

Comme la plupart des canaux K^+ voltage-dépendants, le canal ERG est un tétramère formé des protéines ERG de même nom, constituées de 6 segments transmembranaires (Vandenberg *et al*., 2012). Activés aux alentours de -50 mV, les canaux ERG possèdent des propriétés biophysiques uniques de par leur inactivation plus rapide que leur activation. Cette particularité limite la sortie de K^+ jusqu'à la phase de repolarisation où, lorsque Vm diminue, la levée de l'inactivation est plus rapide que la fermeture du canal ce qui permet une amplitude du courant I_{Kr} maximale pendant la repolarisation. Au niveau du cœur on retrouve l'expression de ERG1 qui joue un rôle extrêmement important dans la repolarisation des CMs contractiles (Pond *et al*., 2000). Son inhibition prolonge le PA et est responsable du syndrome de QT long de type 2 (augmentation de l'intervalle QT sur un ECG) pouvant provoquer des arythmies

ventriculaires mortelles (Vandenberg *et al*., 2012). Les canaux ERG étant la cible d'un grand nombre de molécules pouvant les inhiber, dont notamment le composé synthétique E-4031 utilisé pour l'étude de I_{Kr}, les tests précliniques de pharmacologie de sécurité tentent de prédire l'effet pro-arythmique de nouvelles molécules pharmacologiques en testant leur effet sur l'inhibition de I_{Kr} (De Bruin *et al*., 2005).

Au niveau des cellules pacemaker, I_{Kr} participe également à l'automaticité cardiaque. En effet, c'est lui qui détermine la position du potentiel diastolique maximal (MDP). Son inhibition partielle par de faibles doses d'E-4031 (nM) dans les cellules sinusales isolées de lapin dépolarise la MDP et ralentit la vitesse de dépolarisation spontanée, ce qui entraîne un ralentissement de la fréquence des PA (Verheijck *et al*., 1995). La dépolarisation de la MDP réduit l'activation d'I_f et favorise l'inactivation voltage-dépendante des courants calciques $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T,}$ ce qui a pour conséquence de diminuer la contribution de ces courants à la DD et donc de ralentir la fréquence de dépolarisation spontanée. De plus, l'inhibition totale de I_{Kr} par de fortes doses d'E-4031 arrête totalement l'automaticité chez les cellules pacemaker de lapin et de cobaye (Figure 21) (Matsuura *et al*., 2002; Verheijck *et al*., 1995). Ces effets de l'inhibition de I_{Kr} ont également été observés chez la souris WT (Clark et al., 2004) tandis que des souris KO ERG1b (variant d'épissage b) n'ont pas de courant I_{Kr} et présentent des épisodes de bradycardie (Lees-Miller *et al*., 2003).

Les courants contribuant à l'automaticité cardiaque ne sont donc pas tous des courants entrants permettant la dépolarisation spontanée des cellules pacemaker. L'exemple du courant I_{Kr} nous montre l'importance des **courants repolarisants** dans le recrutement des courants dépolarisants (I_f, $I_{Ca,L}$, $I_{Ca,T}$) et nous rappelle que la génération spontanée de PA résulte d'un équilibre délicat entre courant sortant et courant entrant.

Courant K^+ retardé lent (I_{Ks})

Le courant potassique retardé lent I_{Ks} s'active aux alentours de -40 mV et ne s'inactive pas contrairement à I_{Kr} (Noble and Tsien, 1969). Il est sélectivement inhibé par le chromanol 293B qui est couramment utilisé en laboratoire. En ce qui concerne la structure du canal responsable de I_{Ks}, il est formé d'un tétramère de sous-unités protéiques codées par les gènes KCNQ1 à 3 et seul KCNQ1 est exprimé dans le cœur (Nerbonne, 2000).

Au niveau des cellules pacemaker, le rôle de I_{ks} est dépendant de l'espèce considérée. Chez le cobaye et le lapin qui expriment à la fois I_{Ks} et I_{Kr}, l'inhibition de I_{Ks} par le 293B ralentit

la fréquence de dépolarisation spontanée des cellules et dépolarise modérément la MDP. Ces effets, bien qu'identiques à ceux observés après inhibition de I_{Kr}, sont moins prononcés (Lei *et al*., 2002; Matsuura *et al*., 2002). Il semblerait donc que chez ces deux espèces I_{Kr} possède un rôle prédominant comparé à I_{Ks} et est capable d'assurer l'automaticité après inhibition de I_{Ks}. Au contraire, I_{Ks} est le courant K^+ retardé prédominant chez le porc et remplace I_{Kr} qui n'est pas observé. L'inhibition de I_{Ks} arrête l'automaticité de la même façon que celle de I_{Kr} l'arrête chez le lapin et le cobaye (Figure 21) (Ono *et al*., 2000).

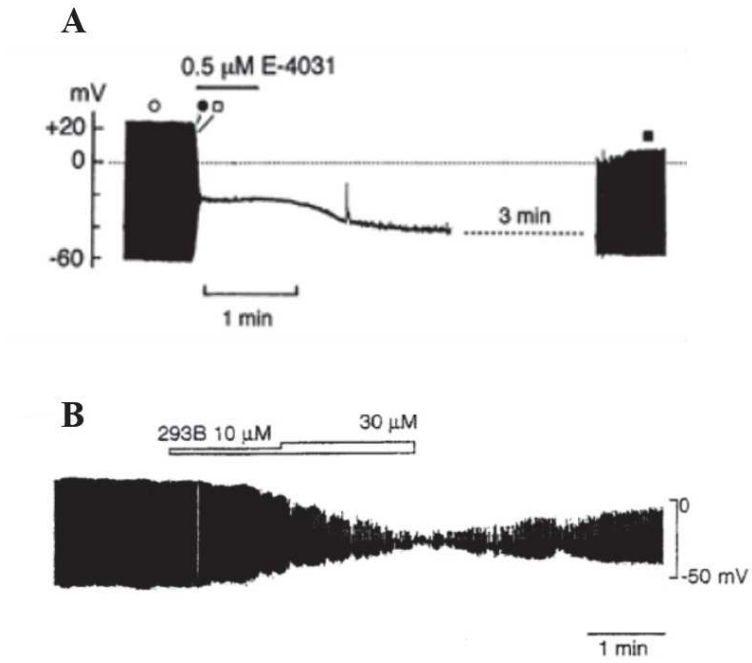


Figure 21 : Enregistrement de l'activité électrique spontanée de cellules sinusales isolées. L'inhibition d'I_{Kr} par l'E-4031 arrête l'automaticité chez le cobaye (A) tandis que l'inhibition d'I_{Ks} par le 293B l'arrête chez le modèle porcin (B). D'après *Matsuura et al., 2002* et *Ono et al., 2000*.

Le courant I_{Ks} joue également un rôle dans l'automaticité cardiaque chez l'Homme. En effet, une récente étude a montré par modélisation informatique que la mutation gain de fonction V141M (remplacement d'une valine par une méthionine) du gène KCNQ1 entraînait un ralentissement de la fréquence des cellules pacemaker qui est corrélé avec une bradycardie observée chez les patients (Whittaker *et al*., 2018). L'augmentation du courant I_{Ks} contrecarre les effets des courants dépolarisants lors de la DD ce qui ralentit la fréquence et montre encore une fois que l'équilibre entre les courants entrants et sortants est essentiel dans l'automaticité des cellules pacemaker.

Courant K^+ dépendant de la concentration en ATP I_{KATP}

Le courant $I_{K,ATP}$ est un courant potassique sortant dans les conditions physiologiques et qui est activé lorsque la concentration intracellulaire en ATP diminue ou, d'un point de vue opposé, qui est inhibé par l'ATP (Noma, 1983). Il existe également des bloqueurs et des activateurs pharmacologiques tels que le Pinacidil qui ouvre les canaux K^+ sensibles à l'ATP (KATP) ou le Glibenclamide qui les inhibe. Les canaux KATP font partie de la famille des canaux potassiques rectifiant entrant (Kir). Au contraire des canaux K^+ voltage-dépendants, les canaux Kir sont des tétramères composés de sous-unités protéiques à deux domaines transmembranaires qui forment le pore (Figure 22). Les canaux KATP sont eux des octamères formés de 4 sous-unités formant le pore (Kir6.1 et Kir6.2) et de 4 sous-unités régulatrices (SUR1, SUR2A ou SUR2B) (Hibino *et al.*, 2010; Inagaki *et al.*, 1995).

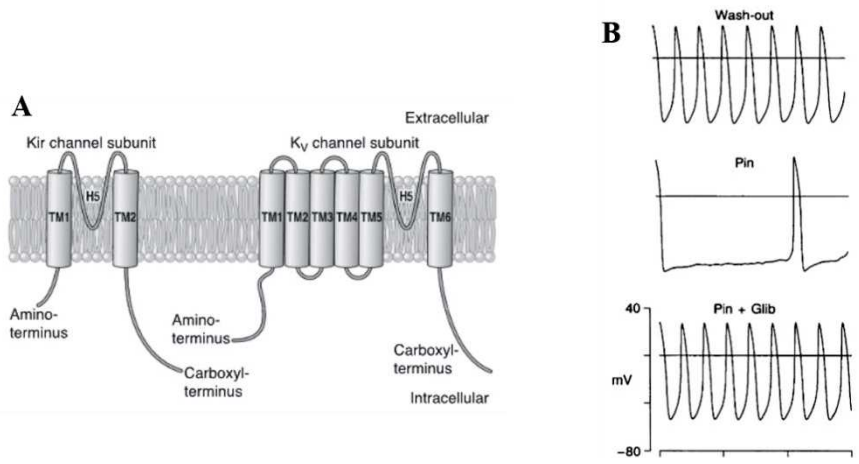


Figure 22 : (A) Structure des canaux Kir d'après *Hibino et al., 2010*. (B) L'activation du courant $I_{K,ATP}$ par le Pinacidil stoppe l'activité automatique des cellules sinusales de lapin et ces effets sont contrecarrés par le Glibenclamide, d'après *Han et al., 1996*.

Le courant $I_{K,ATP}$ a été observé au niveau des cellules sinusales de lapin et son activation par le Pinacidil ralentit, voire arrête, leur activité automatique et hyperpolarise la MDP, tandis que le Glibenclamide contrecarre ces effets et restaure un rythme normal (Figure 22) (Han *et al.*, 1996). Chez la souris, une récente étude a montré que les souris KO Kir6.1 présentent une bradycardie comparées aux souris WT ainsi que des pauses sinusales (Aziz *et al.*, 2018). Au niveau des cellules sinusales isolées de ces souris KO, il est observé un ralentissement de la fréquence de dépolarisation spontanée additionné d'une prolongation de la durée du PA ce qui indique un rôle de $I_{K,ATP}$ lors de la repolarisation.

Courant K^+ activé par l'acétylcholine I_{KACh}

Les canaux ligand-dépendants KACh activés par l'acétylcholine sont responsables du courant potassique I_{KACh}. Ils appartiennent également à la famille des canaux Kir et sont des tétramères formés par les sous-unités Kir3.1 à 3.4 (ou GIRK1 à GIRK4) (Hibino *et al.*, 2010). Dans le cœur, ce sont les sous-unités Kir3.1 et Kir3.4 qui sont exprimées (Wickman *et al.*, 1999). Lorsque l'acétylcholine se fixe sur son récepteur muscarinique M2 (récepteur couplé aux protéines G (RCPG)), les sous-unités composant la protéine G (α et βγ) se séparent. La sous-unité α inhibe l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'ATP en AMP cyclique (AMPc) tandis que la sous-unité βγ active les canaux KACh qui s'ouvrent et sont responsables d'un courant I_{KACh} sortant en condition physiologique (Figure 23) (Wickman *et al.*, 1994).

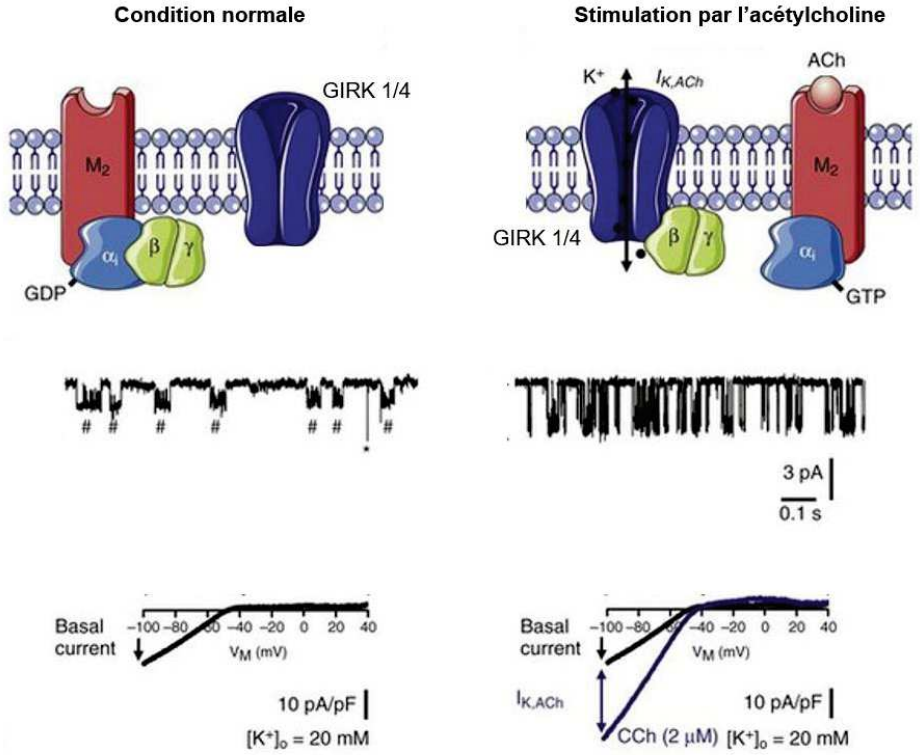


Figure 23 : Schéma de l'activation des canaux GIRK1/4 par l'acétylcholine avec des exemples de tracés de courant unitaire et de courant global I_{Kir} (droite) comparé à une condition basale où les canaux GIRK sont fermés (gauche). Le courant basal I_{Kir} est attribué à IK1. Adapté de *Dobrev et al., (2005)*

Au niveau du NSA, le courant I_{KACh} joue un rôle très important dans la régulation de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome. En effet, l'activation du système nerveux parasympathique provoque une sécrétion d'acétylcholine par le nerf vague qui active I_{KACh} ce qui hyperpolarise les cellules pacemaker et ralentit la DD. Cependant, il n'y a aucune preuve directe d'un rôle de I_{KACh} dans la génération de PAs spontanés. Si les souris KO Kir3.4

présentent bien une absence de courant I_{KACh} dû au fait que Kir3.1 dépend de Kir3.4 pour être adressé à la membrane, leur fréquence cardiaque est identique à celle des souris WT (Kennedy *et al*., 1999; Wickman *et al*., 1998). Pour autant, il n'est pas impossible qu'I_{KACh} participe à la repolarisation en condition physiologique mais que sa contribution est faible et facilement compensée par les autres courants repolarisants (I_{Kr}, I_{Ks}) chez les souris KO Kir3.4.

II.1.6 Les courants chlore Cl^-

Plusieurs conductances chlorure Cl^- ont été enregistrées dans des cellules pacemaker et ont été nommées selon leurs propriétés. N. Hagiwara et collaborateurs ont enregistré un courant Cl^- dans les cellules pacemaker de lapin qui est activé par l'étirement membranaire (ou « stretch » en anglais) appelé « stretch-activated I_{Cl} » ou $I_{Cl,swell}$ (Hagiwara *et al*., 1992). Toujours chez le lapin, A. Verkerk et collaborateurs ont montré que le courant Cl^- activé par le Ca^{2+} $I_{Cl(Ca)}$ était présent dans les cellules sinusales et qu'il s'activait tardivement pendant la phase ascendante du PA (Verkerk *et al*., 2002). Z. Huang et collaborateurs ont quant à eux reporté la présence du courant Cl^- rectifiant entrant $I_{Cl,ir}$ dans les cellules pacemaker de cobaye (Huang *et al*., 2009).

Si $I_{Cl(Ca)}$ ne semble pas contribuer à la DD ou à la MDP (Verkerk et al., 2002), $I_{Cl,ir}$ lui pourrait potentiellement jouer un rôle dans l'automaticité des cellules pacemaker. Le gène ClCN2 code pour le canal Cl^- 2 (ClC-2) responsable du courant $I_{Cl,ir}$. A l'instar de HCN4, ClC-2 est activé par hyperpolarisation et également en condition hypotonique. Etant donné que le potentiel d'inversion du Cl^- en condition physiologique est situé entre -65 et -35 mV, donc dans la gamme de potentiel de la DD, l'activité de ClC-2 est unique car il peut à la fois être responsable d'un courant entrant et d'un courant sortant au cours de la DD (Baumgarten and Fozzard, 1981; Duan, 2013). Cependant, sa rectification entrante limite l'amplitude du courant sortant.

Ainsi, ClC-2 pourrait être responsable d'un courant entrant et contribuer à la DD comme le suggère D. Duan dans sa revue (Duan, 2013). Bien que les souris KO ClC-2 montrent en effet une réduction de leur fréquence cardiaque comparée à celle des souris WT, cette différence n'est pas significative (Huang *et al*., 2009). Ceci pourrait être expliqué par un phénomène de compensation ou bien par le fait que le courant $I_{Cl,ir}$ en condition basale et isotonique est relativement faible. Cependant ces souris KO ont une fréquence plus faible que les souris WT pendant l'exercice sur tapis roulant ce qui indique que $I_{Cl,ir}$ joue plutôt un rôle dans la régulation de la fréquence cardiaque lors d'un effort.

II.1.7 Les canaux « Transient Receptor Potential » TRP

Les canaux appelés en anglais « Transient Receptor Potential » TRP sont des canaux cationiques non sélectifs principalement perméables au Ca^{2+}. Chez les mammifères il existe 28 canaux TRP divisés en 6 sous-familles selon leur homologie de séquence en AA : TRPA (ankyrin, 1 membre), TRPC (canonic, 7 membres), TRPM (melastatin, 8 membres), TRPML (mucolipin, 3 membres), TRPP (polycistin, 3 membres) et TRPV (vanilloid, 8 membres) (Figure 24). Leur structure ressemble à celle des canaux voltage-dépendants avec 4 sous-unités α constituées de 6 segments transmembranaires s'assemblant en homo ou hétérotétramères. Cependant les TRP n'ont pas de résidus arginine chargés positivement nécessaires au senseur de voltage S4 bien que certains montrent quand même une dépendance au voltage (TRPV1, TRPM4 et TRPM8) (Clapham, 2003; Montell, 2005; Nilius *et al*., 2005).

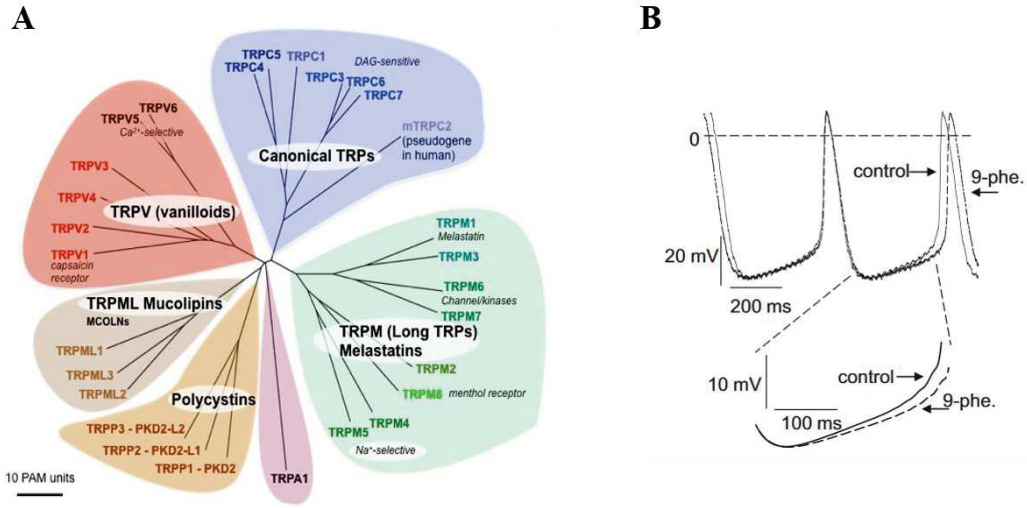


Figure 24 : (A) Classification des canaux TRP, adapté d'après *Clapham, 2003*. (B) Effets de l'inhibition de TRPM4 par le 9-phenantrol sur le PA sinusal de lapin, d'après *Hof et al., 2013*.

Au niveau du NSA, la majorité des TRPC sont exprimés mais seul TRPC3 semble être exprimé au niveau de la membrane, du moins chez la souris (Ju *et al*., 2007). TRPC3 contribue à une entrée calcique dans la cellule pacemaker induite par déplétion des stocks calciques du SR (ou « store-operated Ca^{2+} entry » en anglais, SOCE). Son inhibition par le SKF-96365 diminue l'entrée SOCE ainsi que la fréquence de dépolarisation des cellules pacemaker suggérant son implication dans l'automaticité.

Deux autres canaux TRP sont exprimés dans les cellules pacemaker : TRPM4 et TRPM7. L'implication de TRPM4 dans l'automaticité cardiaque a été démontrée chez la souris, le rat et le lapin (Hof *et al*., 2013). L'inhibition spécifique de TRPM4 par le 9-phenantrol diminue significativement la fréquence spontanée de l'oreillette droite isolée de souris ou de rat WT sans impacter les autres paramètres du PA, ce qui suggère un effet sur la vitesse de la DD. Chez les souris KO TRPM4, le 9-phenantrol n'a aucun effet sur la fréquence des PA spontanés de l'oreillette droite isolée. De plus, l'inhibition pharmacologique de TRPM4 diminue la pente de la DD des PA sinusaux de lapin (Figure 24). TRPM4 étant un canal qui laisse majoritairement passer du Na^+, il contribuerait donc à la DD par un courant entrant et aiderait à atteindre le seuil d'activation de $Ca_v1.2$ (Hof *et al*., 2019).

Le dernier TRP dont l'implication dans l'automaticité cardiaque a été démontrée est TRPM7. La délétion de TRPM7 chez la souris et le poisson zèbre provoque des dysfonctions sinusales et les cellules pacemaker isolées de souris KO TRPM7 montrent un ralentissement de leur fréquence de dépolarisation associé à une diminution de l'expression de HCN4 et du courant I_f (Sah *et al*., 2013). Ainsi, TRPM7 semble influencer la DD par régulation de l'expression de HCN4.

La génération de l'activité électrique cardiaque au sein des cellules du NSA fait donc intervenir une très grande variété de courants ioniques (Figure 25). Bien qu'I_f ait été considéré au départ comme le courant pacemaker, il est maintenant admis que c'est plutôt un équilibre délicat entre les différents courants transitant à travers la membrane qui crée la DD. Cependant, la contribution des courants à la DD n'est pas égale et certains courants (I_f, $I_{Ca,L}$) sont prédominants, leur disparition entraînant une dysfonction sinusale, tandis que d'autres ne semblent pas avoir de rôle majeur, leur perte étant facilement compensée par les autres courants.

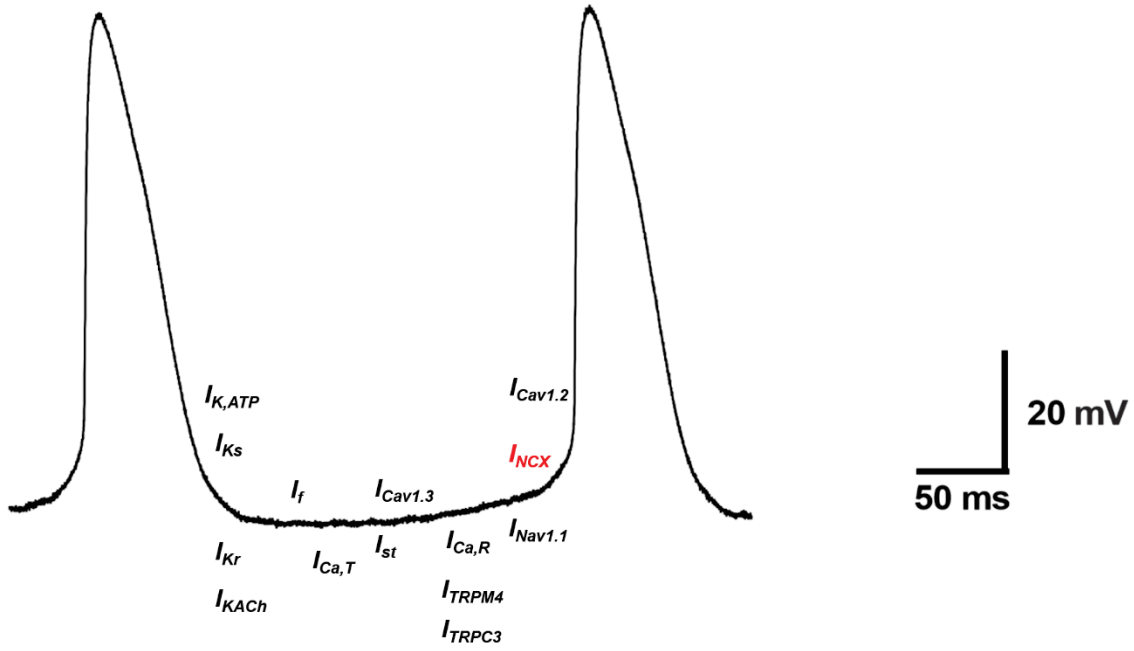


Figure 25 : Positionnement et distribution des courants ioniques de l'horloge membranaire (en noir) et calcique (en rouge) par rapport à la DD (*liste non exhaustive*).

II.2 L'horloge calcique

Le second modèle qui propose d'expliquer la génération de l'impulsion électrique au niveau des centres rythmogènes est celui de l'horloge calcique. La notion d'horloge pour désigner ces deux théories n'est pas anodine et fait référence à un cycle qui se répète indéfiniment après chaque systole.

La théorie de l'horloge calcique stipule que ce sont des relargages cycliques spontanés de calcium (« Local Calcium Release » en anglais, LCR) du RS par les récepteurs à la ryanodine (RyR) qui sont responsables de l'automaticité cardiaque. En 1989, D. Rubenstein et S. Lipsius ont montré que l'inhibition du RyR par la ryanodine ralentissait l'automaticité des cellules pacemaker auxiliaires de chat en réduisant la pente de la phase exponentielle de la DD, suggérant un rôle des LCRs dans la génération de la DD (Rubenstein and Lipsius, 1989). Ce ralentissement de l'automaticité cardiaque par inhibition du RyR a également été observé sur le NSA de cobaye et sur cellules sinusales isolées de lapin (Li *et al*., 1997; Rigg and Terrar, 1996). Si ces expériences prouvent que les LCRs contribuent à l'automaticité cardiaque cela n'indique en rien que ces relargages calciques soient un mécanisme pacemaker en soi. Toutefois, Edward Lakatta et son équipe ont beaucoup étudié ce phénomène de LCRs dans

l'automaticité cardiaque au début des années 2000 et publièrent en 2004 les expériences qui seront la clef de voûte de la théorie de l'horloge calcique. Ils montrent en effet que les relargages spontanés de calcium par les RyR **ne sont pas dépendants du voltage** et ne **requièrent pas une dépolarisation de la membrane** pour se produire, impliquant un caractère **indépendant et autonome** à ce mécanisme (Vinogradova *et al*., 2004). Ils concluent alors leur article en ces termes : « ainsi, l'horloge biologique des cellules pacemaker du NSA, comme celle de nombreuses autres fonctions rythmiques, implique une rythmicité calcique intracellulaire ».

II.2.1 Relargages spontanés de calcium par les RyRs

En 1993, H. Cheng et collaborateurs décrivent pour la première fois le phénomène de LCRs dans des cellules ventriculaires de rat (Cheng *et al*., 1993). En utilisant une sonde calcique fluorescente (Fluo-3), ils observent des augmentations de la concentration calcique intracellulaire qui apparaissent spontanées et qui sont restreintes à une toute petite partie de la cellule. Elles sont différentes des transitoires calciques qui, eux, sont des augmentations calciques globales provoquées par l'ouverture des VDCC lors d'un PA. En imagerie confocale, elles se présentent comme des petites étincelles de fluorescence formant une zone circulaire très localisée d'environ 1,5 µm de rayon, ce qui leur a également donné le nom de sparks en anglais (Figure 26). Etant donné que les sparks sont également observés lorsque les cellules sont dans un milieu dépourvu de Ca^{2+}, ils en ont conclu que cette augmentation calcique ne provenait pas d'une entrée calcique dans le cytosol par des canaux ioniques membranaires mais d'un relargage de calcium par le RS, probablement par les RyR. En effet, la ryanodine, à faible dose (nanomolaire), augmente la probabilité d'ouverture du RyR tandis que de fortes doses (micromolaire) bloquent le canal. Or les effets de la ryanodine sur les LCRs coïncident avec ses effets sur le RyR. De faibles doses (100 à 300 nM) augmentent la fréquence des sparks tandis qu'aucun LCR n'est observé lorsque les cellules sont exposées à des doses supérieures à 1 µM. De plus, en calculant le flux de calcium d'un LCR, H. Cheng et collaborateurs ont trouvé une intensité de courant d'environ 4 pA ce qui correspond au courant transitant par un seul RyR (Rousseau *et al*., 1987). Toutes ces expériences indiquent donc que les LCRs sont dus à l'ouverture d'un seul RyR, ou bien d'un très petit nombre de RyR agissant de concert.

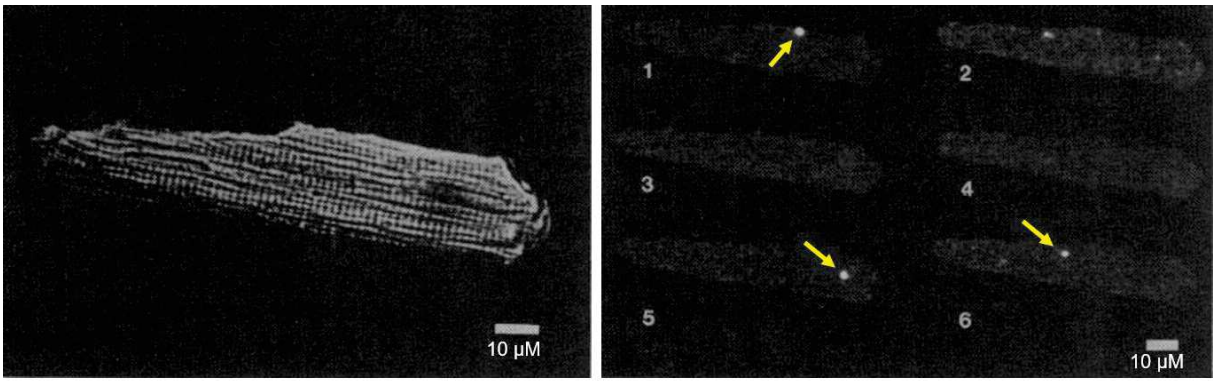


Figure 26 : Photo en lumière transmise d'un cardiomyocyte ventriculaire de rat (gauche). Six images successives observées en microscopie confocale de la même cellule montrant des LCRs (flèches jaunes). D'après *Cheng et al., 1993*.

Les RyRs sont les plus gros canaux ioniques connus à ce jour avec un poids moléculaire de 2,2 MDa. Ils sont insérés dans la membrane du RS et sont composés de 4 sous-unités formant des homotétramères (Inui *et al*., 1987; Lai *et al*., 1988). Leur sensibilité à la ryanodine est à l'origine de leur nom bien qu'ils soient également sensibles à plusieurs autres ligands (De Waard et al., 2020). A l'instar de la ryanodine, le Ca^{2+} a un effet double sur les RyRs. A faibles doses, il augmente leur probabilité d'ouverture et est l'initiateur du phénomène de calcium-induced calcium release (CICR). La courbe dose-réponse du Ca^{2+} avec sa forme caractéristique en cloche montre qu'au contraire, les RyRs sont inhibés à fortes doses (Bezprozvanny *et al*., 1991). L'ATP est également un activateur des RyRs, de même que la caféine qui est utilisée en laboratoire pour déterminer la charge calcique du RS en vidant le calcium par ouverture des RyR (Rousseau *et al*., 1988; Smith *et al*., 1986). Il existe 3 isoformes des RyR appelées RyR1, 2 et 3. RyR2 est l'isoforme cardiaque prédominante impliquée dans le phénomène de CICR. Cependant, *J. Tellez et collaborateurs* ont montré en 2006 qu'il y avait une diminution de l'expression de RyR2 au niveau du NSA de lapin comparé à l'oreillette droite tandis que RyR3 était l'isoforme prédominante du NSA central (Tellez *et al*., 2006).

Les LCRs sont également retrouvés au niveau des cellules pacemaker où Y. Ju et D. Allen ont observé une rythmicité dans leur fréquence d'apparition lors de la DD (Ju and Allen, 2000). De plus, ils ont noté une plus forte densité de LCRs juste avant un transitoire calcique, c'est-à-dire lors de la phase exponentielle de la DD. En 2004, l'équipe d'E. Lakatta a étudié les LCRs dans les cellules sinusales de lapin et a montré que leur rythmicité d'apparition était également observée dans des cellules quiescentes, autrement dit sans changement de potentiel membranaire. Appuyant cette observation, ils ont également remarqué qu'arrêter des cellules spontanément actives à la MDP (-65 mV), ou à un potentiel dépolarisé auquel les VDCC sont

censés être inactivés (-10 mV) par voltage imposé ne stoppait pas l'apparition rythmique des sparks (Figure 27) (Vinogradova *et al*., 2004). En effet, les LCRs persistent pendant quelques secondes en absence de PA avant de disparaître, certainement à cause de la déplétion du RS qui n'est plus rempli par les VDCC lors du PA. Ainsi, il y a une indépendance au voltage des LCRs qui leur confère un caractère autonome. L'augmentation localisée de la concentration calcique intracellulaire à la fin de la DD par ce phénomène de LCRs favorise ensuite la sortie de Ca^{2+} par l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} (NCX).

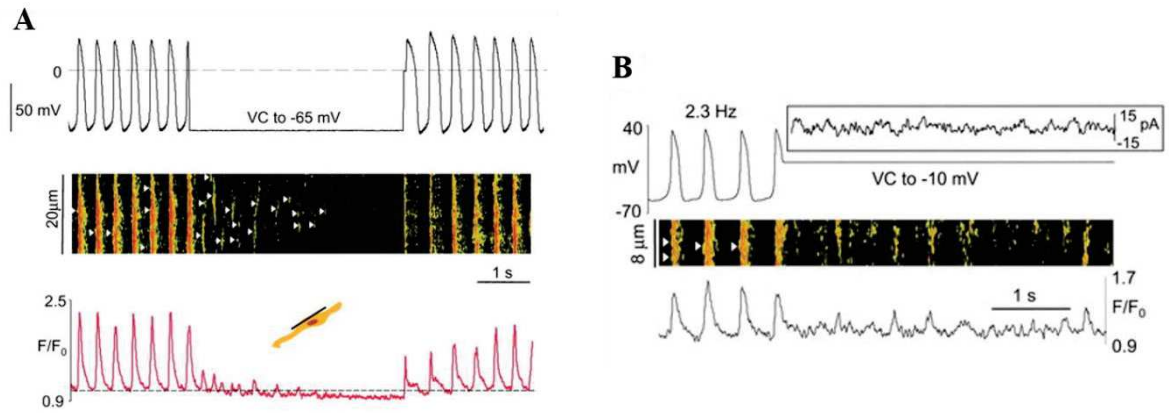


Figure 27 : Les LCRs apparaissent cycliquement et sont voltage-indépendants. Enregistrement de PAs (haut), line-scan (milieu) et intégrale de la fluorescence calcique (bas) lorsque le voltage est imposé à -65 mV (A) ou -10 mV (B). D'après *Vinogradova et al., 2004*.

II.2.2 L'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} (NCX)

Sans grande surprise, l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+}, ou NCX, doit son nom à sa capacité à échanger 3 Na^{+} contre 1 Ca^{2+} entre le compartiment intracellulaire et le compartiment extracellulaire (Pitts, 1979). Une telle stœchiométrie lui confère une électrogénécité d'une charge positive et donc l'apparition d'un courant I_{NCX} qui suit le mouvement du Na^{+}. Il y a donc deux modes de fonctionnement différents pour le NCX : le mode « normal » lorsque le Na^{+} rentre dans la cellule tandis que le Ca^{2+} en sort, ce qui correspond à un courant I_{NCX} entrant, et le mode « inverse » lorsque le Na^{+} sort tandis que le Ca^{2+} rentre, ce qui correspond à un courant I_{NCX} sortant. Le fonctionnement du NCX est donc dépendant à la fois du voltage et des concentrations en Na^{+} et Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane.

A la différence des canaux ioniques, l'échangeur NCX est une seule protéine organisée en 10 segments transmembranaires adoptant une conformation telle que deux passages distincts

sont formés pour le Ca^{2+} et le Na^{+} (Figure 28) (Liao *et al*., 2012; Ren and Philipson, 2013). Chez les mammifères on retrouve 3 isoformes de l'échangeur appelées NCX1, 2 et 3 respectivement codées par les gènes SLC8A1, 2 et 3. NCX1 est l'isoforme cardiaque tandis que NCX2 et NCX3 sont majoritairement exprimés dans le cerveau et le muscle squelettique (Quednau *et al*., 1997).

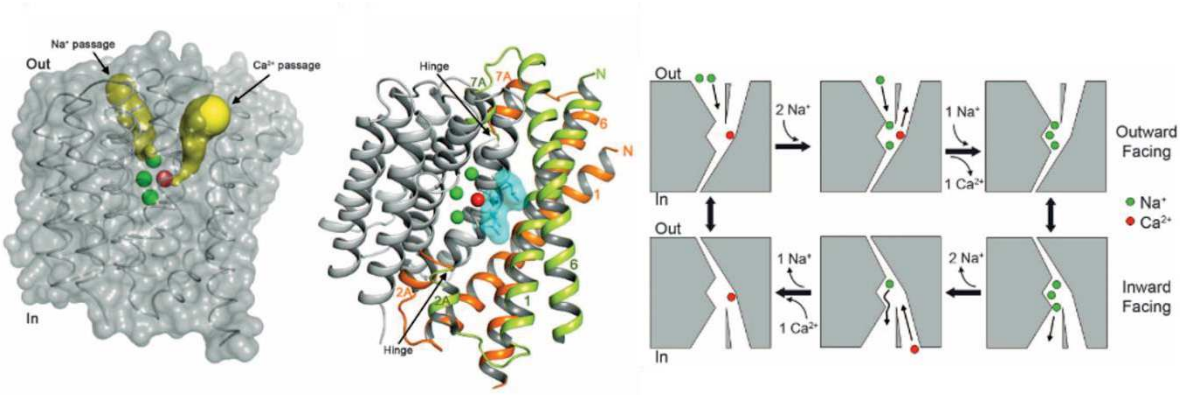


Figure 28 : Modélisation 3D de la structure de l'échangeur NCX (gauche) et schéma du passage des ions Na^{+} et Ca^{2+} (droite). D'après *Liao et al., 2012*.

Au niveau des cellules pacemaker, l'existence d'un courant I_{NCX} a également été démontrée dès 1984 (Brown *et al*., 1984; Zhou and Lipsius, 1993). E. Lakatta et son équipe ont alors observé les effets d'une inhibition de NCX sur l'automaticité de cellules pacemaker isolées de lapin. L'inhibition de NCX par substitution du Na^{+} extracellulaire avec du lithium (Li^{+}) supprime un courant entrant de 1,7 pA/pF correspondant à I_{NCX}, lors de la DD, en plus d'arrêter totalement l'automaticité de ces cellules (Bogdanov *et al*., 2001). De plus, l'inhibition des RyR par la ryanodine, et, par conséquent, l'inhibition des LCRs, supprime également un courant entrant lors de la DD de même intensité que I_{NCX}. Ces expériences indiquent donc que les LCRs sont responsables de l'activation de I_{NCX} lors de la DD qui est suffisante pour accélérer la phase exponentielle de la DD.

La théorie de l'horloge calcique met donc en exergue une importance capitale des LCRs spontanés et rythmiques au cours de la DD pour expliquer la génération de l'activité électrique spontanée des cellules sinusales. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ active ensuite le mode « normal » du NCX ce qui crée un courant entrant responsable de la phase exponentielle de la DD. Selon cette théorie, la dynamique calcique intracellulaire cyclique est le réel moteur de la dépolarisation spontanée des cellules sinusales. Alors, qu'en est-il de la théorie de l'horloge membranaire ? Est-ce que l'une ou l'autre de ces théories suffit pour expliquer la DD ?

II.3 Horloge membranaire et horloge calcique : un système couplé

Pour répondre à la question posée précédemment, les théories de l'horloge membranaire et calcique seules ne peuvent pas expliquer les mécanismes pacemaker. Il est désormais évident que ces deux horloges agissent de concert pour générer une dépolarisation spontanée des cellules sinusales. Ce concept de synergie des deux horloges découle d'un travail de modélisation numérique de l'activité pacemaker qui a montré la nécessité de l'activation cyclique des canaux ioniques de la membrane pour maintenir une libération de Ca^{2+} par le RS cohérente avec la fréquence (Maltsev and Lakatta, 2009). Cette modélisation a donc suggéré le concept de l'automatisme en tant que système couplé, ce qui donne en anglais le concept de « coupled-clock » (Lakatta et al., 2010). En d'autres termes, les horloges membranaire et calcique sont interdépendantes et s'entrainent mutuellement, l'une ayant besoin de l'autre pour fonctionner correctement. Il y a donc une synchronisation entre l'activation séquentielle des canaux ioniques lors de la DD, et la libération spontanée de Ca^{2+} par RyR2. Par exemple, les stocks calciques du RS sont renouvelés par l'action de $Ca_v1.2$ lors du PA (Janczewski and Lakatta, 1993). Sans cette activation du courant calcique $I_{Ca,L}$, les LCRs spontanés ne peuvent pas persister (Figure 27) (Vinogradova *et al.,* 2004).

Plusieurs acteurs créent un lien entre les deux horloges, notamment la protéine kinase A (PKA) dépendante du taux d'AMPc et la calcium-calmoduline kinase II (CaMKII) (Figure 29). Ces deux kinases phosphorylent à la fois des acteurs de l'horloge membranaire (LTCC) et de l'horloge calcique (RyR) et leur activité est régulée par l'augmentation de calcium intracellulaire : le Ca^{2+} se fixe à la calmoduline et le complexe Ca^{2+}-calmoduline active directement la CaMKII et indirectement la PKA *via* l'activation d'adénylates cyclases (AC, voir chapitre III) dépendantes du Ca^{2+} (Mattick *et al*., 2007). La PKA et la CaMKII sont alors au cœur de ce système couplé car elles sont régulées par l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (courant $I_{Ca,L}$ et LCRs) et régulent elles-mêmes les deux horloges en les phosphorylant, ce qui potentialise le courant $I_{Ca,L}$ et l'apparition des LCRs (Lakatta *et al.*, 2010). Ainsi, l'activité des LTCC et de RyR2 augmente l'activité de la PKA et de la CaMKII, qui elles-mêmes augmentent l'activité des LTCC et de RyR2. Ce cercle d'activation perpétuelle est contrecarré par l'activité des phosphodiestérases (PDE) qui dégradent l'AMPc et des protéines phosphatases qui déphosphorylent les acteurs des deux horloges (Lyashkov *et al*., 2009; Vinogradova *et al*., 2008). En régulant les acteurs des deux horloges, la PKA, la CaMKII et les PDE font le lien entre l'horloge membranaire et calcique et sont essentielles au fonctionnement basal du

pacemaking. En effet, l'inhibition de la PKA ou la CaMKII stoppe l'automaticité des cellules sinusales (Vinogradova *et al*., 2000, 2006) tandis qu'une activité constitutive des PDE est requise (Vinogradova and Lakatta, 2021; Vinogradova *et al*., 2008).

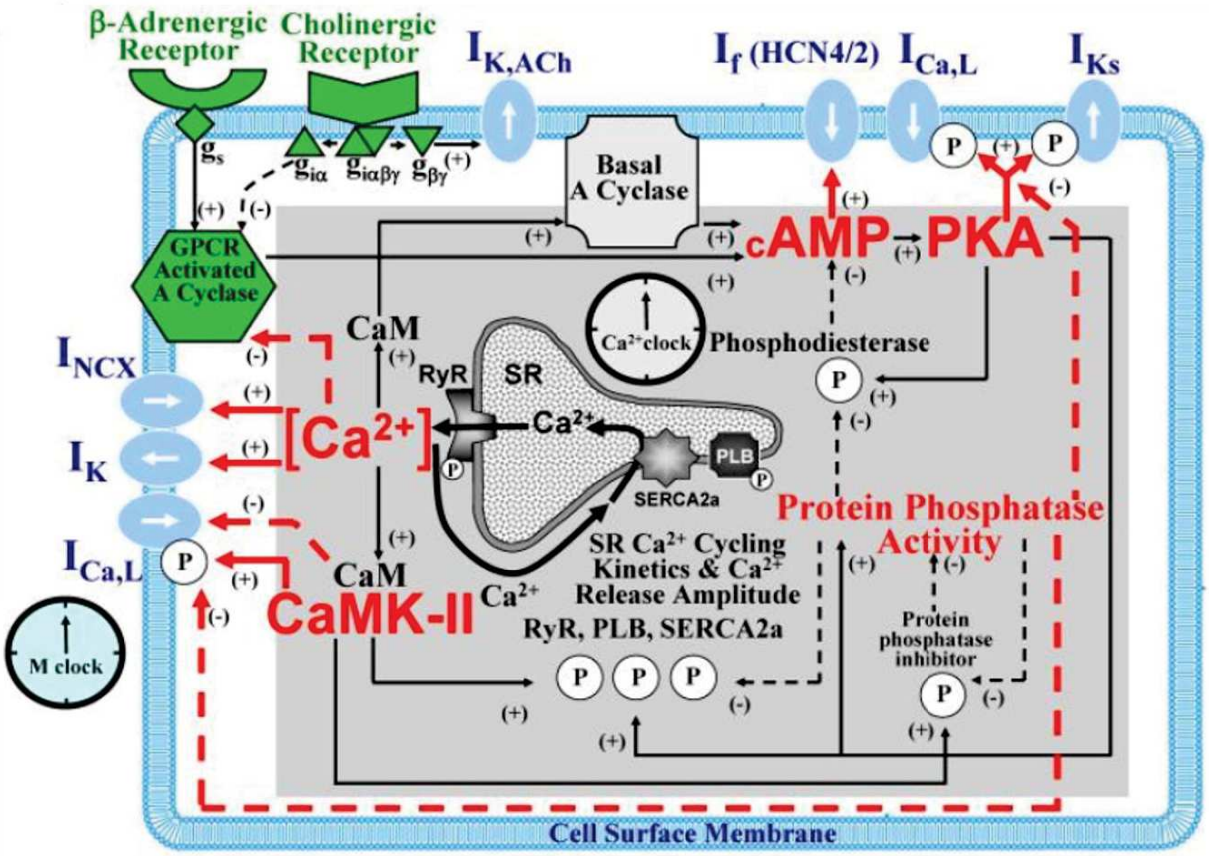


Figure 29 : Schéma de l'interaction des différents acteurs de l'horloge membranaire (zone membranaire en bleu, lettres bleues) et calcique (zone grise intracellulaire, lettres noires). Les acteurs couplant les deux horloges sont représentés en lettres rouges. D'après *Lakatta et al., 2010*.

Cette théorie des horloges couplées permet donc d'expliquer pourquoi l'une et l'autre horloge n'est pas capable de fonctionner seule. Cependant, bien que le système soit couplé, ce modèle stipule toujours que ce sont les LCRs et l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ au début de la diastole qui permet d'enclencher tout le système, notamment en activant les VDCC qui à leur tour augmentent le $[Ca^{2+}]_i$ et les LCRs par CICR (Lyashkov *et al*., 2018). Néanmoins, les canaux Ca^{2+} de type L pourraient bien avoir un rôle plus important que ce qui est couramment décrit.

II.4 L'horloge membranaire à l'origine de l'horloge calcique ?

La version couramment acceptée du modèle du *coupled-clock* donne un rôle plutôt secondaire aux canaux Ca^{2+} de type L qui ne favoriseraient que la dernière partie de la DD. Or, il a été démontré que l'isoforme $Ca_v1.3$ était essentielle au fonctionnement normal du pacemaking (Baig *et al.*, 2011; Lande *et al.*, 2001; Mangoni *et al.*, 2003; Platzer *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002b). Bien que cela ne montre pas que $Ca_v1.3$ génèrerait le mécanisme pacemaker en soi, de récentes études indiquent pourtant un lien étroit entre $Ca_v1.3$ et les relargages spontanés de Ca^{2+} par RyR2. Notamment, une étude sur un modèle murin de tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (CPVT en anglais : « Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia ») a montré que des libérations excessives et **non synchronisées** de Ca^{2+} par RyR2 inactivaient le courant $I_{Ca,L}$ tout en le rendant insensible à une stimulation adrénergique (Neco *et al.*, 2012). De plus, les cellules sinusales isolées de ce modèle murin montrent une augmentation du nombre de LCRs qui n'est pas corrélée à une augmentation de la fréquence de dépolarisation, ce qui serait attendu selon le modèle du *coupled-clock*. Il semblerait donc y avoir une interaction fonctionnelle entre $Ca_v1.3$ et RyR2.

Conformément à cette idée, notre équipe a démontré que les canaux $Ca_v1.3$ colocalisaient avec les récepteurs RyR2, ce qui n'est pas le cas des canaux $Ca_v1.2$ (Christel *et al.*, 2012). De manière intéressante, nous avons également montré que la délétion génétique des canaux $Ca_v1.3$ chez la souris provoquait une diminution du nombre de LCRs en condition basale (Figure 30) (Torrente *et al.*, 2016). Il existe donc un lien entre $Ca_v1.3$ et les libérations locales de Ca^{2+} durant la diastole. Ainsi, les dysfonctions sinusales observées chez les souris $Ca_v1.3$ KO peuvent être expliquées par la disparition d'un courant entrant lors de la DD (horloge membranaire) d'une part et à la diminution des LCRs (horloge calcique) d'autre part. En d'autres termes, les canaux $Ca_v1.3$ semblent avoir un rôle central au cœur des deux horloges.

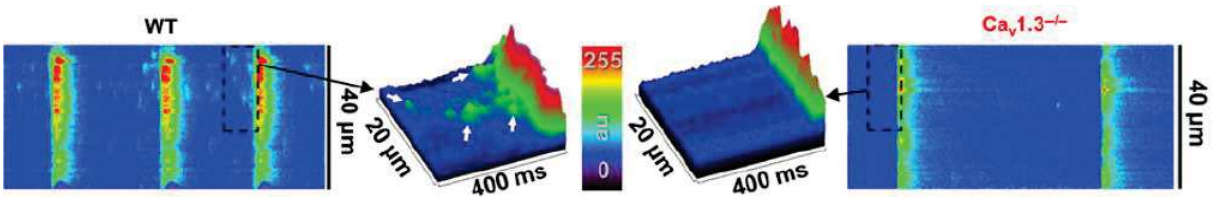


Figure 30 : Représentation en line-scan de la fluorescence calcique de cellules sinusales isolées de souris sauvages (WT) ou $Ca_v1.3$ KO ($Ca_v1.3^{-/-}$). Il y a une diminution et désynchronisation des LCRs (flèches blanches) chez les souris KO comparé aux souris WT. D'après *Torrente et al., 2016*.

Pour résumer, ces études sur l'interaction de $Ca_v1.3$ et RyR2 soulèvent une idée particulièrement intéressante sur le mécanisme de pacemaking. Bien que le nombre de LCRs soit diminué lorsque $Ca_v1.3$ est absent, la présence de libérations locales de Ca^{2+} **spontanées** est toujours observée (Figure 30). En revanche, ces LCRs sont désorganisés et désynchronisés durant la diastole (Torrente *et al*., 2016). De plus, une augmentation du nombre de LCRs (donc de $[Ca^{2+}]_i$) n'est pas forcément corrélée à une augmentation de la fréquence de dépolarisation lorsque les LCRs sont désynchronisés, c'est-à-dire espacés spatialement et temporellement (Neco *et al*., 2012). Ainsi, il semblerait qu'il ne suffit pas d'augmenter le $[Ca^{2+}]_i$ pour déclencher des dépolarisations spontanées mais qu'il faille également que cette augmentation soit **synchronisée** dans le temps et l'espace. En synchronisant les LCRs, $Ca_v1.3$ serait alors responsable du mécanisme pacemaker et serait un point central dans le couplage des deux horloges.

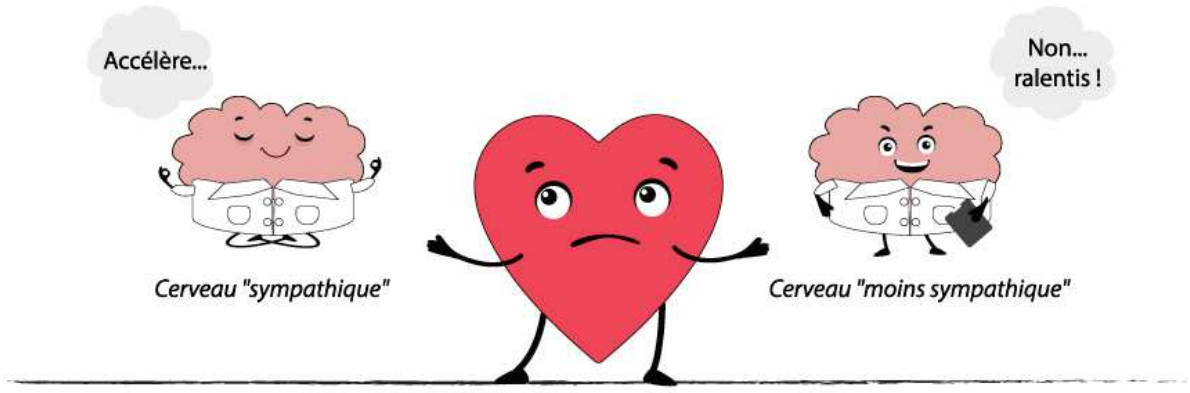
Ainsi, la génération de l'activité électrique cardiaque au sein des cellules du NSA résulte d'une interaction complexe entre l'activité de canaux ioniques membranaires d'une part, et la dynamique calcique intracellulaire d'autre part. L'inhibition ou le mauvais fonctionnement d'un des nombreux acteurs responsables du pacemaking perturbe l'équilibre délicat entre courants entrants et sortants et impacte la dépolarisation diastolique. On peut alors parler de découplage des deux horloges.

<u>Chapitre 3</u> : Régulation de l'automatisme cardiaque

« Le cœur qui prend la raison pour médecin doit s'attendre à être mis à la diète », Jean-Napoléon Vernier, *<u>Fables, pensées et poésies</u>*, 1865

Nous venons de voir dans le chapitre précédent que les raisons électriques du cœur étaient multiples, que plusieurs acteurs (canaux ioniques, dynamique calcique intracellulaire) étaient responsables d'une impulsion électrique spontanée. Cependant, si le cœur a ses raisons, ne serait-il pas possible d'influencer ses décisions ? Peut-on raisonner les raisons du cœur ? C'est le frère Laurent qui, en persuadant Juliette d'avaler une potion simulant sa mort, et par un mauvais concours de circonstances, précipite le suicide des deux amants. C'est l'empereur Palpatine (alias Dark Sidious) qui convainc Anakin Skywalker de rejoindre le côté obscur pour sauver Padmée. Pour l'âne de Shrek, toujours pas d'idées, mais il se peut que personne n'ait influencé sa décision de tomber amoureux d'un dragon, d'ailleurs, ne dit-on pas qu'on n'est jamais mieux servi que par soi-même ? Quoi qu'il en soit, après Blaise Pascal et Alexandre Dumas fils, c'est au tour de Jean-Napoléon Vernier de pressentir une **régulation de la fréquence cardiaque**. La raison, ou le **système nerveux**, est en effet capable de ralentir le **rythme cardiaque**, de le mettre à la diète en soi. Cependant, n'oublions pas que l'inverse est tout aussi possible, le rythme cardiaque peut être accéléré, et puisqu'on parle d'amour, ne serait-ce pas là la description d'un coup de foudre ?

Ce troisième chapitre vous dévoilera donc les médecins capables d'influencer le cœur, médecins prenant la forme de **neurotransmetteurs** et d'**hormones**.



Bien que le cœur soit doué d'automaticité, il est possible de réguler la fréquence cardiaque. Cette régulation passe majoritairement par le système nerveux autonome : la voie (ortho)-sympathique (tonus sympathique) accélère les battements cardiaques tandis que la voie parasympathique (tonus vagal) les ralentit, respectivement *via* l'action des neurotransmetteurs noradrénaline et acétylcholine. Le système hormonal est lui aussi capable de réguler le rythme cardiaque par la sécrétion d'hormones dans la circulation sanguine qui vont pouvoir agir sur des récepteurs cibles au niveau cardiaque.

La régulation de la fréquence cardiaque est un processus physiologique essentiel à notre survie. Notamment, le réflexe de « fuite ou combat » (« Fight or Flight response » en anglais), décrit pour la première fois par le physiologiste Walter Cannon dans les années 1920, permet de réagir rapidement face à une menace. Retrouvé dans la majorité du règne animal, il fait intervenir une décharge du système sympathique qui amorce les animaux (humains compris) à fuir un danger ou bien le combattre. Initié par l'activation de l'amygdale (centre de traitement de la peur dans le cerveau) à la vue d'une situation pouvant impacter la survie, il fait partie de la première étape de l'adaptation au stress. L'amygdale stimule l'hypothalamus qui sécrète l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans la circulation sanguine. Au niveau des glandes surrénales, l'ACTH stimule alors la sécrétion d'adrénaline dans le sang et cette décharge d'adrénaline déclenche l'adaptation au stress : inhibition du système digestif, dilatation des pupilles, tension des muscles et accélération de la fréquence cardiaque et de la respiration. En augmentant la fréquence cardiaque (chronotrope positif +), la vitesse de conduction de l'influx nerveux (dromotrope +), l'excitabilité cardiaque (bathmotrope +) et la force de contraction du myocarde (inotrope +), l'adrénaline permet d'accroître la vitesse de circulation sanguine et donc l'apport d'O_2 et de nutriments aux muscles. Dès que l'organisme est prêt, fuir ou combattre reste alors au choix de l'animal.

La fréquence de dépolarisation des cellules sinusales est donc finement régulée en fonction des conditions physiologiques.

III.1 Régulation par le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome est le déterminant majeur de la régulation cardiaque. C'est donc sans surprise qu'on retrouve une densité importante de fibres nerveuses au sein du NSA, que ce soit chez l'Homme, le chien ou la souris par exemple (Pauza *et al.*, 1999, 2000, 2014). Fait marquant, les terminaisons adrénergiques (sympathique) et cholinergiques (parasympathique) sont très proches les unes des autres, soulignant une régulation très fine du

NSA (Figure 31) (Pauza *et al.*, 2014). De plus, comparé au tissu atrial, le NSA est enrichi en récepteurs beta-adrénergiques à l'adrénaline et en récepteurs muscariniques à l'acétylcholine (Beau *et al.*, 1995).

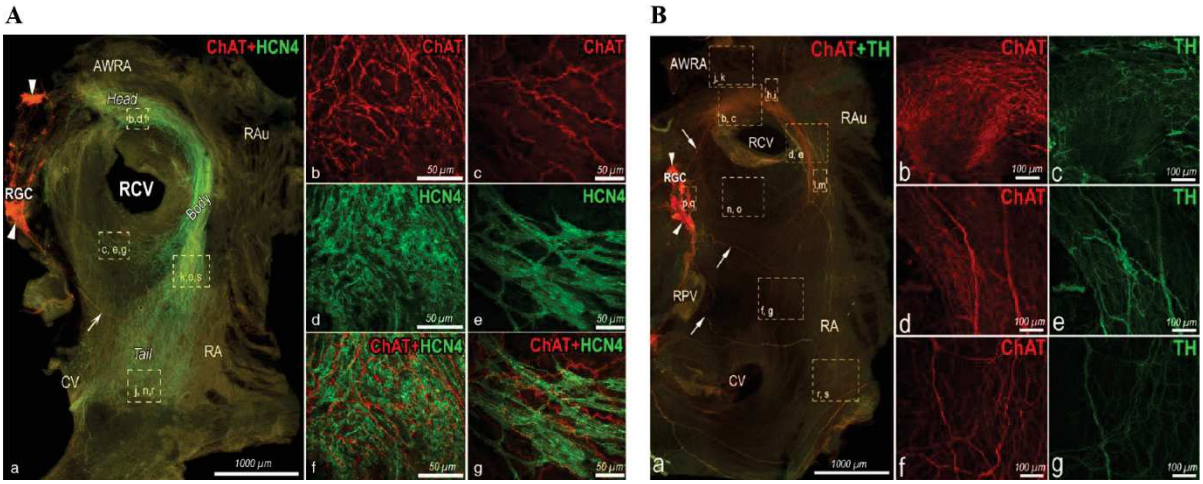


Figure 31 : (A) Immunomarquage de HCN4 (vert) et de la choline acétyltransférase (ChAT, rouge) montrant une innervation dense du NSA de souris et une proximité des fibres cholinergiques exprimant la ChAT et des cellules sinusales exprimant HCN4. (B) Immunomarquage de la ChAT (rouge) et de la tyrosine hydroxylase (TH, vert) montrant la proximité des fibres nerveuses sympathiques exprimant la TH et parasympathiques exprimant la ChAT au niveau du NSA de souris. D'après *Pauza et al., 2014*.

III.1.1 Régulation adrénergique

Les récepteurs beta-adrénergiques (β1 et 2) sur lesquels se fixent l'adrénaline et la noradrénaline sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G stimulatrice (Gs). Comme toutes les protéines G, la protéine Gs est composée de trois sous-unités (α, β et γ) et est liée au guanosine diphosphate (GDP) en condition basale. Lorsque l'adrénaline se fixe sur son récepteur, la protéine Gs est activée et échange le GDP avec du guanosine triphosphate (GTP), ce qui permet à la sous-unité α de se libérer du complexe et d'aller activer une adénylate cyclase (AC). Cette enzyme transforme alors l'ATP en AMPc qui est le messager secondaire principale de la régulation adrénergique. Ainsi, la stimulation adrénergique augmente *in fine* les taux d'AMPc intracellulaires (Figure 32).

Le premier acteur régulé par la stimulation adrénergique est le courant I_f. En effet, l'AMPc se fixe directement sur les canaux HCN au niveau du site de liaison CNBD, ce qui augmente la probabilité d'ouverture des canaux et donc déplace la courbe d'activation d'I_f et son seuil d'activation vers des potentiels plus dépolarisés (Brown *et al.*, 1979; DiFrancesco and Tortora, 1991; DiFrancesco *et al.,* 1986). En d'autres termes, les canaux HCN4 s'ouvrent à des

potentiels plus positifs lors de la repolarisation du PA et il y a plus de courant entrant lors de la partie linéaire de la DD. Dario DiFrancesco a en effet montré que de faibles doses d'isoprénaline (ISO, agoniste des récepteurs beta-adrénergiques) augmente le courant I_f ainsi que la pente de la partie linéaire de la DD, et par conséquent la fréquence de dépolarisation des cellules sinusales, et ce, sans changer la forme du PA (DiFrancesco, 1993). Cela semble indiquer un rôle prédominant d'I_f dans l'accélération de la fréquence pour un faible tonus sympathique.

L'AMPc est également un activateur de la PKA. Cette kinase, composée de 2 sous-unités catalytiques et de 2 sous-unités régulatrices inhibant les sous-unités catalytiques, est une sérine/thréonine kinase. Lorsque l'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices, cela entraîne un changement de conformation permettant la dissociation des 2 sous-unités catalytiques qui sont alors libres d'aller phosphoryler leurs substrats. Ainsi, la stimulation adrénergique, par l'intermédiaire de l'AMPc, augmente l'activité de la PKA.

Plusieurs acteurs de l'horloge membranaire et calcique sont des cibles de la voie de signalisation AMPc-PKA. Sous stimulation adrénergique, le courant $I_{Ca,L}$ augmente et son seuil d'activation est déplacé vers des potentiels plus hyperpolarisés (Zaza *et al.*, 1996). Sachant que $Ca_v1.3$ contribue à la DD (Mangoni *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002b), sa stimulation par la PKA entraîne donc une activation plus rapide et une contribution plus grande au courant entrant dépolarisant. Une récente étude a par ailleurs montré que cette augmentation de $I_{Ca,L}$ était dépendante de Rad, une petite protéine G. Rad inhibe les canaux Ca^{2+} de type L et sa phosphorylation par la PKA lève cette inhibition (Levitan *et al*., 2021).

Les RyRs sont eux aussi phosphorylés par la PKA, ce qui augmente l'amplitude et la fréquence d'apparition des LCRs, et, par conséquent, augmente le courant I_{NCX} lors de la DD (Vinogradova *et al.,* 2002). L'horloge calcique est également régulée par la stimulation adrénergique au niveau de la SERCA. La phosphorylation du phospholamban (PLB, protéine inhibitrice de la SERCA) par la PKA permet de lever son inhibition sur la SERCA, ce qui accélère la recapture du Ca^{2+} dans le RS (Simmerman *et al.*, 1986; Vinogradova *et al.*, 2006). Cette accélération de l'activité de la SERCA est essentielle pour maintenir une fréquence de dépolarisation élevée en diminuant rapidement le $[Ca^{2+}]_i$ entre chaque PA.

Ainsi, la stimulation adrénergique des cellules sinusales augmente les taux d'AMPc intracellulaires ce qui déclenche une cascade de phosphorylation des acteurs de l'horloge membranaire et calcique (Figure 32). Bien que je n'aie décrit que les principaux acteurs régulés

par la PKA, d'autres canaux peuvent également être impliqués dans l'accélération de la fréquence cardiaque par la stimulation adrénergique. Par exemple, le fait que les souris KO pour le canal chlore ClC-2 n'arrivent pas à atteindre la même fréquence cardiaque que des souris WT lors d'un effort montre que le courant $I_{Cl,ir}$ peut également être impliqué dans la régulation adrénergique.

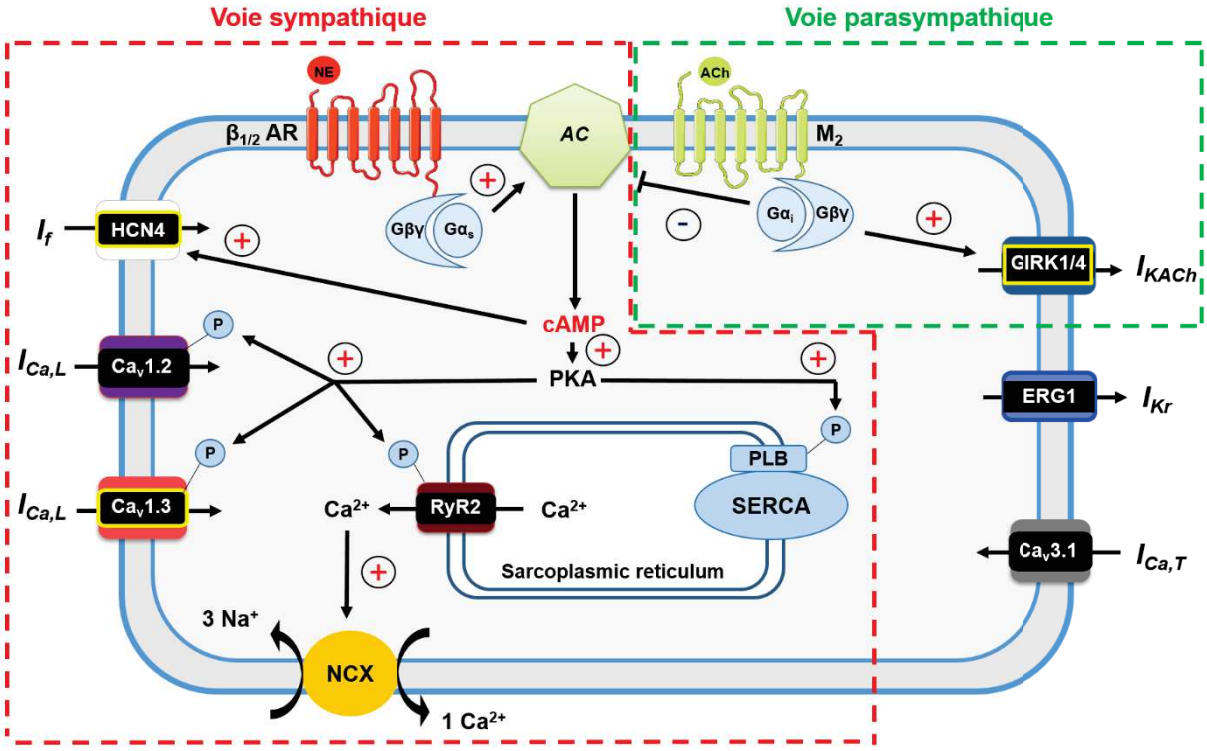


Figure 32 : Schéma des voies de signalisation du système nerveux autonome sympathique et parasympathique dans la cellule sinusale. L'activation des récepteurs beta-adrénergiques par la noradrénaline augmente les taux d'AMPc intracellulaires ce qui déclenche une cascade de phosphorylation des acteurs de l'horloge calcique et membranaire (voie sympathique, pointillés rouges). A l'inverse, l'activation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine diminue les taux d'APMc et active le courant I_{KACh} repolarisant (voie parasympathique, pointillés verts). Adapté de *Mangoni et Nargeot, 2008*.

De manière intéressante, cela fait maintenant trois ans que la stimulation adrénergique des cellules sinusales est étudiée en considérant des cellules pacemaker dîtes **dormantes**. En 2018, *Kim et al*. ont montré que la majorité des cellules sinusales isolées de cœur de cobaye étaient dormantes, c'est-à-dire sans activité électrique spontanée apparente (Kim *et al*., 2018). Or, il est possible de « **réveiller** » l'automatisme de ces cellules dormantes par stimulation adrénergique. C'est-à-dire que ces cellules, sans activité électrique spontanée, se mettent à avoir une activité spontanée lorsqu'elles sont exposées à de l'ISO. Outre le cobaye, ces cellules dormantes sont également retrouvées *in vitro* chez l'homme (Tsutsui *et al*., 2018), où la

stimulation adrénergique a le même effet, et *ex vivo* sur tissu NSA intact chez la souris (Bychkov *et al.,* 2020; Fenske *et al*., 2020). La présence de ces cellules dormantes sur tissu intact tend à montrer que ce ne sont pas des cellules « endommagées » par la dissociation enzymatique, comme pensé historiquement, et qu'elles pourraient avoir un rôle au sein du NSA en condition physiologique. Quant à savoir quel serait ce rôle, cela reste encore à être déterminé.

III.1.2 Régulation muscarinique

A l'inverse de la voie sympathique, le système nerveux parasympathique ralentit la fréquence cardiaque (chronotrope -), la vitesse de conduction de l'influx nerveux (dromotrope -), l'excitabilité cardiaque (bathmotrope -) et la force de contraction du cœur (inotrope -). La variabilité battement par battement de la fréquence cardiaque montre qu'elle est constamment sous l'influence de ces deux systèmes nerveux, ce qui permet de garder un rythme sinusal dans une gamme de fréquence physiologique. Il existe cependant des moments où le système parasympathique peut prendre le pas sur le système sympathique. C'est notamment le cas lors du sommeil où la fréquence cardiaque peut chuter jusqu'à 40-50 battements par minute (bpm) chez l'Homme (comparé à 70-80 bpm en condition normale la journée). La suractivité du système nerveux parasympathique peut également provoquer un malaise vagal. C'est-à-dire que le cumul du ralentissement du cœur et de la dilatation des vaisseaux sanguins entraîne une chute de pression artérielle. Le cerveau n'est alors plus assez irrigué et la diminution d'apport en O_2 conduit tout naturellement à une perte de conscience.

Au niveau des cellules sinusales, l'acétylcholine se fixe sur son récepteur muscarinique M2 qui est également un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Au contraire des récepteurs β1, le récepteur M2 est couplé à une protéine G inhibitrice (Gi) qui, une fois activée, inhibe l'adénylate cyclase, ce qui entraîne *in fine* une diminution des taux d'AMPc intracellulaires et donc une diminution des niveaux de phosphorylation des cibles de la PKA (Figure 32). La voie parasympathique a donc exactement l'effet inverse de la voie sympathique. En diminuant les taux de phosphorylations des LTCC, de RyR2 et du PLB, il y a une diminution du courant $I_{Ca,L}$ et un déplacement de sa courbe d'activation vers des potentiels plus dépolarisés, une diminution de l'amplitude et de la fréquence des LCRs et une diminution de la vitesse de recapture du Ca^{2+} par la SERCA (Lyashkov *et al.*, 2009; Van Borren *et al.*, 2010). Sans compter que la diminution des taux d'AMPc intracellulaires diminue le courant I_f et déplace son seuil d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés (DiFrancesco and Tromba, 1988).

Cependant, en plus de diminuer la contribution des courants entrants lors de la DD, la stimulation cholinergique stimule un courant opposé repolarisant : I_{KACh}. En effet, lorsque l'acétylcholine se fixe sur son récepteur, les sous-unités β et γ de la Gi peuvent stimuler les canaux potassiques GIRK1/4 (Figure 32) (Krapivinsky *et al.*, 1995). Ainsi, en diminuant les courants entrants et en stimulant un courant sortant repolarisant I_{KACh}, la stimulation cholinergique perturbe l'équilibre des courants, il faut donc une plus forte contribution de courants entrants pour atteindre le seuil du PA. Il en résulte alors une diminution de la vitesse de la DD et un ralentissement de la fréquence cardiaque.

De manière intéressante, tout comme I_f semble être le déterminant majeur dans l'accélération de la fréquence cardiaque pour un faible tonus sympathique (voir le chapitre précédent sur la régulation adrénergique), il le serait également pour un faible tonus parasympathique. En effet, de très faibles doses (nanomolaires) d'acétylcholine inhibe le courant I_f tandis qu'une concentration 20 fois supérieure d'acétylcholine est requise pour activer le courant I_{KACh} (DiFrancesco *et al.*, 1989). Ceci s'explique par le fait que la régulation d'I_f directement par l'AMPc est en amont des phosphorylations de la PKA. Pour un faible tonus sympathique et parasympathique, jouer sur les niveau d'AMPc et le déplacement de la courbe d'activation d'I_f suffit à accélérer ou freiner la fréquence cardiaque. Cependant, lorsqu'il y besoin d'accélérer ou ralentir fortement le rythme cardiaque, les phosphorylations dépendantes de la PKA et le courant I_{KACh} rentrent en jeu.

III.2 Régulation par le système hormonal

Bien que la fréquence cardiaque soit majoritairement régulée par le système nerveux autonome, le système hormonal peut également l'influencer dans certaines conditions physiologiques. L'hormone peptidique angiotensine II, impliquée dans le système rénine-angiotensine-aldostérone permettant d'augmenter la pression artérielle, diminue la fréquence de dépolarisation de cellules sinusales isolées de lapin (Habuchi *et al.*, 1995). De manière intéressante, cette diminution de la fréquence passe par une inhibition du courant $I_{Ca,L}$ et les mêmes résultats sont retrouvés chez le cobaye (Sheng *et al.*, 2011). Au contraire, la relaxine, hormone peptidique du système reproducteur, augmente la fréquence des cellules sinusales isolées de lapin par augmentation du courant $I_{Ca,L}$ (Han *et al.*, 1994).

Chez les femmes enceintes, la grossesse entraîne un nombre conséquent de changements physiologiques principalement induits par l'augmentation de la sécrétion d'hormones sexuelles telles que les œstrogènes et la progestérone. Notamment, une augmentation de l'activité du

système cardiovasculaire est requise pour le développement du fœtus, et cela passe par une augmentation de la fréquence cardiaque (Hunter and Robson, 1992). Une équipe canadienne a montré que des souris gestantes ont bien un rythme cardiaque plus élevé et que cela était dû à une augmentation du courant $I_{Ca,L}$ par les œstrogènes (Figure 33) (El Khoury *et al*., 2018). Plus précisément, l'augmentation de la fréquence cardiaque lors de la grossesse est corrélée à une augmentation de l'expression de **Ca_v1.3** et **RyR2**, tandis que les taux d'ARNm de Ca_v1.2, Ca_v3.1, NCX1, SERCA2 et PLB restent inchangés (Figure 33). Après l'accouchement, la sécrétion d'œstrogènes chute tandis que la fréquence cardiaque diminue, ce qui est corrélée à une diminution du courant $I_{Ca,L}$ et une diminution de l'expression de Ca_v1.3 et RyR2 (El Khoury *et al*., 2018).

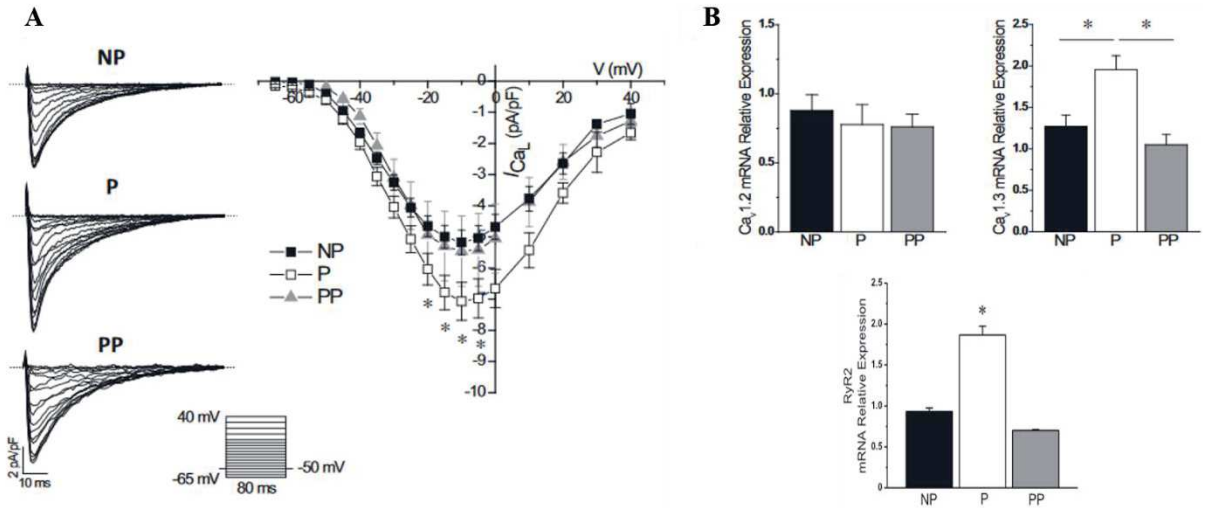


Figure 33 : (A) Tracés exemples de courant $I_{Ca,L}$ et courbes IV correspondantes dans des cellules sinusales isolées de souris non-gestante (NP), gestantes (P) et après mise-bas (PP). Le courant $I_{Ca,L}$ est augmenté lors de la gestation et revient à un niveau basal après mise-bas. (B) Expression relative des ARNm de Ca_v1.2, Ca_v1.3 et RyR2 dans un tissu NSA entier issu de souris non-gestantes, gestantes ou après mise-bas. D'après *El Khoury et al, 2018*.

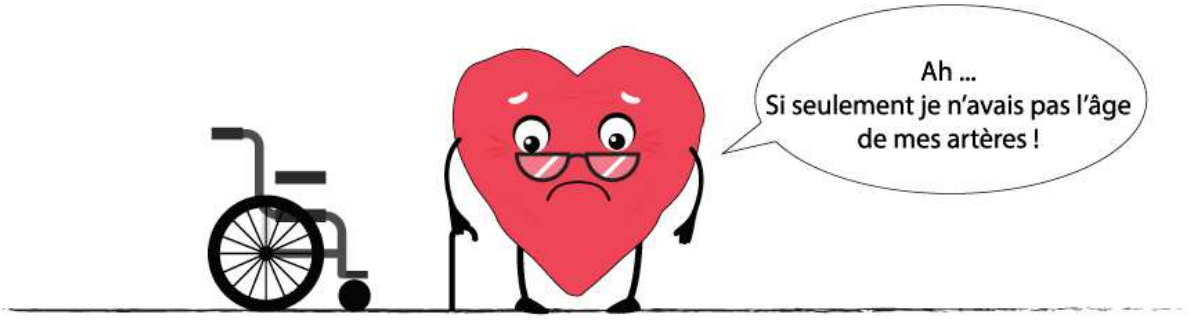
Il est intéressant de constater que la majorité des actions de ces hormones sur la fréquence cardiaque passe par une régulation du courant $I_{Ca,L}$. On retrouve notamment encore une fois le lien étroit entre Ca_v1.3 et RyR2, ou, en d'autres termes, entre **Ca_v1.3 et les relargages spontanés de Ca^{2+} par RyR2** (El Khoury *et al.*, 2018). Ceci étant dit, la régulation hormonale de la fréquence cardiaque ne joue pas toujours sur le courant $I_{Ca,L}$. Par exemple, l'hormone thyroïdienne T3 augmente la densité du courant I_f dans des cellules sinusales isolées de lapin, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la fréquence cardiaque lors d'hyperthyroïdie (Renaudon *et al.,* 2000). D'autres hormones et neurohormones peuvent également influencer la fréquence cardiaque et sont décrites dans une récente revue (MacDonald *et al.*, 2020).

Chapitre 4 : Pathologies associées au dysfonctionnement du NSA

« On a peut-être l'âge de ses artères mais le cœur n'a pas d'âge », Stephen King, *La ligne verte*, 1996

Nous venons de voir dans les chapitres précédents que, bien que le cœur possède ses propres raisons électriques dues à l'activité de canaux ioniques et un mouvement d'ions, il est possible de les influencer. Cependant, si le cœur a ses raisons, sont-elles pour autant les meilleures ? Peut-il y avoir de mauvaises raisons ? Le suicide de Roméo et Juliette par amour semble en effet un peu extrême, d'autant plus que si Roméo n'avait pas été aussi impulsif il aurait vu que Juliette n'était pas réellement morte. Le massacre des jeunes padawan par Anakin Skywalker pour gagner plus de puissance et sauver Padmée semble également une mauvaise raison, d'autant plus que ce geste l'éloigne à jamais de l'amour de Padmée. Pour l'âne de Shrek, il serait enfin temps de le laisser tranquille, il a le doit d'aimer qui il veut ! Quoi qu'il en soit, si Blaise Pascal, Alexandre Dumas fils et Jean-Napoléon Vernier ont décrit avec leurs mots des propriétés cardiaques, Stephen King, lui, se fourvoie. Pour jolie qu'elle soit d'un point de vue sentimental, d'un point de vue biologique, sa citation est fausse. Le cœur a également l'âge de ses artères, et **l'âge**, malheureusement, conduit le cœur à avoir de **mauvaises raisons**. Le cœur, comme tout autre organe, peut en effet être **malade** et moins **bien fonctionner**.

Ce dernier chapitre vous listera donc quelques mauvaises raisons du cœur, mauvaises raisons qui sont en réalité des **dysfonctionnements des acteurs ioniques**.



Lorsqu'on y pense, le boulot du cœur n'est pas des plus faciles. Organe essentiel à la survie, il n'a pas le droit à la moindre erreur car toute erreur peut potentiellement être fatale. Si on considère que la durée de vie d'un être humain est aux alentours de 70 ans, il faudrait que le cœur soit capable de battre sans jamais s'arrêter pendant tout ce temps, et si possible sans louper un seul battement ! En effet, qui dit arythmie dit contraction cardiaque chaotique, et qui dit contraction cardiaque chaotique dit diminution de l'apport sanguin aux autres organes. Malheureusement le cœur, et plus particulièrement le sinus, peut dysfonctionner, que ce soit dû à des mutations génétiques, des accidents vasculaires ou même lié à l'âge.

IV.1 Quand le sinus est malade : Sick Sinus Syndrome

Le « *Sick Sinus Syndrome* » (SSS), pouvant être traduit par le syndrome du sinus malade, a été décrit pour la première fois en 1967 par B. Lown (Lown, 1967). Il s'agit d'un dysfonctionnement du NSA qui entraîne un trouble de génération du rythme cardiaque et des défauts de conduction du signal électrique. Il se caractérise par une activité atriale chaotique, un changement de forme de l'onde P, une bradycardie entrecoupée de multiples et récurrents battements ectopiques et des épisodes de tachycardie. Ces dysfonctionnements du NSA entraînent alors fatigue, étourdissements et syncopes pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque (Anderson and Benson, 2010). En général, ce phénotype pathologique de dysfonctionnement du NSA n'est qu'une conséquence de plusieurs dysfonctionnements cardiaques et le SSS est souvent secondaire à d'autres pathologies cardiaques (Figure 34) (Monfredi and Boyett, 2015).

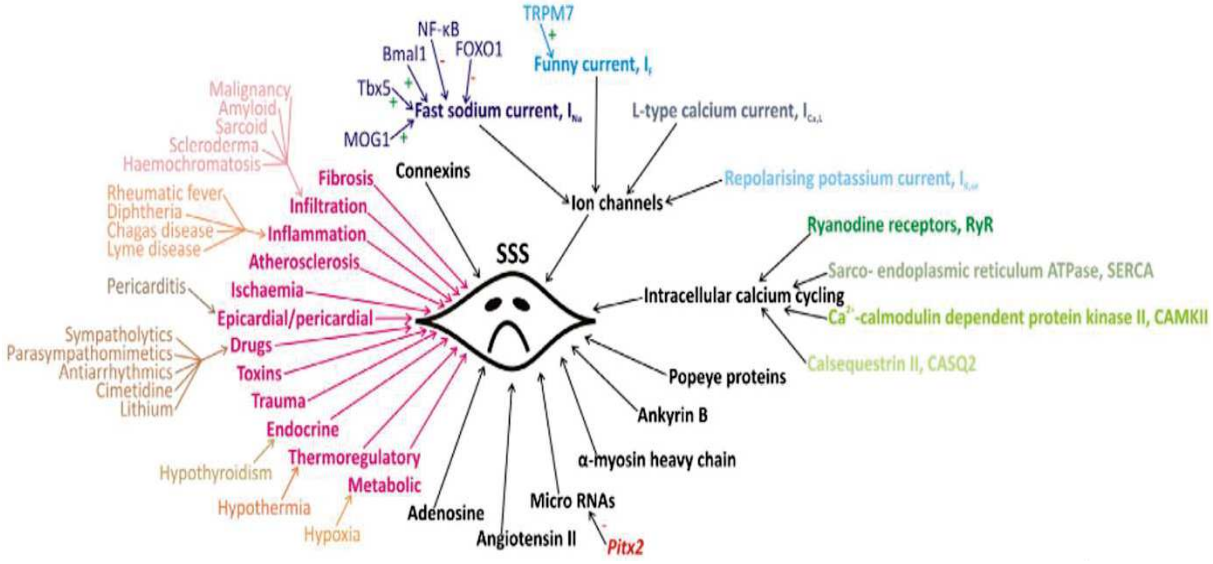


Figure 34 : Les différentes causes du SSS. D'après *Monfredi et al, 2015*.

Si le SSS est plus fréquemment d'origine acquise (vieillissement, infarctus, chirurgies cardiaques), il peut également être d'origine congénitale et lié à des canalopathies (pathologies associées à une dysfonction d'un canal ionique). Des mutations affectant les acteurs de l'horloge membranaire et calcique sont en effet responsables de dysfonctionnement de l'activité du NSA. Notamment, une mutation des canaux HCN4 a été découverte chez un patient atteint de SSS, sans réelle surprise étant donné l'importance du courant I_f dans le pacemaking, (Schulze-Bahr *et al.*, 2003). La délétion d'une paire de base entraîne une protéine tronquée au niveau C-terminale et une absence du domaine CNBD qui sont corrélées à une bradycardie et à une insensibilité du courant I_f résultant à la stimulation adrénergique (Alig *et al*., 2009). Une mutation perte de fonction de $Ca_v1.3$ est également responsable de dysfonctionnements du NSA chez deux familles de patients présentant une surdité associée à des troubles du rythme cardiaque (Baig *et al.,* 2011). Des mutations perte de fonction ou altérant les propriétés biophysiques du canal sodique $Na_v1.5$ ont, elles aussi, été reliées à des formes congénitales de SSS (Benson *et al.*, 2003). En somme, plus un canal est important dans la génération de l'activité électrique spontanée des cellules sinusales, plus il y a de risques qu'une mutation entraîne une dysfonction du NSA.

IV.2 Quand le sinus a soif : ischémie

Comme dit précédemment, le SSS est principalement d'origine acquise et peut se déclarer après des épisodes d'ischémie. Au niveau du NSA, l'apport en O_2 et nutriments se fait *via* l'artère du nœud sinusal qui a pour origine l'artère coronaire droite (60% des cas) ou l'artère coronaire gauche (40%) (Hadziselimović, 1978). Or, il a été montré qu'une sténose de l'artère du NSA entraîne une dysfonction du NSA qui est réversible après pose d'un stent pour rétablir une irrigation optimale du NSA (Kumar *et al*., 2018). Bien que les mécanismes conduisant à une dysfonction du NSA après ischémie ne soient pas connus, plusieurs études montrent des changements dans les différentes conductances ioniques. En perfusant des cellules sinusales isolées de lapin avec une solution physiologique censée reproduire des conditions d'ischémie (sans glucose et à pH acide 6,6), Gryshchenko *et al*., (2002) ont observé un ralentissement de la fréquence de dépolarisation des cellules. De plus, ils observent l'augmentation d'un courant net entrant qui peut être attribué à une diminution du courant I_{KACh}. Une seconde étude montre que l'ischémie induit une diminution des courants $I_{Ca,T}$ et I_{NCX} tandis que le courant $I_{Ca,L}$ est augmenté (Du and Nathan, 2007). Ainsi, les épisodes d'ischémie, en altérant les acteurs responsables du pacemaking, peuvent induire un phénotype de SSS.

IV.3 Quand le sinus est vieux

L'une des causes majeures du dysfonctionnement du NSA reste le temps. Le cœur est un muscle qui n'a le droit à aucun repos, sauf que, à l'instar de n'importe quel muscle, il se fatigue inexorablement avec le temps. Il est notamment observé un déclin de la fréquence cardiaque moyenne chez les mammifères qui est lié au vieillissement et qui ne dépend ni du genre, ni de la forme physique, ni du régime alimentaire (Peters *et al.*, 2020; Robinson, 1938; Tanaka *et al.*, 1997, 2001). Ce ralentissement de la fréquence cardiaque lié à l'âge est dû en parti à un ralentissement de la fréquence de dépolarisation des cellules sinusales (Alings and Bouman, 1993; Larson *et al*., 2013; Liu *et al*., 2014). Notamment, le PA des cellules sinusales présente une MDP hyperpolarisée, une diminution de la vitesse de dépolarisation diastolique linéaire et une durée de PA prolongée avec le vieillissement (Larson et al., 2013; Liu et al., 2014).

Les effets du vieillissement sur la MDP, la DD et la durée du PA pointent tout naturellement vers un rôle des canaux ioniques dans la bradycardie associée à l'âge. En effet, chez la souris, la dépendance au voltage du courant I_f est déplacée vers des potentiels plus hyperpolarisés avec l'âge, ce qui conduit à une diminution du courant lors de la DD (Larson et al., 2013). De plus, ce changement de dépendance au voltage semble dû à une altération des canaux HCN4 et non à une diminution des taux d'AMPc intracellulaires (Sharpe *et al.*, 2017). Toujours chez la souris, une diminution des courants $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$ a été observée chez des souris âgées, ce qui diminue le courant net entrant lors de la DD et diminue indirectement I_{NCX} dans le sens entrant en réduisant le phénomène de CICR (Larson *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'expression des acteurs de l'horloge calcique (RyR2, SERCA2A , NCX1) est également diminuée chez les souris âgées, ce qui coïncide avec une réduction de l'amplitude, de la taille et du nombre de LCRs (Liu *et al*., 2014). Outre ces réductions des courants, l'âge provoque une diminution de la réponse à la stimulation adrénergique et muscarinique (Fleg et al., 1994; Liu et al., 2014; Stratton et al., 1992). Ainsi, le vieillissement entraîne un remodelage de l'activité des canaux ioniques ce qui explique en partie la bradycardie associée à l'âge (Figure 35) (Peters *et al*., 2020).

En plus de ces altérations des courants ioniques dues à l'âge, le vieillissement induit des changements structuraux du NSA. Notamment, il y a une augmentation de tissu fibreux au niveau du NSA qui est associée à un ralentissement de la conduction de l'influx électrique (Figure 35) (Inoue *et al*., 1986; Shiraishi *et al.,* 1992). A cela s'ajoute une diminution du volume

du NSA, une hypertrophie des cellules sinusales et une réduction de leur nombre. Or un nombre réduit de cellules sinusales peut être corrélé à un ralentissement de la fréquence cardiaque (Swaminathan *et al*., 2011).

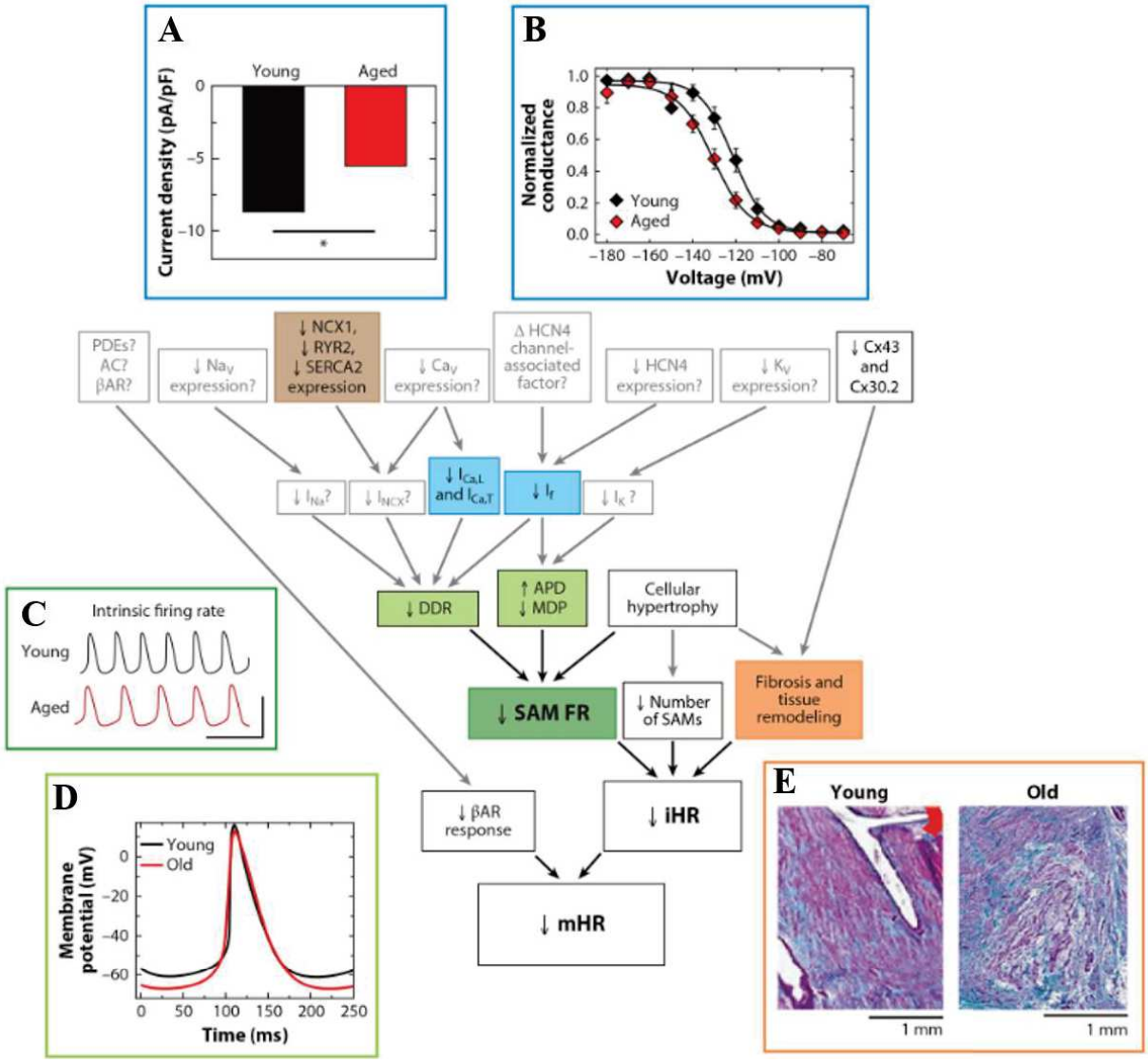


Figure 35 : Mécanismes conduisant à la bradycardie associée au vieillissement. Les encadrés et flèches noirs ainsi que les encadrés de couleurs représentent les mécanismes connus tandis que les encadrés et flèches gris représentent les mécanismes hypothétiques. (A) Réduction de la densité du courant $I_{Ca,L}$ chez les souris âgées. (B) Déplacement de la courbe d'activation du courant I_f chez les souris âgées. (C) Diminution de la fréquence des PAs chez les souris âgées. (D) Hyperpolarisation de la MDP et diminution de la DD chez les souris âgées. (E) Coupe de NSA d'un cœur humain âgé montrant une augmentation de la fibrose comparée à un cœur humain jeune. D'après *Peters et al, 2020*.

Les dysfonctions du NSA sont la cause majeure de l'implantation de plus de 500 000 pacemakers électroniques permanents en Europe et aux Etats-Unis (Kusumoto *et al.*, 2019). Avec le vieillissement de la population on peut s'attendre à une augmentation de l'incidence du SSS et donc une augmentation du nombre d'implantation de pacemaker. La compréhension des mécanismes responsables de la génération de l'impulsion électrique au niveau du NSA devient donc un enjeu de santé publique. L'identification des acteurs responsables de l'automaticité cardiaque pourrait alors permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Matériel et méthodes

Modèles animaux

Cette étude et les protocoles associés ont reçu l'approbation du Ministère français de l'Agriculture (D34-172-13, protocole n° 2017010310594939) et ont été conformes au Guide de protection et d'utilisation des animaux en laboratoire publié par le National Institutes of Health (NIH, 8ème édition, 2011) et aux directives européennes (2010/63/EU).

Tous nos modèles murins ont été élevés sur le plateau central d'élevage et d'archivage (PCEA) de Montpellier et le plateau *iExplore* de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) à Montpellier. Les souris sont soumises à une température constante (21-22°C) ainsi qu'à un cycle d'obscurité/lumière imposé de 24h (12h lumière, 12h obscurité) censé reproduire les conditions naturelles de luminosité (car il est bien connu que les souris vivent au niveau de l'équateur !). Elles ont également eu un accès constant à l'eau et la nourriture, encore heureux.

Les souris sauvages ou « wild-type » WT nous ont été fournies par Janvier Labs et Charles River. Les souris $Ca_v1.2$ $DHP^{-/-}$ ont été générées par l'équipe du professeur Jörg Striessnig en 2004 par mutation ponctuelle de la sous-unité α1 (T1066Y) de $Ca_v1.2$, rendant le canal insensible aux DHP tout en préservant son expression et sa fonction basale (Sinnegger-Brauns *et al*., 2004). Toujours dans la même équipe, les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ ont été générées en 2000 par troncation de la protéine $Ca_v1.3$ avant le premier segment transmembranaire (Platzer *et al*., 2000).

Pour cette étude, des souris âgées de 8 à 16 semaines mâle et femelle ont été utilisées indifféremment car je suis pour l'égalité des sexes.

Enregistrement en patch-clamp sur cellule sinusale isolée

Prélèvement du cœur

Toutes les règles d'éthique, de morale et d'abstraction émotionnelle devant tant de mignonitude ont été respectées durant cette procédure, une injection intrapéritonéale ayant été la seule atteinte physique sur l'animal conscient.

Les souris sont anesthésiées avec une injection intrapéritonéale de 0,3 mL d'une solution de 100 $mg.kg^{-1}$ Ketamine (Imalgène® 500, Mérial, Bourgelat, France) et 10 $mg.kg^{-1}$ Xylazine (Rompun® 2%, Bayer AG, Leverkusen, Allemagne). Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de coagulation et de formation de caillot sanguin pendant le prélèvement, 0,5 mL d'Héparine (1000 $U.I.mL^{-1}$, Choay®, Sanofi-Aventis, France) sont également injecté une fois l'animal inconscient. Finalement, les souris sont euthanasiées par une dernière injection de 0,3 mL d'une solution de 6 $mg.mL^{-1}$ de pentobarbital sodique (Euthasol vet – TVM).

La souris est ensuite placée sur le dos, ses 4 membres écartés et fixés sur le support de dissection afin d'avoir un accès idéal au thorax. Environ 5 minutes après injection de l'Euthasol, si, et seulement si, la souris ne présente aucun réflexe végétatif (retrait de la patte lors d'un pincement), la peau du thorax est incisée du bas du sternum jusqu'en haut de la cage thoracique. L'accès au cœur est obtenu en soulevant la cage thoracique après avoir sectionné les côtes par les extrémités extérieures. Une fois le cœur apparent, une solution de Tyrode hépariné (1/100) et chauffé à 37°C est déversée dans la cavité thoracique pour éviter d'exposer le cœur à l'air libre (**solution de Tyrode** : 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 5,5 mM D-glucose, 1,8 mM $CaCl_2$, ajusté au pH 7,4 avec du NaOH). Le cœur est alors extrait rapidement en sectionnant dans un premier temps la veine cave inférieure puis la veine cave supérieure, l'aorte, l'artère pulmonaire et les veines pulmonaires le plus loin possible du cœur. Une fois retiré, le cœur est immergé dans la solution de Tyrode hépariné et chauffé dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert de Sylgard.

Dissection du nœud sinusal

Le cœur de souris mesurant environ 1 cm, la dissection se pratique sous loupe binoculaire. Les ventricules sont épinglés au fond de la boîte de manière à ce que la face dorsale soit visible permettant de faire une première incision entre les oreillettes et les ventricules au niveau de l'artère coronaire. Une perfusion de Tyrode hépariné et chauffé est alors réalisée à même cette ouverture pour rincer les ventricules, oreillettes et coronaires du sang restant. Puis les oreillettes sont séparées des ventricules en prenant soin de ne pas les sectionner. Le tissu auriculaire obtenu est ensuite transféré dans une autre boîte de Pétri remplie de solution de Tyrode contenant de l'héparine afin de nettoyer et d'y voir plus clair.

Le tissu auriculaire, ressemblant vaguement à un papillon battant des ailes, non pour voler mais pour nager (ne pas sous-estimer la force de contraction des oreillettes qui est capable de le propulser dans le liquide), est épinglé pour enfin l'immobiliser de telle sorte que la face endocardique soit visible. Les veines caves supérieures et inférieures sont incisées dans leur longueur révélant alors totalement le tissu sinusal. Celui-ci se distingue entre la *crista terminalis*, le septum interauriculaire, et les deux veines caves au maximum de grossissement par un « fourmillement », l'activité des cellules sinusales étant telle qu'on a l'impression de voir des fourmis s'agiter. Le tissu donne également une impression de transparence par sa finesse. Une fois identifié, le tissu sinusal est alors découpé suivant le tracé en pointillés rouges représenté sur la figure (Figure 36).

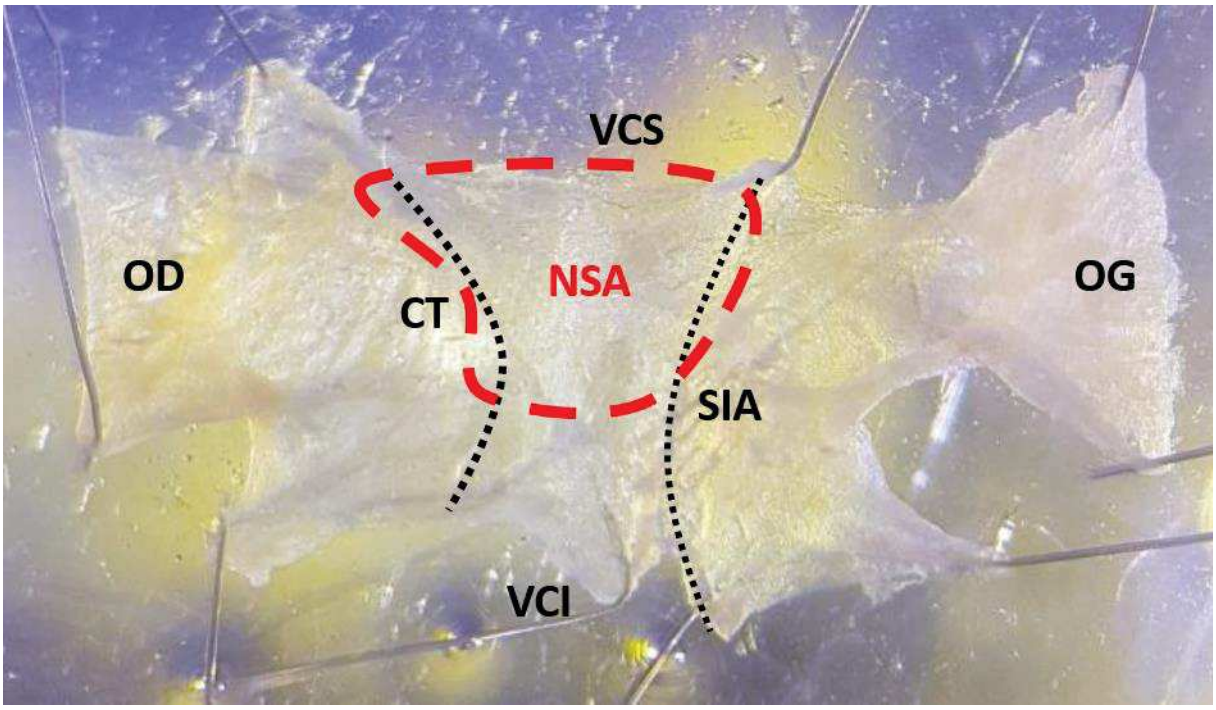


Figure 36 : Photo d'une préparation d'oreillettes de souris avec vue sur la face endocardique. OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VCS : veine cave supérieure, VCI : veine cave inférieure, CT : *crista terminalis* représentée en pointillés noirs, SIA : septum interauriculaire représenté en pointillés noirs.

Dissociation enzymatique et mécanique des cellules sinusales

La dissociation des cellules du NSA est adaptée de la méthode d'isolement des cellules sinusales de souris publiée pour la première fois en 2001 par notre équipe (Mangoni and Nargeot, 2001) et de celle de l'équipe du professeur Catherine Proenza (Sharpe *et al.*, 2016).

Le tissu isolé est transféré dans 2 premiers tubes en verre contenant une solution faible en calcium (« **low calcium** » comprenant (en mM) : 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 $MgCl_2$, 1,2 KH_2PO_4, 5 HEPES, 50 Taurine, 1 $mg.mL^{-1}$ BSA, 1 $mg.mL^{-1}$ D-glucose, ajusté au pH 6,9 avec du NaOH) pendant 2,5 minutes dans chaque tube . La faible concentration en calcium permet de préserver l'activité électrique des cellules en la stoppant ainsi que d'affaiblir les jonctions intercellulaires dépendantes du calcium. Le NSA est alors transféré dans un dernier tube de « low calcium » dans lequel ont été ajoutés de l'Elastase lyophilisée (0,5 $mg.mL^{-1}$, Worthington, Lakewood, USA) et de la Libérase-TH (0,15 $mg.mL^{-1}$, Roche Diagnostics®, Mannheim, Allemagne).

Cette première digestion enzymatique est critique car il faut trouver le bon compromis de temps de digestion pour que le tissu ne soit pas ni trop peu, ni trop digéré. Un tissu trop peu digéré donne un faible rendement de cellules, celles-ci étant de plus difficiles à utiliser en patch-clamp car leur membrane contient encore trop de fibres de collagène. Un tissu trop digéré donne

également un faible rendement de cellules, celles-ci étant cette fois trop fragiles et ayant tendance à mourir facilement à la moindre contrainte. Il faut donc trouver le bon temps de digestion pour obtenir un rendement optimal de cellules assez résistantes pour être utilisées en patch-clamp. Ce bon temps de digestion oscille généralement entre 20 et 25 minutes, dépendant de la taille du NSA et de la proportion en fibre de collagène qui augmente avec l'âge de la souris. Lorsque le tissu est assez digéré, il prend un aspect que l'on pourrait qualifier de vaporeux, ce qui aide à visuellement évaluer sa digestion.

Suite à cette digestion enzymatique, le tissu est successivement transféré dans 4 tubes (3 x 2 minutes et 5 minutes pour le dernier tube) contenant une solution « **Kraftbrühe** » (**KB**) comprenant (en mM) : 100 K-glutamate, 10 K-aspartate, 25 KCl, 10 KH_2PO_4, 2 $MgSO_4$, 20 Taurine, 5 Créatine, 0,5 EGTA, 20 D-glucose, 5 HEPES, 0,1% BSA, ajusté au pH 7,2 avec du KOH. Ces rinçages successifs permettant de stopper la digestion enzymatique sont suivis d'une digestion mécanique du tissu par une agitation lente et précautionneuse. Pour cela une pipette pasteur en verre, dont la pointe a été préalablement coupée puis rodée, et surmontée d'une poire à pipeter manuelle, est utilisée pour lentement aspirer et relâcher le tissu, les différents passages par le bout de la pipette permettant alors la dissociation du tissu. Il est important d'être minutieux lors de cette phase pour ne pas créer de bulles dans le bain des cellules, ce qui a généralement pour effet de détruire ces dernières.

La dernière étape de la dissociation des cellules sinusales est la réadaptation calcique. Cette étape cruciale et essentielle permet de réintroduire progressivement le calcium dans le bain des cellules afin de stabiliser la préparation cellulaire et de recréer un environnement physiologique idéal aux cellules sinusales. Pour cela deux solutions sont utilisées : une solution de réadaptation (10 mM NaCl, 1.8 mM $CaCl_2$) suivie d'une solution tampon de Tyrode/BSA (1 $mg.mL^{-1}$) selon le protocole suivant :

- 35, puis 40, 80, et 80 µL de la solution de réadaptation

- 200, puis 200, 625, et 625 µL de la solution de Tyrode/BSA

Chaque ajout de solution est réalisé à un intervalle de temps de 7 minutes ce qui permet aux cellules de s'habituer progressivement à la remontée calcique. Si celle-ci est trop rapide, les cellules ne sont pas capables de supporter cette charge calcique et meurent.

Suite à la réadaptation calcique, les cellules sont déposées sur des boîtes à fond en verre après 1h d'incubation à température ambiante. Avant le début de l'expérimentation, 20 minutes minimum sont nécessaires pour que les cellules adhèrent au fond de la boîte.

Acquisition de l'activité électrique en patch-clamp

La technique du patch-clamp inventée par Erwin Neher et Bert Sakmann et publiée pour la première fois en 1976 dans la revue *Nature* a révolutionné l'électrophysiologie en permettant d'enregistrer l'activité d'un canal ionique à l'échelle unitaire (Neher and Sakmann, 1976). A la différence des précédentes techniques d'électrophysiologie telle que la technique de double microélectrodes, l'accès électrique à la cellule ne se fait pas en la perforant avec l'électrode mais en accolant une pipette en verre contenant l'électrode à la membrane de la cellule. Une pression négative à l'intérieur de la pipette permet ensuite de créer un contact quasiment imperméable avec un morceau de membrane appelé le patch (gigaseal : résistance > 1 GΩ). Cela donne lieu à 4 configurations de patch-clamp possibles : configuration cellule entière, cellule attachée, patch excisé en « inside-out » ou « outside-out » (Figure 37). Les 3 dernières permettent d'enregistrer des courants unitaires tandis que la configuration cellule entière permet d'enregistrer des courants macroscopiques et de suivre l'évolution du potentiel membranaire de la cellule entière. Pour cette étude, j'ai utilisé une 5ème configuration adaptée de la configuration cellule entière : **le patch perforé**. Celle-ci consiste à utiliser un agent perforant (ici la saponine β-escin) qui crée des trous dans le patch membranaire donnant ainsi un accès électrique à la cellule sans rupture du patch et donc sans dialyse du milieu intracellulaire avec le milieu intra-pipette (Figure 37).

Cette partie n'ayant pas pour vocation de détailler entièrement la technique du patch-clamp, je ne m'étendrai pas plus sur le sujet. Pour plus de détails, vous pouvez regarder la revue sur les différentes techniques de patch-clamp par E. Neher et B. Sakmann (Sakmann and Neher, 1984).

Les pipettes ont été étirées avec une étireuse horizontale (DMZ-universal puller, Zeitz-Instrument, Munich, Allemagne) à partir de capillaires en verre en borosilicate avec filament (Sutter instrument CO., USA) de manière à obtenir des pipettes ayant une résistance de 3 à 5 MΩ. Elles ont été ensuite remplies avec du milieu intracellulaire comprenant (en mM) : 80 K-

aspartate, 50 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 5 EGTA, 5 HEPES, 3 ATP-Na, ajusté au pH 7,2 avec du KOH et additionné de 30 µM β-escin (Sigma-Aldrich).

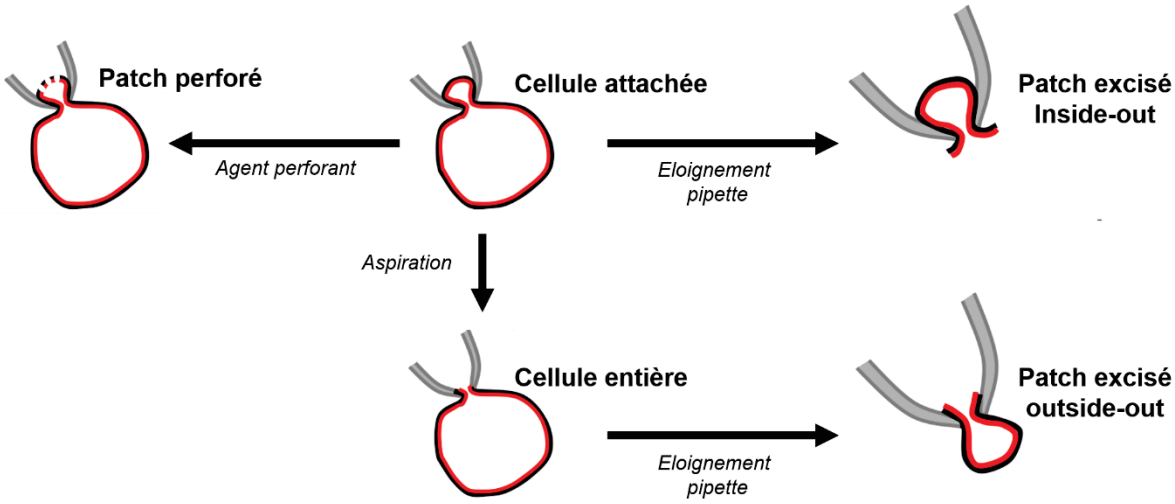


Figure 37 : Différentes configurations de patch-clamp

Les cellules ayant été déposées sur des boîtes à fond de verre dans leur milieu de dissociation (KB + solution de réadaptation + Tyrode/BSA) sont dans un premier temps perfusées avec du Tyrode chauffé à 37°C correspondant à la condition contrôle. Le Tyrode et les agents pharmacologiques sont perfusés à proximité de la cellule grâce à un stylo de perfusion chauffant (MPRE8, Cell Micro control). Le potentiel membranaire et les PA spontanés des cellules sinusales ont été obtenus en configuration courant imposé (current-clamp) tandis que les différents courants ioniques ont été obtenus en configuration potentiel imposé (voltage-clamp). Le signal a été amplifié avec un amplificateur Axopatch 700A (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) puis échantillonné avec un convertisseur analogue-digitale Axon Digidata 1550B (Molecular Devices). Les données ont ensuite été acquises avec le logiciel pClamp (v10.3, Molecular Devices). L'analyse des enregistrements de patch-clamp (PA et courants) a été réalisée avec le logiciel Clampfit (v11.3, Molecular Devices).

Enregistrement de la dynamique calcique intracellulaire par microscopie confocale sur cellule sinusale isolée

Préparation des cellules sinusales isolées

Les cellules sinusales sont isolées de la même manière que précédemment. Suite à la réadaptation calcique, les cellules sont déposées dans des Fluorodish (FD35-100, World Precision instrument) préalablement tapissées de laminine incubées pendant la nuit (100 µg/ml, L2020, Sigma-Aldrich) et sont laissées au repos pendant 1h.

Les ions calcium ne possédant pas de propriétés fluorescentes intrinsèques, il faut utiliser un moyen détourné afin de pouvoir l'observer. Pour cela, les cellules sont incubées pendant 15 minutes avec du Cal520 (1 ng/µL dans une solution de Tyrode, AAT Bioquest®, USA), un fluorochrome capable de chélater les ions Ca^{2+} et d'émettre une fluorescence proportionnelle à la quantité de calcium captée. Ainsi, dès que la concentration calcique intracellulaire augmente, la fluorescence augmente également.

Acquisition de l'activité calcique par microscopie confocale

L'acquisition s'effectue grâce à un microscope confocal à balayage laser ZEISS LSM780 appartenant à la plateforme MRI (Plateforme Régionale d'Imagerie du Languedoc-Roussillon, Biocampus) et situé à l'Institut de Génétique Humaine de Montpellier. Les longueurs d'excitation du laser (493 nm) et d'émission (515 nm) sont choisies en fonction des propriétés du fluorochrome Cal520. Les cellules sont observées sous un objectif à immersion dans l'huile x63 et l'acquisition est faite en configuration line-scan. Le laser scanne une ligne prédéfinie à une vitesse de balayage de 1.88 ms/pixel (taille d'un pixel : 0,26 µm) pour un total de 30 000 lignes, ce qui permet d'observer l'activité calcique (transitoires et sparks) de cette ligne au cours du temps. Les cellules sont perfusées avec du Tyrode et différents agents pharmacologiques grâce à un stylo de perfusion chauffant (37°C) (MPRE8, Cell Micro control).

Analyse des transitoires et sparks calciques

Grâce au logiciel ImageJ, le bruit de fond est dans un premier temps retiré et l'intégrale de la fluorescence de la ligne au cours du temps est obtenu. L'intégrale est ensuite analysée avec le logiciel Clampfit (v11.3, Molecular Devices) ce qui permet de calculer la fréquence des transitoires, leur amplitude et leur taux de décroissance et la concentration calcique diastolique.

Les LCRs ont été analysés grâce à un logiciel développé sur R commander par Olivier Bortolotti, stagiaire Master 1 au sein de notre équipe. A partir de IOCBIO, un logiciel gratuit d'utilisation (Laasmaa *et al*., 2019), il a entièrement réécrit un nouveau programme de détection automatique des sparks calciques. Ainsi, il a pu inclure la mesure de nouveaux paramètres qui n'étaient pas calculés précédemment par le logiciel telle que la distance de chaque LCR au transitoire suivant. La fréquence des LCRs, leur amplitude, taille, durée et distance au transitoire ont alors été calculés grâce à ce nouveau logiciel.

Expériences d'immunomarquage sur tissu sinusal entier et cellules sinusales isolées

Immunohistochimie du tissu sinusal intact

Les expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur des préparations d'oreillettes intactes. Le tissu est épinglé sur une boîte de Pétri avec la face endocardique visible de la même manière que lors de la dissection du NSA (Figure 36). Il est ensuite fixé avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 20 minutes avant d'être perméabilisé pendant 5 minutes sur glace avec du méthanol froid (-20°C). Cette étape de perméabilisation permet l'accès des anticorps à leur cible. Suite à la perméabilisation, le tissu est incubé pendant 1h dans une solution de saturation composée de BSA 1%, Azide 0.05% et 10% de sérum de chèvre dilué dans du PBS. Le tissu est alors incubé pendant la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans la solution de saturation : anti-$Ca_v1.3$ (lapin, 1/200, obtenu par une collaboration avec l'équipe d'Amy Lee, Université d'Iowa (Gregory *et al*., 2011)), anti-HCN4 (cobaye, 1/200, Alomone labs, Jerusalem, Israël).

Le lendemain, les anticorps primaires sont retirés et le tissu est incubé pendant 1h30 à 37°C avec les anticorps secondaires dilués dans la solution de saturation : anti-lapin conjugué au fluorochrome Alexa 488 (chèvre, 1/200, Thermo Fischer Scientific, USA), anti-cobaye conjugué au fluorochrome Alexa 594 (chèvre, 1/200, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni). Après rinçage au PBS, le tissu est laissé au repos pendant la nuit à 4°C.

Le surlendemain une incubation du tissu avec une solution de Black Sudan (1% dans de l'éthanol à 70%) permet de réduire l'autofluorescence du tissu dans les longueurs d'onde visibles vertes. Le tissu est finalement monté sur une lame en verre avec du milieu de montage Airvol et les images sont acquises sous un objectif x10 à l'aide d'un microscope Apotome Zeiss.

Immunocytochimie sur cellules sinusales isolées

Après isolement des cellules sinusales, celles-ci sont déposées sur une lame multi-puits en verre (Lab-Tek Chamber slide™) préalablement tapissée pendant 20 minutes d'une solution d'adhésion (sodium bicarbonate 0,1 M ; NaOH 15 mM ; Cell tak 50 µg/mL (Corning™ Cell Tak, Thermo Fischer Scientific, USA)). Les cellules sont laissées au repos 1h pour qu'elles aient le temps de bien adhérer au fond des puits puis le milieu de dissociation (KB + solution de réadaptation + Tyrode/BSA) est retiré et les cellules sont fixées avec de la PFA 4% pendant 15min. Après perméabilisation avec une solution de PBS et Triton 0.1% les cellules sont incubées avec la solution de saturation (BSA 1%, Azide 0.05% et 10% de sérum de chèvre dilué dans du PBS) puis avec la solution d'anticorps primaires à 4°C pendant la nuit : anti-$Ca_v1.3$

(1/200, lapin, obtenu par une collaboration avec l'équipe d'Amy Lee, Université d'Iowa (Gregory *et al.*, 2011)), anti-HCN4 (cobaye, 1/200, Alomone labs, Jerusalem, Israël), anti-phospholamban total (anti-PLB) (souris, 1/200, Badrilla, Royaume-uni), anti-phospholamban phospho sérine 16 (anti-pPLBS16) (lapin, 1/200, Badrilla, Royaume-Uni).

Le lendemain la solution d'anticorps primaire est retirée et les cellules sont incubées pendant 1h30 à 37°C avec la solution d'anticorps secondaires : anti-lapin Alexa 488 (chèvre, 1/200, Thermo Fischer Scientific, USA), anti-cobaye Alexa 594 (chèvre, 1/200, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), anti-souris Alexa 594 (chèvre, 1/200, Jackson Laboratory, USA). Ensuite les cellules sont incubées pendant 5 minutes avec une solution de Hoechst (1/5000) qui est un intercalant de l'ADN et donc un colorant des noyaux cellulaires. Les puits sont alors retirés de la lame en verre et une lamelle est apposée avec du milieu de montage Prolong Diamond (Invitrogen, USA). La fluorescence des cellules est finalement observée à l'aide d'un microscope Apotome Zeiss.

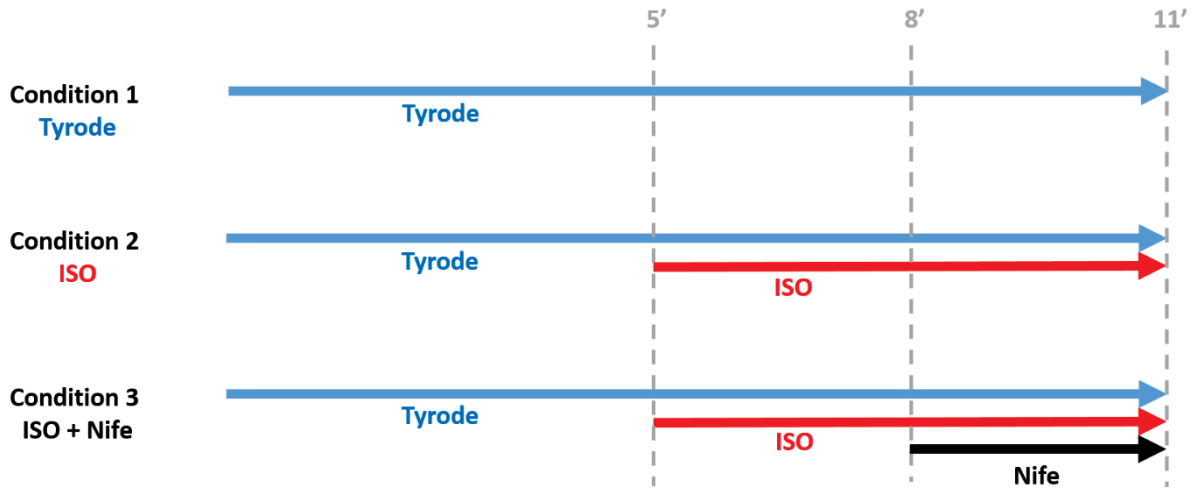


Figure 38 : Protocole d'incubation des cellules sinusales isolées pour l'expression fonctionnelle du phospholamban total et phospholamban phosphorylé sur la sérine 16. Les agents pharmacologiques Isoprénaline (ISO 100 nM) et Nifédipine (Nife 3 µM) sont dilués dans du Tyrode.

Nota bene : La séparation de la lame par les puits isolants permet de pouvoir tester plusieurs combinaisons d'anticorps sur une même lame et sur des cellules issues d'un même tissu sinusal. Les expériences de localisation des protéines ($Ca_v1.3$, HCN4) par immunofluorescence sont réalisées sur des cellules n'ayant pas subi de réadaptation calcique. Au contraire, les expériences d'expression fonctionnelle des protéines (PLB et pPLBS16) ont été réalisées après

réadaptation et incubation des cellules avec les agents pharmacologiques selon le protocole décrit en Figure 38.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software, San Diego, USA) et les données sont représentées par la moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les tests de Student (t-test) appariés ou non appariés et les tests ANOVA (one way ou two-way), ainsi que leurs équivalents non paramétriques, ont été utilisés de manière appropriée pour comparer les données après avoir vérifié leur normalité par un test de Shapiro-Wilk. La significativité des résultats est représentée par : * si $p < 0,5$; ** si $p < 0,1$; *** si $p < 0,001$; **** si $p < 0,0001$.

Résultats

Mes travaux de thèse sont présentés dans l'article ci-après qui est actuellement en cours de soumission.

L-type $Ca_v1.3$ calcium channels are required for beta-adrenergic triggered automaticity in dormant mouse sino-atrial myocytes

[1,2]Julien Louradour, [1]Olivier Bortolotti, [1]Eleonora Torre, [1]Isabelle Bidaud, [2]Jean-Yves Le Guennec, [1]Matteo E. Mangoni*, [1]Pietro Mesirca*

1. Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

2. PhyMedExp, Université de Montpellier, INSERM U1046, UMR CNRS, 9412, Montpellier, France

* Authors for correspondence: **pietro.mesirca@igf.cnrs.fr, matteo.mangoni@igf.cnrs.fr**

Abstract

Cardiac pacemaking relies on the spontaneous electrical activity of sino-atrial node cells (SANC) in the right atrium. Robust interplay of membrane ion channels activity (membrane clock) and spontaneous local calcium releases (LCRs) from the sarcoplasmic reticulum (calcium clock) sets the automaticity of SANC. Strikingly, most of isolated SANC exhibit a dormant state (i.e with no apparent spontaneous activity) whereas only a fraction shows regular firing as observed in the intact SAN. Recent studies showed that β-adrenergic stimulation can initiate spontaneous firing in dormant SANC though this mechanism is not entirely understood. In order to determine the role of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels in adrenergic regulation of automaticity in dormant SANC, we used a knock-in mouse strain in which the sensitivity of L-type $Ca_v1.2$ α1 subunits to dihydropyridines (DHPs) was inactivated ($Ca_v1.2^{DHP-/-}$). This mouse model enables selective pharmacological inhibition of $Ca_v1.3$ by DHPs. In dormant SANC, β-adrenergic stimulation with isoprenaline (ISO) induced spontaneous action potentials (AP) and Ca^{2+} transients, which were completely arrested with subsequent perfusion of the DHP nifedipine. In spontaneously firing SANC at baseline, $Ca_v1.3$ inhibition completely reversed the effect of β-adrenergic stimulation on AP and frequency of intracellular Ca^{2+} transients. Confocal calcium imaging of SANC showed that β-adrenergic-induced synchronization of LCRs is regulated by the activity of $Ca_v1.3$ channels. Our study therefore shows a novel role of $Ca_v1.3$ channels, which are essential for maintaining automaticity in dormant SANC upon β-adrenergic stimulation.

Key Words: cardiac pacemaker activity; adrenergic regulation; $Ca_v1.3$ channels; ryanodine receptors

Introduction

Cardiac automaticity is one of the fundamental properties of the heart. It relies on the spontaneous electrical activity originating from the sino-atrial node (SAN) (Kennedy et al., 2016; Mangoni and Nargeot, 2008). Automaticity of SAN cells (SANC) is due to diastolic depolarization (DD), a slow depolarizing phase of the action potential (AP) cycle which drives the membrane voltage (V_m) from the end of the repolarization to the threshold of the following AP (DiFrancesco, 1993). While some aspects of the pacemaker mechanism are still not fully elucidated, there is considerable agreement that SAN pacemaker activity is generated by a complex interplay between ion channels of the plasma membrane and intracellular Ca^{2+} cycling (Lakatta et al., 2010; Mangoni and Nargeot, 2008).

Several sarcolemmal ion channels contribute to SANC automaticity and their sequential activation during the DD and AP forms the "*membrane clock*". Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN4) channels responsible for the "funny" current (I_f) (DiFrancesco, 2010), voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) (Mangoni et al., 2006b; Mesirca et al., 2015), voltage-dependent tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ channels (Lei et al., 2004) and transient receptor potential (TRPM and TRPC) (Demion et al., 2007; Hof et al., 2013; Ju et al., 2007) contribute to automaticity in SANC. Along with sarcolemmal ion channels activation, cyclical spontaneous RyR2-dependent local Ca^{2+} releases (LCRs) from sarcoplasmic reticulum (SR) during the DD ("*Ca^{2+} clock*") also contributes to SANC automaticity (Vinogradova et al., 2004). The increase in intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ by LCRs activates the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX) resulting in an enhanced inward I_{NCX} current which accelerates the DD in late diastole. *Membrane clock* and *Ca^{2+} clock* are both integrated in the *coupled clock* model of pacemaking: i.e. there is a self-entrainment of the two clocks to achieve sustained automaticity in SANC (Lakatta et al., 2010; Yaniv et al., 2015). The *coupled clock* model of pacemaking has been interpreted as an ignition process: along with HCN4 activation, spontaneous LCRs and increased I_{NCX} depolarize cell membrane reaching threshold for low voltage-gated L-type and T-type (respectively $I_{Ca,L}$ and $I_{Ca,T}$) Ca^{2+} currents. These two diastolic Ca^{2+} influx in turn activate more LCRs by Ca^{2+}-induced Ca^{2+}-release (CICR) (Lyashkov et al., 2018). AP upstroke is then generated when V_m reaches threshold for activation of I_{CaL} and repolarization is initiated by inactivation of VGCCs and activation of delayed outward K^+ currents I_{Kr} and I_{Ks} (Lyashkov et al., 2018). During the AP upstroke, Ca^{2+} influx refills SR Ca^{2+} content *via* the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) setting appropriate Ca^{2+} load of the SR for diastolic LCRs to occur in the following DD and AP cycle (Vinogradova et al., 2010). In

the *coupled clock* model of pacemaking β-adrenergic activation accelerates pacemaker activity by enhancing coupling of the two clocks in SANC, *via* an increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels (Lakatta et al., 2010). cAMP directly enhances I_f and shifts its voltage dependence towards more depolarized potentials (DiFrancesco and Tortora, 1991). cAMP-mediated protein kinase A (PKA)-dependent phosphorylations of VGCCs, RyR2, and phospholamban (PLB) augment their activity which increases *in fine* the depolarization rate of SANC (Mangoni and Nargeot, 2008).

Recently, β-adrenergic stimulation on isolated SANC was studied in quiescent SANC (Bychkov et al., 2020; Fenske et al., 2020; Kim et al., 2018; Tsutsui et al., 2021). *Kim et al., (2018)* showed that the majority of isolated SANC from guinea pig hearts were dormant (i.e. with no apparent spontaneous electrical activity) and that β-adrenergic receptor activation can initiate automaticity in these cells. In addition, dormant SANC and SANC that are spontaneously firing at baseline can reach the same frequency under β-adrenergic stimulation. This β-adrenergic effect was also observed in isolated dormant human SANC (Bychkov et al., 2020). Interestingly, a recent study showed that the chronotropic response is actually different among SANC with various basal firing rates which results, *in fine*, in a synchronized average rate for all SANC under β-adrenergic stimulation (Kim et al., 2021).

We have previously shown that SANC express two distinct isoforms of L-type VGCCs: $Ca_v1.3$ and $Ca_v1.2$ (Marionneau et al., 2005). These isoforms underlie distinct L-type Ca^{2+} currents activating at different voltages. Indeed, while $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} ($I_{Cav1.3}$) activates at negative voltages and supplies inward current during DD, $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} ($I_{Cav1.2}$) activates at more positive voltages in the range of the AP upstroke phase (Mangoni et al., 2003, 2006b; Mesirca et al., 2015). Both isoforms are positively regulated by catecholamines (Mangoni et al., 2003). $Ca_v1.3$ channels constitute also an essential molecular component of the sustained inward Na^+ current (I_{st}) in SANC, which provides an additional mechanism to supply inward current in the DD range (Toyoda et al., 2017). Furthermore, in recent works, we have shown that $Ca_v1.3$ channels co-localize with RyR2 in SANC and contribute to the generation of diastolic LCRs (Baudot et al., 2020; Christel et al., 2012; Torrente et al., 2016). Finally, we showed that intact $Ca_v1.3$ is necessary for the SAN impulse to be initiated in the SAN (Baudot et al., 2020), making these channels a potentially important factor in regulation of automaticity in dormant and spontaneously active SANC upon β-adrenergic receptors activation.

Here we show that $Ca_v1.3$ channels are critical for initiation of pacemaker activity in dormant mouse SANC by β-adrenergic activation. We show that selective pharmacologic

inhibition of $Ca_v1.3$ channels using mice in which the sensitivity of $Ca_v1.2$ channels has been abolished ($Ca_v1.2^{DHP-/-}$) stops automaticity of dormant SANC under β-adrenergic stimulation, reverses the positive chronotropic effect of isoproterenol (ISO) in spontaneously active SANC and disrupts LCRs synchronization under β-adrenergic stimulation of pacemaking. In addition, we suggest that $Ca_v1.3$ channels are essential for the recruitment of dormant SANC under β-adrenergic stimulation in order to reach synchronized rate among SANC.

Methods

All mice used were from C57B/6J genetic background. Wild-type (WT) mice were obtained from Charles River and Janvier labs. $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice, obtained from J. Striessnig team, were generated by knock-in point mutation in $Ca_v1.2$ α1 subunit (T1066Y) (Sinnegger-Brauns et al., 2004). The study is in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US national Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and European directives (2010/63/EU). Experimental procedures were approved by the Ethical committee of the University of Montpellier and the French Ministry of agriculture (protocol no: 2017010310594939). Animals were housed in individual cages in the IGF animal facility with free access to food and water and were exposed to 12-h light/dark reverse cycles (light, 8pm to 8am) in a thermostatically controlled room (21-22 °C).

Single cell isolation

SAN pacemaker cells were isolated from WT and $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice hearts as previously described (Baudot et al., 2020; Mangoni and Nargeot, 2001). Briefly, the heart was excised and immersed in a pre-warmed (36°C) Tyrode solution containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, 5.5 mM D-glucose, and 5 mM Hepes (adjusted to PH 7.4 with NaOH). SAN region was identified using the superior and inferior *vena cava*, the *crista terminalis*, and the interatrial septum as landmarks. SAN tissue was excised and transferred into a low-Ca^{2+} solution containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 50 mM taurine, 5.5 mM D-glucose, 1 mg/mL BSA, and 5 mM Hepes–NaOH (adjusted to pH 6.9 with NaOH) for 4 min. Then enzymatic digestion was carried out for 15-20 min at 36°C in the low-Ca^{2+} solution containing purified collagenase 1 and II (0.15 mg/mL Liberase medium Thermolysin, Roche, Mannheim, Germany) and elastase (0.5 mg/mL, Worthington, Lakewood, USA). Digestion was stopped by washing the SAN in a “Kraftbrühe” (KB) medium containing 100 mM K-glutamate, 10 mM K-aspartate, 25 mM KCl, 10 mM KH2PO4, 2 mM MgSO4, 20 mM taurine, 5 mM creatine, 0.5 mM EGTA, 20 mM D-glucose, 5 mM hepes, 1 mg/mL BSA (adjusted to PH 7.2 with KOH). Single SAN cells were eventually

isolated from the SAN tissue by manual agitation using a flame-forged Pasteur's pipette. To recover the automaticity of the SAN cells, Ca^{2+} was gradually reintroduced in the cell's storage solution to a final concentration of 1.8 mM (Mangoni and Nargeot, 2001). SAN cells were then left to rest for 1h.

Patch-clamp recordings of SAN cells

SAN cells were harvested in custom-made chambers with glass bottoms for cell attachment and superfused with Tyrode solution warmed at 36°C before recording. All electrophysiological signals, APs and ion currents, were measured by perforated patch-clamp method and recorded using a Multiclamp 700A patchclamp amplifier connected to Digidata 1550B interface (Molecular devices). Electrodes had a resistance of 3-4 MΩ when filled with a solution containing (in mM): 80 K-aspartate, 50 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 5 EGTA, 5 HEPES, 3 ATP-Na (adjusted to pH 7.2 with KOH). Perforated patch-clamp was performed by adding 30 µM β-escin to the intracellular solution. Seal resistances were in the range of 2-5 GΩ. Perfusion of pre-warmed (36°C) experimental solutions was done by using a multi-MPRE8 heating pen (Cell Micro Controls). AP parameters were measured as previously described (Baudot et al., 2020). For ion currents measurements, dormancy or firing of SAN cells at baseline were recorded in current-clamp for at least 30s before switching to voltage-clamp.

I_{CaL} measurement

To record I_{CaL}, 30 µM tetrodotoxin (TTX) was added to Tyrode perfusion. From a holding potential of -35 mV, depolarizing steps of 80 ms were undertaken from -55 to +60 mV. Peak density was taken and plotted against corresponding voltage (IV curve) for each cell. Nifedipine (3 µM) was added to Tyrode + TTX perfusion to inhibit L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels in isolated $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. Nifedipine-sensitive current was obtained by substracting current recorded in Nifedipine condition to the one recorded in Tyrode + TTX condition.

I_f measurement

Hyperpolarizing steps from -135 to -35 mV with a 10 mV increment were undertaken from a holding potential of -35 mV. Each hyperpolarizing step lasted 1700 ms and IV curves were plotted for each cell with current density taken at steady-state.

2D calcium imaging of single SAN cells

Calcium dynamics in isolated SAN cells was measured with confocal microscopy (Zeiss LSM 780) as previously described (Torrente et al., 2016). Briefly SAN cells were harvested in a glass Fluorodish (FD3510-100, WPI), coated overnight with laminin (1 mg/mL, Sigma-Aldrich), for

1h before recordings. Cells were loaded for 20 min with a Tyrode solution containing the Ca^{2+} indicator CAL-520 (1 ng.µL^{-1}). Images were acquired by scanning SAN cells with an Argon laser in line-scan configuration. Fluorescence was excited at 488 nm and emissions were collected at > 505 nm. A 63x oil immersion objective was used to record $[Ca^{2+}]_i$ in isolated SAN cells. Perfusion of pre-warmed (36°C) experimental solutions was done by using a multi-MPRE8 heating pen (Cell Micro Controls). SR Ca^{2+} load was measured by acute addition of 10 mM Caffeine to bath solution. Background noise was suppressed and the time-course of Ca^{2+} fluorescence was analyzed with Clampfit (ver.11.1). Ca^{2+} transients were analyzed using ImageJ software but LCRs were analyzed using a homemade software written on R, adapted from IOCBIO sparks detection and analysis software (Laasmaa et al., 2019).

Intact SAN immunostaining

Intact SAN-atria preparations were obtained as previously described (Baudot et al., 2020). Briefly, entire SAN-atria preparation was placed in pre-warmed (36°C) Tyrode solution and pinned to the bottom of an optical chamber (Fluorodish, FD35PDL-100; WPI) coated with ~ 2 mm of clear Sylgard (Sylgard 184 Silicone elastomer kit; Dow Corning). To maintain the SAN in a flat plane, right and left atria were also pinned using entomology needles. Superior and inferior *vena cava* were then cut open to expose the SAN. SAN preparation was fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS), washed twice with PBS, and permeabilized with cold (-20°C) methanol for 5 min. Sample was again washed twice and then incubated for 1h with blocking solution (10% goat serum, 1% BSA and 0.05% NaN_3 in PBS). SAN was incubated with anti-$Ca_v1.3$ (rabbit, 1:200, obtained from (Gregory et al., 2011) and anti-HCN4 (guinea pig, 1:200, Alomone labs, Cat. AGP-004) primary antibodies at 4°C overnight. Sample was washed and incubated for 1h at 37°C with Alexa 488 goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fischer Scientific, Cat. A11034) and Alexa 594 goat anti-guinea pig (1:200, Abcam, Cat. ab150188) secondary antibodies. SAN preparation was washed twice and mounted with Prolong diamond antifade reagent (Thermo Fischer Scientific, Cat. P36961). Images were captured with an Axio Imager Z1 Apotome microscope.

$Ca_v1.3$ and HCN4 labeling in isolated SANC

SANC were isolated as described above and plated on a multi-well glass slide (Lab-Tek Chamber slide™, Thermo Fischer Scientific), coated with 0.1 M $NaHCO_3$, 15 mM NaOH and 50 µg.ml-1 Cell tak (Corning™ Cell Tak, Thermo Fischer Scientific) for at least 20 min. Cells were fixed for 15 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS, washed twice with PBS, and then permeabilized for 15 min with 0.1% Triton in PBS. Samples were again

washed with PBS and incubated for 1h with the blocking solution (see above). SANC were incubated at 4°C overnight with anti-$Ca_v1.3$ and anti-HCN4 (see above) primary antibodies and then incubated with Alexa 488 goat anti-rabbit and Alexa 594 goat anti-guinea pig (see above) for 1h at 37°C. Cells were finally washed twice and mounted with Prolong diamond antifade reagent (Thermo Fischer Scientific, Cat. P36961). Images were captured with an Axio Imager Z1 Apotome microscope.

Dual immunostaining of phospholamban in isolated SANC

To investigate the potential role of $Ca_v1.3$ in phospholamban (PLB) phosphorylation on serine 16, isolated SANC needed to be in a physiological solution. Therefore, immunostaining was done after Ca^{2+} reintroduction (see single cell isolation protocol above). SANC were plated on a multi-well glass slide (see above) and incubated for 5 min in Tyrode solution. Cells were separated in three groups and incubated with: condition 1: Tyrode for 6 min; condition 2: 100 nM Isoproterenol (ISO) for 6 min; condition 3: 100 nM ISO for 3 min and then ISO + 3 µM Nifedipine (Nife) for 3 min. Immunostaining was then performed as described above with anti-PLB total (mouse, 1:200, Badrilla, Cat. No. A010-14) and anti-phosphorylated PLB at serine 16 (rabbit, 1:200, Badrilla, Cat. No. A010-12AP) primary antibodies and Alexa 594 goat anti-mouse (1:200, Jackson laboratories, Cat. 115-585-003) and Alexa 488 goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fischer Scientific, Cat. A11034) secondary antibodies.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 9.1.2 (GraphPad Software). Data are expressed as mean ± the standard error of the mean (SEM). $p < 0.05$ was considered statistically significance. Statistical tests used in each experiment are specified throughout the figure legends.

Results

L-type Ca^{2+} channels inhibition reversed the adrenergic-induced acceleration of AP frequency in isolated SANC from WT mice

We studied spontaneous AP firing in n=29 SANC isolated from 6 WT mouse hearts. Of the 29 cells, two-third exhibited a dormancy behavior at baseline (dormant SANC) and a third were spontaneously firing (firing SANC) (Figure 1A). Dormant cells had no apparent spontaneous electrical activity, were either depolarized around -30 mV or hyperpolarized around -70mV, and yet were able of having spontaneous AP firing when injected with an artificial current (i.e when their membrane potential falls within the diastolic depolarization voltage range) (Figure 1B, Supplementary figure 1B). On the other hand, firing SANC had

spontaneous electrical activity at baseline that varied in rhythmicity, highlighted by the dispersion of their coefficient of variation (standard deviation/mean, CoV) (Supplementary figure 1C).

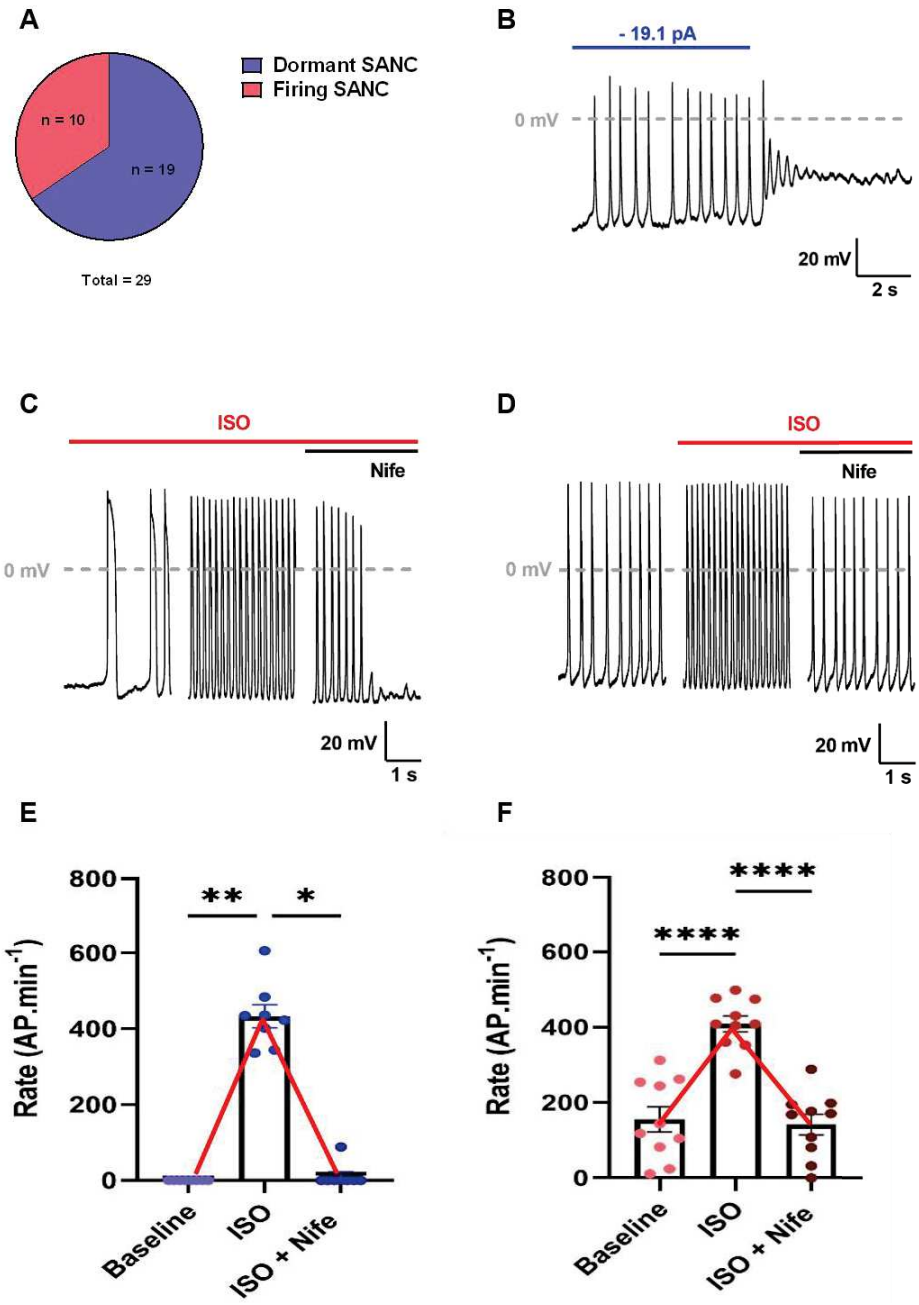


Figure 1: L-type Ca^{2+} channels inhibition completely reversed the ISO-induced acceleration of depolarization rate in both dormant and spontaneously firing SANC isolated from WT mice. (A) Proportion of dormant and spontaneously firing SANC at baseline. (B) Current-clamp recording example of a firing dormant SANC when injected with a hyperpolarizing current. Average depolarization rates and illustrative examples of dormant (C-E) and firing (D-F) SANC at baseline and after perfusion of isoprenaline (ISO 100 nM) and subsequent perfusion of Nifedipine (3 µM). *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 by parametric one-way ANOVA or non-parametric Friedman test.

Of the 19 dormant SANC, 8 started firing under β-adrenergic stimulation (100 nM Isoprenaline, ISO) with a frequency of 433 ± 30 bpm, while 11 remained dormant (Figure 1C,E, Supplementary figure 1A). Interestingly, dormant SANC that did not start firing were depolarized compared to the ones that started firing (Supplementary Figure 1D). As for the firing SANC, ISO significantly augmented the frequency by increasing the linear and exponential slope of the DD and decreasing AP duration without affecting any other AP parameters (Supplementary table 1). β-adrenergic stimulation also put all SANC to the same level of rhythmicity (CoV: 0.04 ± 0.01 for both dormant and firing SANC). In addition, dormant SANC reached firing frequencies similar to firing SANC (433 ± 30 and 409 ± 21 bpm respectively) (Supplementary table 1).

To investigate the role of L-type Ca^{2+} channels in adrenergic-induced firing in dormant SANC, cells were subsequently perfused with 3 μM Nifedipine. We observed that L-type Ca^{2+} channels inhibition completely stopped AP firing under β-adrenergic stimulation (Figure 1C,E). Interestingly, L-type Ca^{2+} channels inhibition did not stop AP firing in firing SANC but significantly decreased the firing frequency, which returned to values similar to basal before stimulation (Tyrode: 156 ± 33 bpm; ISO + Nife: 142 ± 27 bpm), despite continuous β-adrenergic stimulation (Figure 1D,F, Supplementary Figure 1B).

In conclusion, inhibition of L-type Ca^{2+} channels completely reversed the positive chronotropic effect of β-adrenergic stimulation in both dormant and firing SANC, indicating that L-type Ca^{2+} channels are required for the adrenergic-induced acceleration of the firing frequency in mouse SANC.

Selective inhibition of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels reversed adrenergic-induced acceleration of AP frequency in isolated SANC of $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice

In order to determine to what extent L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels contribute to the reversed effect of adrenergic stimulation in isolated WT SANC, we studied spontaneous firing in SANC isolated from 16 $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice hearts. In $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice, T1066Y knock-in point mutation in $Ca_v1.2$ α1 subunit inactivates its sensitivity to dihydropyridines allowing selective pharmacological inhibition of $Ca_v1.3$ channels by Nifedipine. Of the 46 cells studied, 21 were spontaneously firing and 25 were dormant at baseline, showing roughly the same proportion as WT SANC (Figure 1A, 2A). At baseline $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ firing SANC showed no significant difference in AP parameters with WT firing SANC, except for exponential slope of diastolic depolarization that was higher and the AP threshold that was more negative in $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ cells (Supplementary table 2). As observed with WT dormant SANC, the resting membrane potential

of dormant $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC laid positive to -35 mV, out of diastolic depolarization range (-60 to -40 mV) (Figure 2B).

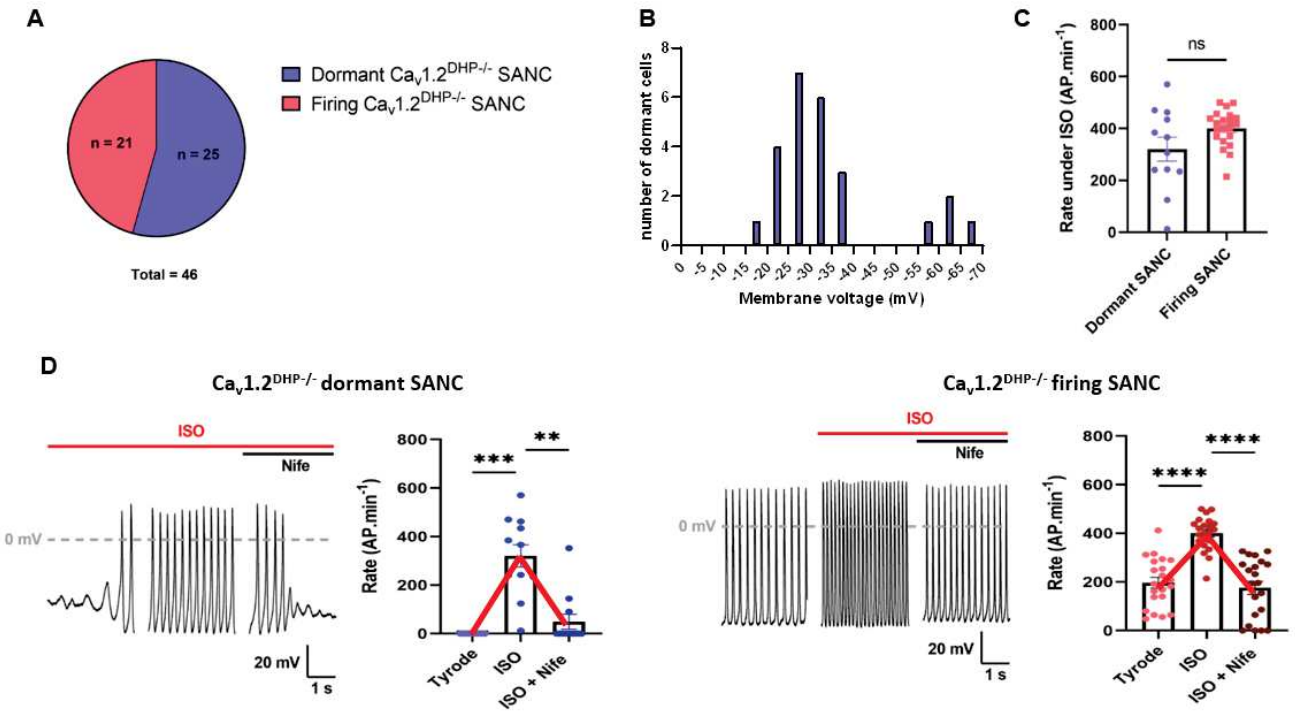


Figure 2: $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels are required for ISO-induced acceleration of depolarization rate in dormant and spontaneously firing SANC isolated from $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice. (A) Proportion of dormant and spontaneously firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC at baseline. (B) Histogram of the membrane potential of dormant $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ at baseline. (C) Firing rate comparison between dormant and firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC under adrenergic stimulation (ISO). (D) Average depolarization rates and illustrative examples of dormant and firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC at baseline and after perfusion of isoprenaline (ISO 100 nM) and subsequent perfusion of Nifedipine (3 µM). (D) $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$ by Friedman test.

Of the 25 $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormant SANC, 12 started firing under β-adrenergic stimulation, among which 9 completely stopped firing after subsequent perfusion of 3 µM Nifedipine (Figure 2D). As what was observed in WT dormant SANC, $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormant SANC that did not fire under ISO perfusion were significantly depolarized (Supplementary Figure 2H). The membrane potential of dormant SANC that stopped firing under concomitant perfusion of ISO and Nife was significantly depolarized compared to the MDP under ISO condition alone, but did not return to basal depolarized membrane potential (Supplementary Figure 2I). In firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC, ISO perfusion significantly increased the spontaneous frequency, the linear and exponential slope of the DD and decreased AP duration. Subsequent perfusion of Nifedipine reversed the effects of the adrenergic stimulation on the above parameters except

for AP duration and converted rhythmic firing to dysrhythmic (CoV, ISO: 0.06 ± 0.01; ISO + Nife: 0.47 ± 0.15) (Figure 2D, table 1).

Spontaneous firing under β-adrenergic stimulation in dormant and firing $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC was different. Indeed, while frequency, AP duration and linear slope of the DD showed no statistical difference, dormant SANC APs under ISO exhibited depolarized MDP and AP threshold, with slower AP exponential slope and upstroke and smaller amplitude compared to firing SANC (Supplementary Fig 2A-G). Taken together, these data show that selective inhibition of $Ca_V1.3$ channels can completely reverse the effects of β-adrenergic stimulation in both dormant and firing $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC. In addition, we did not find significant differences in the characteristics of AP firing between WT and $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC under all conditions tested, indicating that the observed effects in β-adrenergic stimulation are attributable to $Ca_V1.3$ channels (Supplementary table 2).

Table 1: Comparison of AP parameters between dormant and firing $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC

	Firing $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC			Responder dormant $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC		
	Baseline	ISO	ISO + Nife	Baseline	ISO	ISO + Nife
Frequency (AP.min^{-1})	197 ± 22	401 ± 15****	176 ± 30$^{\$\$\$\$}$	NA	320 ± 46	49 ± 31
MDP (mV)	- 59.8 ± 1.5	- 60.3 ± 1.4	- 61.7 ± 1.6	NA	- 53.4 ± 2	- 59.9 ± 3.3
Linear slope (mV.ms^{-1})	0.042 ± 0.005	0.092 ± 0.009***	0.053 ± 0.004$^{\$\$\$}$	NA	0.080 ± 0.008	0.079 ± 0.005
Exponential slope (mV.ms-1)	0.317 ± 0.019	0.596 ± 0.042****	0.340 ± 0.018$^{\$\$\$\$}$	NA	0.452 ± 0.046	0.411 ± 0.012
AP threshold (mV)	- 43.7 ± 1.5	- 42.2 ± 1.5*	- 41.7 ± 1.7	NA	- 30.1 ± 2.5	- 34.9 ± 2.8
Upstroke (mV.ms-1)	13.9 ± 2.8	13.3 ± 2.6	13.4 ± 2.8	NA	6.1 ± 2.9	5.4 ± 0.3
AP amplitude (mV)	82.3 ± 2.9	85.9 ± 3.3	89.1 ± 4	NA	68.3 ± 4	84.1 ± 7.1
AP duration (ms)	133.6 ± 4.4	108.9 ± 3.5****	111.4 ± 4.3	NA	117.1 ± 9.1	105.2 ± 15.1
Coefficient of variation	0.42 ± 0.12	0.06 ± 0.01****	0.47 ± 0.15$^{\$\$\$}$	NA	0.43 ± 0.22	1.11 ± 0.67

Data are expressed as mean ± SEM; MDP, maximum diastolic pontential; NA, not applicable
****p < 0.001 ****p < 0.0001 vs firing SANC at baseline control by one-way ANOVA (parametric) or Friedman test (non parametric)*
$^{\$\$\$}$p < 0.001 $^{\$\$\$\$}$p < 0.0001 vs firing SANC under ISO perfusion by one-way ANOVA (parametric) or Friedman test (non parametric)
Only n = 3 dormant SANC did not stop under ISO + Nife condition, hence no statistical analysis was done

Selective inhibition of L-type $Ca_V1.3$ Ca^{2+} channels disrupts calcium dynamics in isolated $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC

Since intracellular calcium dynamics contributes to physiological pacemaking, we performed 2D line-scan calcium imaging on n=30 SANC isolated from 13 $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ hearts. Of the 30 cells, two-third were dormant (i.e. cells exhibiting only LCRs with no spontaneous Ca^{2+} transients) and one third were spontaneously firing at baseline (i.e. cells with LCRs and spontaneous Ca^{2+} transients) (Figure 3A,B). A few cells were difficult to classify between dormant or firing, since they presented with very low frequency of spontaneous activity. Hence, we classified cells showing spontaneous frequency below 5 transients/min as dormant. Of the 19 dormant SANC, only 3 failed to initiate spontaneous firing under β-adrenergic stimulation,

a proportion way lower than what we observed in current clamp experiments (Figure 1, 2). Notably, the proportion of dormant SANC that completely stopped firing under subsequent perfusion of Nifedipine was also lower (5 out 16 compared to 9 out of 12, $p = 0.02$ Chi square test) (Figure 3A, Figure 2). In firing SANC β-adrenergic stimulation significantly increased the frequency of Ca^{2+} transients, while concomitant perfusion of ISO and Nifedipine induced return to basal levels (Tyrode: 179 ± 31; ISO + Nife: 162 ± 32 bpm) (Figure 3B). $Ca_v1.3$ inhibition also converted β-adrenergic rhythmic firing to dysrhythmic in both dormant and firing SANC (Figure 3C). Consistently with what we observed in current clamp experiments, the frequency of spontaneous calcium transients under β-adrenergic stimulation was similar between dormant and firing SANC (respectively 285 ± 22 and 285 ± 26 bpm) (Figure 3A,B).

In order to determine the effects of $Ca_v1.3$ inhibition on calcium dynamics we analyzed the properties of Ca^{2+} transients and LCRs parameters in $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. ISO significantly increased diastolic intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) levels in dormant but not in firing SANC. However, $Ca_v1.3$ inhibition significantly decreased the diastolic level of $[Ca^{2+}]_i$ in dormant and firing SANC (Figure 4A,B). Both dormant and firing SANC showed shorter decay time constants (tau) of Ca^{2+} transients after $Ca_v1.3$ inhibition, reflecting faster decrease of $[Ca^{2+}]_i$ following Ca^{2+} transient (Figure 4C). While the number of LCRs increased under β-adrenergic stimulation and decreased after subsequent perfusion of Nifedipine in dormant SANC, there was no significant difference in firing SANC (Figure 4D). β-adrenergic stimulation also increased LCRs size and $Ca_v1.3$ inhibition decreased it in both dormant and firing SANC (Figure 4E). In contrast, there was no difference in LCR amplitude and duration in neither dormant nor firing SANC (data not shown).

Interestingly, 3 dormant SANC did not start firing under β-adrenergic stimulation. Because some LCRs can be very close to the Ca^{2+} transient and even merge with it, it may be hard detecting them. However, since these dormant cells did not exhibit spontaneous Ca^{2+} transients, direct effects of β-adrenergic stimulation and subsequent $Ca_v1.3$ inhibition on every single LCR can be observed. For the 3 cells ISO increased the number of LCRs while subsequent $Ca_v1.3$ inhibition decreased it. $Ca_v1.3$ inhibition also decreased LCR size while no tendency could be drawn for LCR duration and amplitude (Supplementary Figure 3).

Taken together, these results indicate that disruption of diastolic $[Ca^{2+}]_i$, generation and size of LCRs by $Ca_v1.3$ inhibition contributes to reversal of the effects of β-adrenergic stimulation of spontaneous activity in SANC.

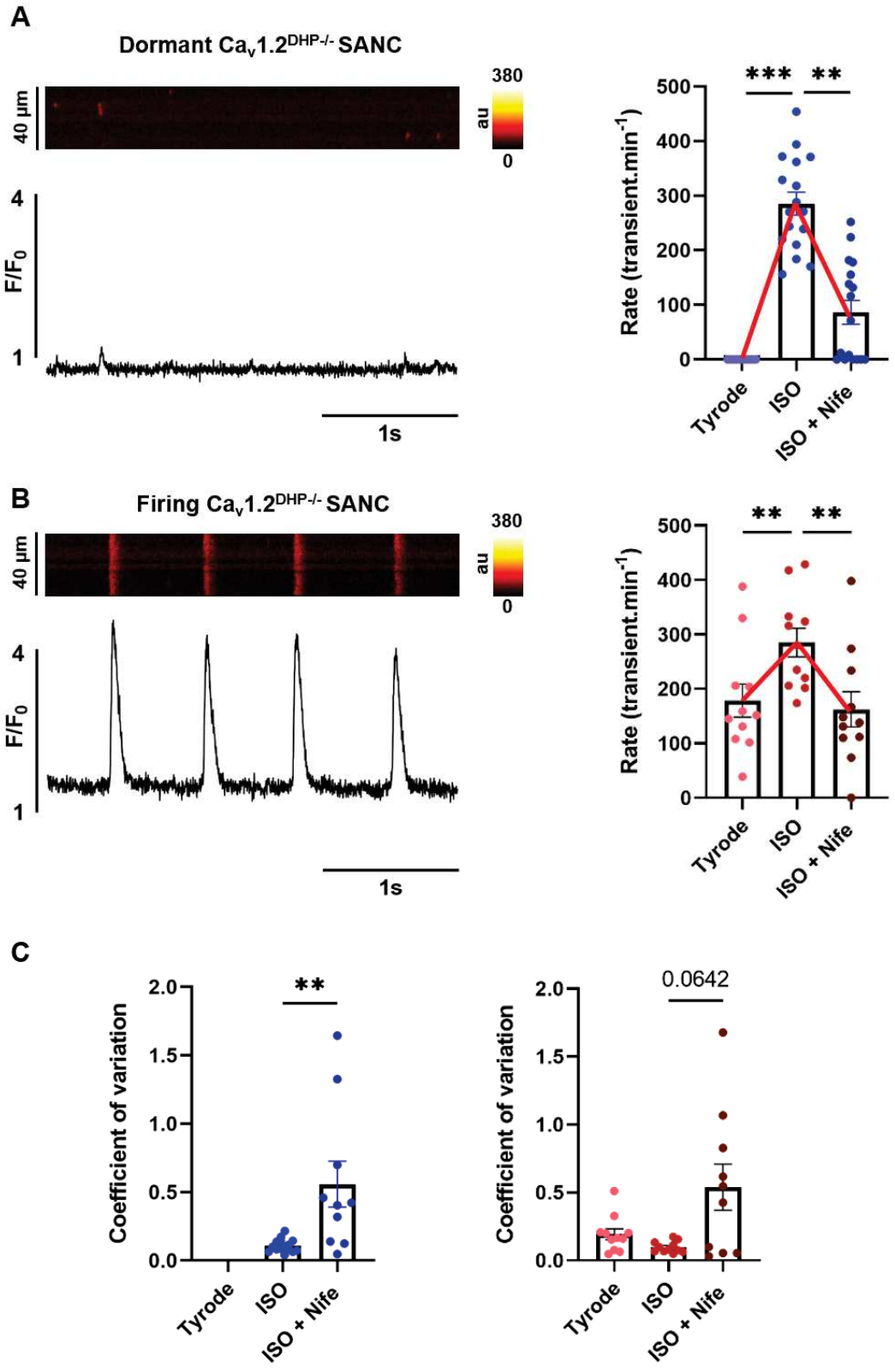


Figure 3: $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels inhibition decreased spontaneous Ca^{2+} transient rate under β-adrenergic stimulation in isolated $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. Line-scan and corresponding time-course of Ca^{2+} fluorescence and average Ca^{2+} transient rate in dormant (A) and spontaneously firing (B) $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. (C) Mean coefficient of variation in dormant (left, blue) and firing (right, red) $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. **p < 0.01, ***p < 0.001 by parametric one-way ANOVA or non-parametric Friedman test.

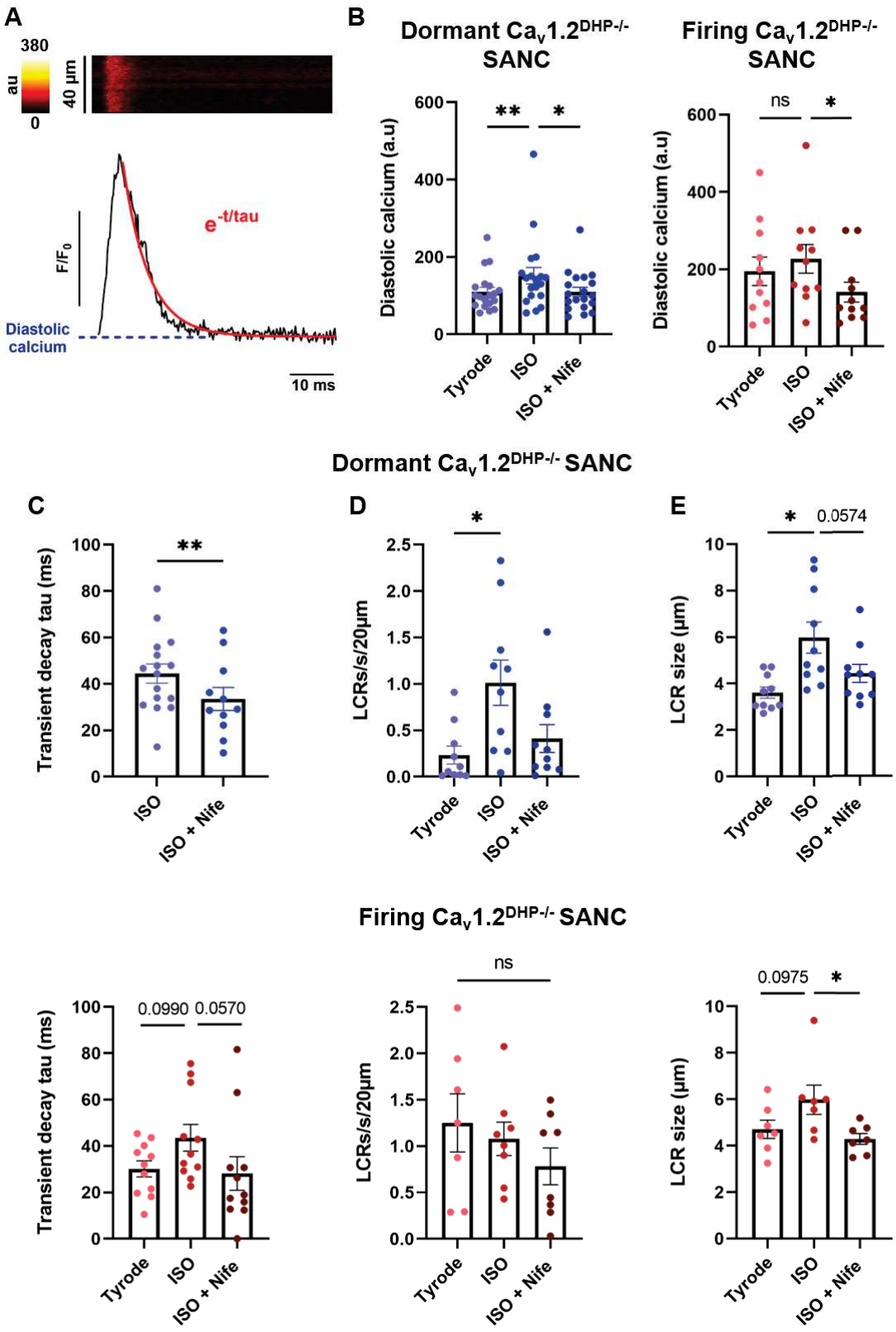


Figure 4: $Ca_V1.3$ Ca^{2+} channels regulate local calcium releases during the diastole. (A) Line-scan and representative time-course of Ca^{2+} fluorescence for one transient with indicated diastolic calcium and time constant tau of transient decay. (B) Average diastolic calcium in dormant (left, blue) and firing (right, red) $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC. Average transient decay time constant tau (C), LCR frequency (D), and LCR size (E) in dormant (top, blue) and spontaneously firing (bottom, red) isolated $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC.

β-adrenergic activation of SANC automaticity synchronizes LCRs in late diastole and is dependent of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels

We already showed that genetic ablation of $Ca_v1.3$ channels disrupts LCRs generation and dynamics in mouse SANC (Baudot et al., 2020; Torrente et al., 2016). However, the consequences of selective inhibition of $Ca_v1.3$ on diastolic LCRs has not been studied. LCRs synchronization in space and time in late diastole is an important concept of the *coupled-clock* model of pacemaking (Lakatta et al., 2010). Therefore, $Ca_v1.3$ mediated synchronization of LCRs may contribute to explain ISO-induced spontaneous firing in dormant and the positive chronotropic effect of adrenergic activation in firing SANC. We thus investigated synchronization of diastolic LCRs in our line-scan experiments on isolated mouse SANC before and after inhibition of $Ca_v1.3$ channels. To this aim, we measured the distance in time between every single LCR event and the following Ca^{2+} transient (Figure 5A). Averaged data for each investigated cell are shown in Figure 5B. In dormant $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC that started firing with β-adrenergic stimulation and did not stop after Nifedipine perfusion, averaged LCR-transient distance tends to increase when $Ca_v1.3$ channels are inhibited compared to ISO alone condition (ISO: 18.3 ± 8.4; ISO + Nife: 136.8 ± 93 ms) (Figure 5B). In firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC, β-adrenergic stimulation significantly decreased this distance while subsequent $Ca_v1.3$ inhibition significantly increased it (Tyrode: 86.2 ± 22.5; ISO: 30.9 ± 12.1; ISO + Nife: 183.2 ± 65.1 ms) (Figure 5C).

To confirm these results we measured the proportion of LCRs located at the very end of the diastole (i.e. < 20, 30, 40 ms before Ca^{2+} transient) in firing $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. Under basal conditions, 40% of LCRs were found in a time window shorter than 20 ms before spontaneous Ca^{2+} transient. This proportion increased up to 80% under β-adrenergic stimulation and decreased to 50% with subsequent $Ca_v1.3$ inhibition (Figure 5D). Interestingly, while 90% of LCRs fell within 40 ms before Ca^{2+} transient under β-adrenergic stimulation, this proportion was ≈50% under basal condition and concomitant perfusion of ISO and Nife condition indicating that half of LCRs events under these conditions were temporally unrelated to the generation of Ca^{2+} transients (Figure 5E).

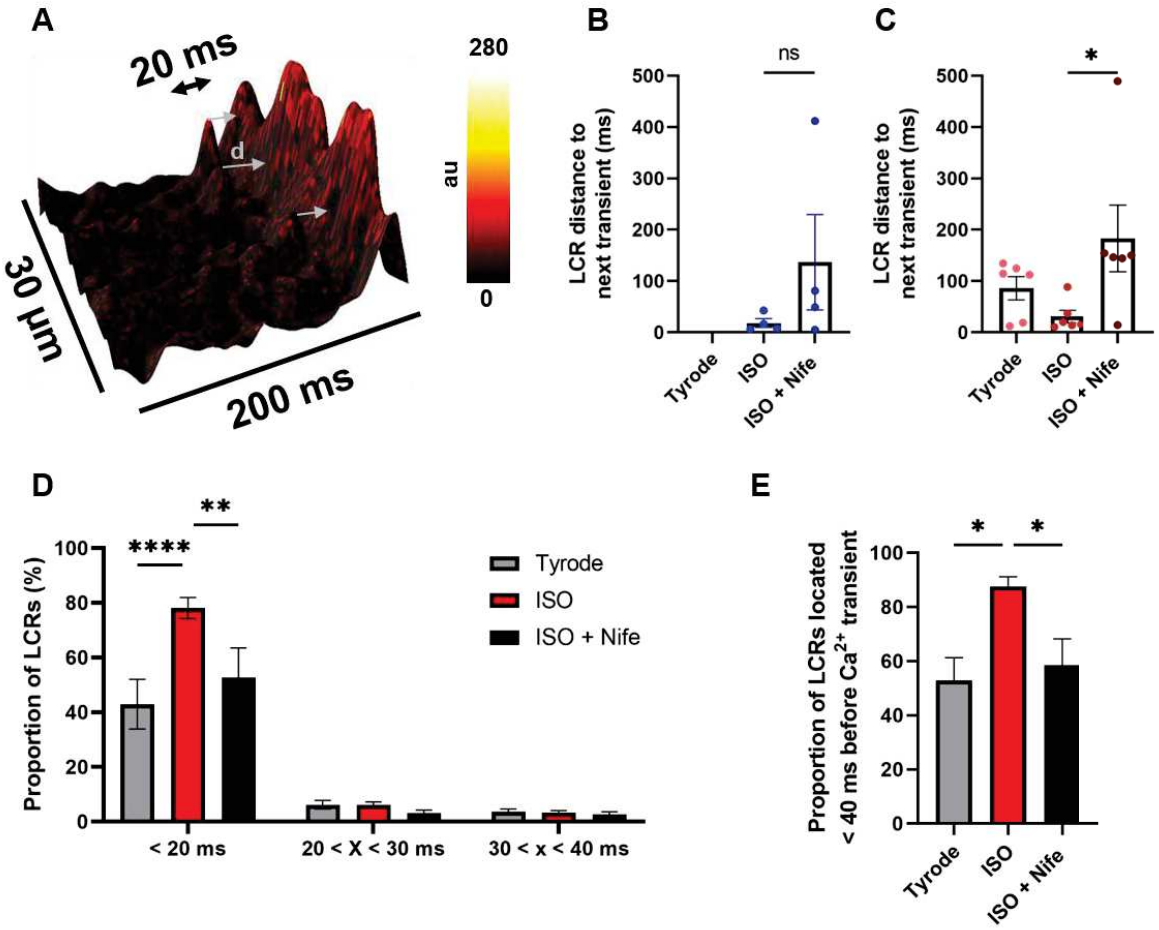


Figure 5: L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels control LCRs synchronization upon β-adrenergic stimulation in late diastole. (A) 3D reconstruction of diastolic $[Ca^{2+}]_i$ increase with represented distance (d) between LCR and following Ca^{2+} transient. Average distance d (in ms) in dormant (B) and firing (C) SANC. (D) Proportion of LCRs located < 20 ms, between 20 and 30, and between 30 and 40 ms before Ca^{2+} transient in firing SANC in Tyrode, ISO 100 nM and ISO + Nife 3 µM condition. (E) Proportion of LCRs located < 40 ms before Ca^{2+} transient. *p < 0.05 by one-way ANOVA, **p < 0.01, ***p < 0.001 by two-way ANOVA.

To minimize bleaching of the Ca^{2+} indicator, acquisition of line scan images of SANC was performed at steady state under control conditions, ISO and concomitant perfusion of ISO and Nifedipine. However, we also succeeded to observe early effect of Nifedipine perfusion in n=2 $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC just before they stopped spontaneous activity. We determined LCRs synchronization in the short window between the moment when Ca^{2+} transient frequency started decreasing and the moment when they totally disappeared. For the two cells $Ca_v1.3$ inhibition increased the averaged distance of LCRs to the following Ca^{2+} transient and decreased the proportion of events at a time < 20 ms before Ca^{2+} transient (Supplementary Figure 4). Therefore, LCRs became desynchronized right before the cells stopped spontaneous activity.

Taken together, these results indicate that $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels regulate synchronization of LCRs in late diastole under β-adrenergic stimulation.

L-type $Ca_V1.3$ Ca^{2+} channels do not regulate phosphorylation level of PLB under β-adrenergic stimulation

Previous work has shown that the activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) is involved in determination of LCRs phase and responsiveness of pacemaker activity to adrenergic activation (Vinogradova et al., 2010). SERCA function is regulated by PLB, a protein that can be phosphorylated in Serine 16 (pS16-PLB) by cAMP-dependent protein kinase A (PKA). It has been proposed that phosphorylation of PLB is an important factor in ISO-induced acceleration of pacemaking (see Lakatta *et al*., 2010 for review). Since selective $Ca_V1.3$ inhibition by Nifedipine arrests pacemaking of dormant SANC initiated by adrenergic activation and reversed its positive chronotropic effect in firing SANC, we have investigated if Nifedipine would also have affected the phosphorylation state of PLB when concomitantly perfused with ISO (Figure 6). We quantified the pS16-PLB/total PLB ratio in isolated SANC from 3 $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ mice by immunostaining in basal condition or after incubation of 100 nM ISO alone or concomitant incubation with ISO and 3 µM Nifedipine (ISO + Nife). In response to β-adrenergic stimulation, the phosphorylation level of PLB increased by twofold. Subsequent incubation with Nifedipine did not affect the phosphorylation level of PLB, which remained two times higher than in basal condition (Figure 6). Therefore, the effects of $Ca_V1.3$ inhibition under β-adrenergic stimulation on LCRs are not due to a reduction of PLB phosphorylation, hence, are not due to SERCA dysfunction.

Diminished diastolic currents in dormant SANC

To determine why SANC are dormant or spontaneously firing at baseline we measured the density of the funny current (I_f) and the net Nife-sensitive I_{CaL} current mediated by $Ca_V1.3$ channels ($I_{Cav1.3}$ in isolated $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC) (Figure 7A,B). Current-to-voltage relationships (I-V) showed a reduction in these two currents in dormant vs firing $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC. To assess functional profile of the Ca^{2+} clock we investigated SERCA activity by rapid caffeine application (10 mM). There was no significant difference in SR Ca^{2+} load or in the decay time constant (tau) of the caffeine-induced Ca^{2+} transient between dormant and firing SANC (Figure 7E,F). In contrast, data obtained from previous 2D line-scan experiments (Figure 4D) showed that the number of LCRs in dormant SANC is decreased by sixfold compared to the firing ones (dormant: 0.23 ± 0.1; firing: 1.25 ± 0.31 LCRs/s/20 µm) and that dormant SANC have significantly lower diastolic Ca^{2+} (Figure 7C,D). In conclusion, these data suggest that dormant SANC cannot initiate pacemaking because they express lover densities of I_f and $I_{Cav1.3}$, which translates into reduced available inward current during diastolic depolarization and reduced LCR events.

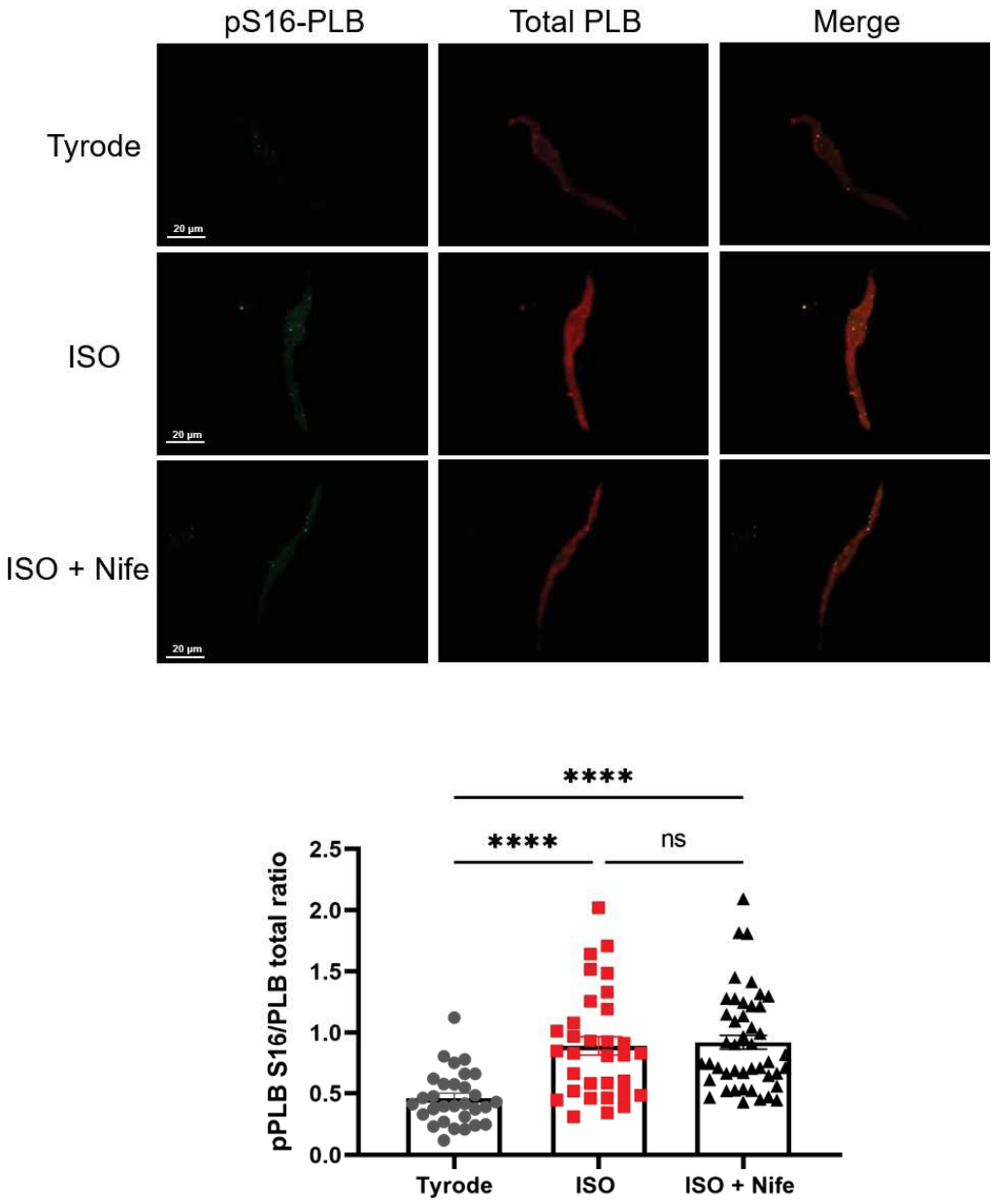


Figure 6: LCRs regulation by L-type $Ca_V1.3$ Ca^{2+} channels is not due to a decrease in phosphorylated PLB levels. Double immunostaining of phosphorylated PLB (pPLB) at serine 16 (green), total PLB (red) and merged images in SANC incubated with Tyrode, ISO 100 nM or ISO + Nife 3 µM with mean pPLB/PLB ratio (bottom). ****$p < 0.0001$ by Kruskal-Wallis test.

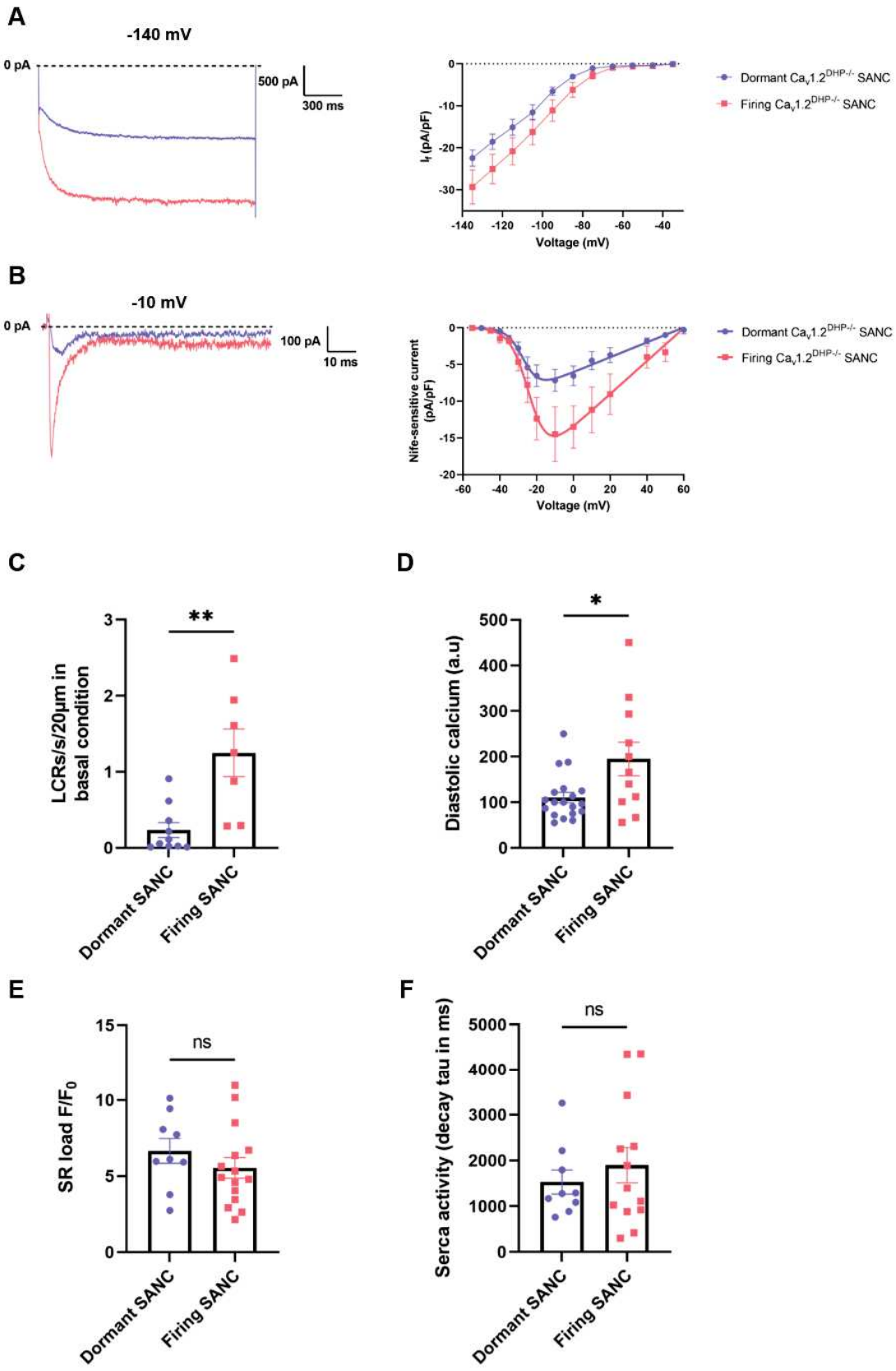


Figure 7: Diminished ionic current densities in dormant SANC. Representative trace and I-V curve of I_f (A) and Nifedipine-sensitive current ($I_{Cav1.3}$) (B) in dormant (blue) and firing (red) SANC. Average number of LCRs (C), diastolic calcium (D), SR Ca^{2+} load (E) and time constant of caffeine-induced Ca^{2+} transient (F) in dormant (blue) and firing (red) SANC. *p < 0.05, **p < 0.01 by unpaired t-test.

Different expression of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels in intact NSA and isolated SANC

Since voltage-clamp recordings of I_f and $I_{Cav1.3}$ showed reduced densities of these currents in dormant vs firing SANC, we wondered if distribution of $Ca_v1.3$ varied in isolated SANC and in the SAN. Co-immunostaining of isolated SANC with anti HCN4 and anti $Ca_v1.3$ antibodies showed bimodal distribution of anti $Ca_v1.3$ staining intensity suggesting the existence of two populations of SANC with low or high expression of $Ca_v1.3$ channels. In contrast, HCN4 channels seem to be evenly expressed among isolated SANC (Figure 8A). We finally performed immunostaining on intact SAN/atria preparations in order to compare the spatial distribution of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels within the SAN (Figure 8B). While HCN4 channels seem to be predominantly expressed along the *crista terminalis*, the central region between the *crista terminalis* and the interatrial septum seems to express more $Ca_v1.3$ channels. Therefore, areas with different patterns of HCN4 and $Ca_v1.3$ channels expression could be found throughout the SAN. These data suggest that while dormant SANC may come from SAN regions expressing lower densities of $Ca_v1.3$, firing SANC may be situated in regions co-expressing both $Ca_v1.3$ and HCN4 at high densities.

Discussion

Our study shows, for the first time, that L-type $Ca_v1.3$ channels are critical to maintain pacemaker activity induced by β-adrenergic activation in dormant SANC. In addition, we show that $Ca_v1.3$ channels play a major role in generating adrenergic positive chronotropic effect of pacemaker activity in firing SANC. Finally, we show that selective inhibition of $Ca_v1.3$ channels disrupts adrenergic activation of SANC pacemaker activity by disrupting of time β-adrenergic regulation of LCRs spatial and time synchronization.

$Ca_v1.3$ channels are critical effectors in β-adrenergic-induced firing in dormant SANC

Even though non-pathological SAN exhibits regular firing *in vivo*, most of the isolated SANC from mice hearts do not show spontaneous activity *in vitro* (Figure 1, 2). Previous studies showed that pharmacological inhibition of I_{Kr} (Clark et al., 2004; Verheijck et al., 1995), I_{CaL} (Verheijck et al., 1999), PKA (Vinogradova et al., 2006), CaMKII (Vinogradova et al., 2000), or high concentrations of acetylcholine (Mesirca et al., 2013; Van Borren et al., 2010) can induce dormancy in isolated SANC that were spontaneously firing APs and intracellular Ca^{2+} transients. It is thus not surprising to find SANC that are dormant at baseline but can show spontaneous firing when properly stimulated. *Kim et al., (2018)* were indeed the first to report -induced spontaneous firing induced by β-adrenergic activation in isolated dormant SANC from guinea pig hearts. Historically thought as cells damaged by enzymatic isolation, Kim and co-workers demonstrated that dormant SANC are functional under stimulation of the cAMP

signaling pathway. Here we show that automaticity of isolated mouse dormant SANC can be initiated under activation of β-adrenergic receptors (Figure 1-3) showing that adrenergic stimulation of dormant SANC is shared amongst mammals. (Figure 1, 2, 3). We cannot rule out the possibility that some dormant SANC might actually be damaged by enzymatic isolation, especially those that did not respond to β-adrenergic stimulation. However, it has recently been shown that current densities of I_f, I_{CaL} and K^+ repolarizing current I_K are increased under β-adrenergic stimulation in non-responding dormant SANC to the same extent as in responding dormant SANC, showing that cAMP signaling is still functional in this class of SANC (Tsutsui et al., 2021). Besides *in vitro* conditions, the presence of dormant SANC has been observed *ex vivo* in intact mouse SAN suggesting that dormant SANC may also be present *in vivo* (Bychkov et al., 2020; Fenske et al., 2020) though their functional physiological role has not been fully elucidated yet.

Transition from dormancy to spontaneous firing is achieved via enhancement of cAMP-PKA signaling that causes membrane hyperpolarization to reach the range of voltages spanning diastolic depolarization (-60/-40 mv, Supplementary Figure 2I). Interestingly, membrane potential of dormant SANC that did not respond to β-adrenergic stimulation was significantly more depolarized than in responding dormant SANC (Supplementary Figure 2H). This suggests that, if a dormant SANC presents with very depolarized resting potential, cAMP-PKA signaling-induced hyperpolarization may not be sufficient to trigger spontaneous firing. We showed that $Ca_v1.3$ channels are key actors in this β-adrenergic-induced firing in dormant SANC because $Ca_v1.3$ channels inhibition completely stopped spontaneous activity (Figure 2). Intriguing result is that membrane potential is slightly depolarized under $Ca_v1.3$ channels inhibition compared to the MDP under β-adrenergic stimulation but does not go back to the level of depolarization in basal condition (Supplementary Figure 2I). This shows that $Ca_v1.3$ channels are essential to maintain firing under β-adrenergic stimulation and that they are involved in the hyperpolarization in dormant SANC, at least partially. Other actors are surely involved as well, such as Ca^{2+}-activated K^+ channels (Weisbrod et al., 2016). *Fenske et al., (2020)* recently showed that dormancy could be induced in mouse WT SANC by acute blocking of cAMP binding to HCN4 channels by TAT-TRIP8b$_{nano}$, a peptide that binds to the cyclic nucleotide-binding domain of HCN channels (Saponaro et al., 2018). cAMP direct regulation of HCN4 channels could then also be involved in the switch between dormancy and firing mode.

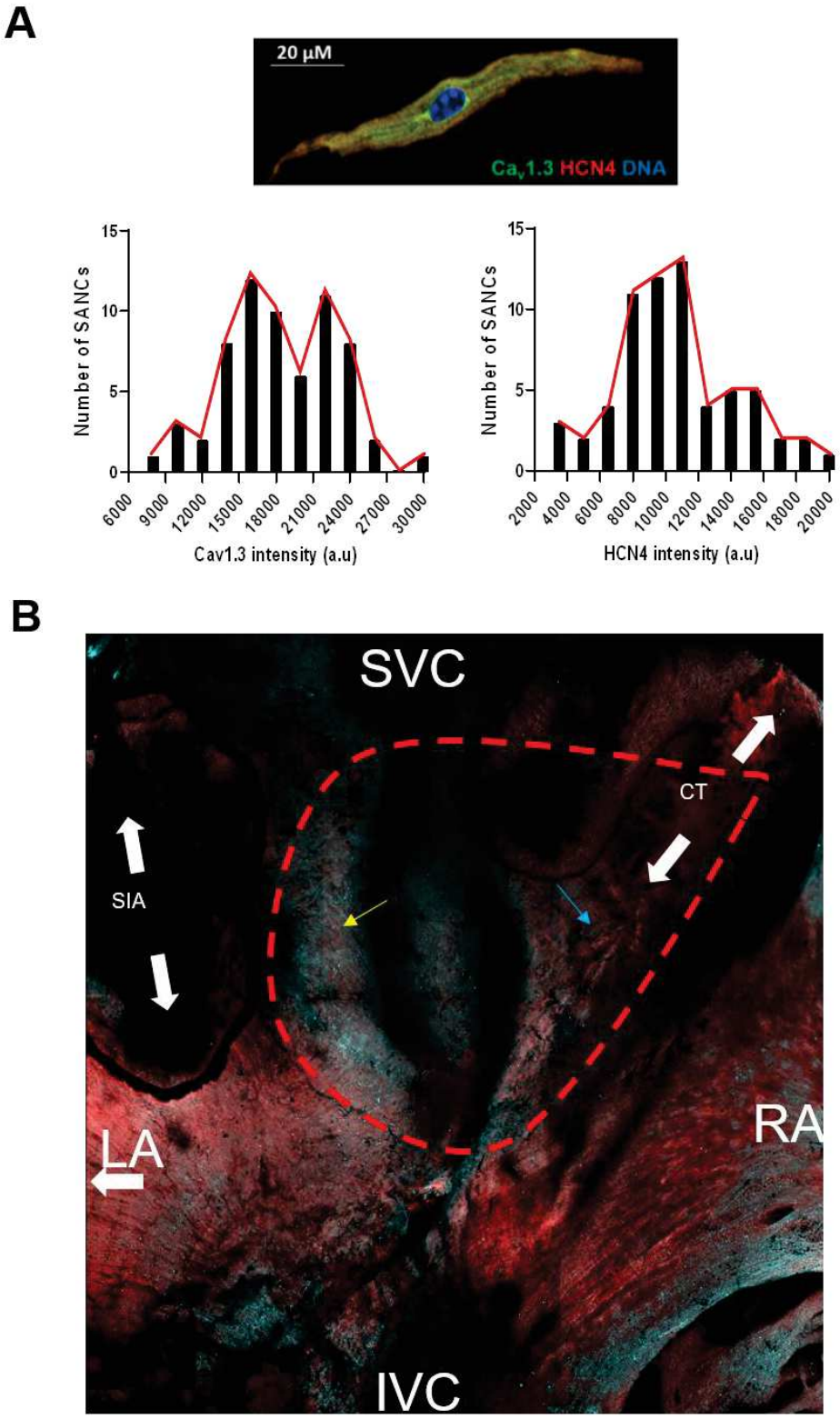


Figure 8: Different expression of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels in mouse SAN. (A) Immunolabeling of $Ca_v1.3$ (green) and HCN4 (red) in isolated SANC with proportion of SANC based on $Ca_v1.3$ or HCN4 fluorescence intensity. (B) Immunolabeling of $Ca_v1.3$ (turquoise) and HCN4 (red) in intact SAN. SVC: superior *vena cava*; IVC: inferior *vena cava*; RA: right atrium; LA: left atrium; SIA: septum interatrial; CT: *crista terminalis*.

$Ca_v1.3$ channels regulate enhanced clock coupling in response to β-adrenergic stimulation

β-adrenergic stimulation accelerates heart rate by triggering cAMP-PKA signaling-dependent phosphorylation of actors of both M-clock ($Ca_v1.3$, $Ca_v1.2$) and Ca^{2+} clock (RyR2, PLB), and direct regulation of HCN4 channels by cAMP (Lakatta et al., 2010; Mangoni and Nargeot, 2008). We showed that dormant SANC have reduced I_f and $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} densities as well as reduced number of LCRs and diastolic $[Ca^{2+}]_i$ compared to firing SANC. This decreased availability in key diastolic membrane currents associated with reduced LCRs prevents initiation of spontaneous activity in dormant SANC in the absence of adrenergic activation (Figure 7). This is particularly important since, reduced $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} will also impair spatial and temporal LCRs generation, leading to dormancy as also predicted by the *coupled clock* model of pacemaking (Lyashkov et al., 2018). Interestingly, there was no significant difference in SR Ca^{2+} load and time constant of the caffeine-induced Ca^{2+} transient between dormant and firing SANC suggesting normal activity of SERCA. We did not look at pPLB/PLB total ratio between the two cell types but *Tsutsui et al., (2021)* showed a diminished ratio in dormant SANC in guinea pig. We could assume that the same occurs in mouse dormant SANC and that SERCA activity is indeed reduced due to increased PLB inhibition. This difference in phosphorylation levels between dormant and firing SANC could be explained by a decrease in basal cAMP in dormant SANC. In SANC, basal cAMP is tightly regulated by AC and phosphodiesterases (PDE) (Vinogradova et al., 2008), hence, we would expect a higher PDE basal activity in dormant SANC.

β-adrenergic stimulation enables initiation of firing in dormant SANC by increasing basal cAMP and therefore PKA-dependent phosphorylation of ion channels and of proteins controlling intracellular Ca^{2+} dynamics. Phosphorylation of these proteins is actually required to maintain firing in dormant SANC because, even though dormant SANC can spontaneously fire when artificial current is injected to reach the DD voltage range, this firing cannot be sustained and immediately stops the second current is removed (Figure 2). This shows that bringing membrane potential to firing range (DD voltage range) is not sufficient to sustain automaticity and that PKA-dependent phosphorylation are indispensable. Among the actors phosphorylated by cAMP-PKA signaling, L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels seem to play a central role as the main regulators of β-adrenergic-induced spontaneous activity. Indeed, in dormant SANC, firing cannot be sustained upon $Ca_v1.3$ inhibition. In line with this, in SANC that are spontaneously firing at baseline, blockade of $Ca_v1.3$ upon β-adrenergic stimulation decreased firing rate back to basal level (Figure 2). Then, both in dormant and firing SANC, $Ca_v1.3$ inhibition brings the cells back to their basal state (dormancy in dormant SANC and basal firing

rate in firing SANC) as if the cells had no memory of being under β-adrenergic stimulation. Thus, even if we expect that other effectors such as PLB be still in their phosphorylated state under continuous $Ca_v1.3$ inhibition, this is apparently not sufficient to maintain fast pacemaking. Studies in mice and humans show that loss-of-function of cAMP-dependent regulation of HCN4 channels is not required for principal heart rate regulation by the ANS and that other ion channels or transporters should carry the chronotropic response (Alig et al., 2009; Fenske et al., 2020; Schweizer et al., 2010). This idea that HCN4 channels are not required for chronotropic response in mouse is supported by two other studies on inducible KO of HCN4 in a mouse model (Baruscotti et al., 2011; Herrmann et al., 2007) or by cardiac specific and time dependent expression of a dominant negative HCN4 subunit carrying silenced conductance (Mesirca et al., 2014). In conclusion, our study shows that activity of $Ca_v1.3$ channels constitutes a critical factor for initiation of spontaneous activity and plays a major role in adrenergic regulation. Here we demonstrated that $Ca_v1.3$ channels are the main carrier of this response in mouse.

$Ca_v1.3$ channels link M-clock and Ca^{2+}-clock by regulating LCRs

We showed in a previous study that genetic ablation of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} decreases LCRs number in SANC from *$Ca_v1.3^{-/-}$* mice (Torrente et al., 2016). However, it is important to provide further evidence of the role of $Ca_v1.3$ channels by providing pharmacologic evidence of their functional role. Here we show important evidence with selective inhibition of $I_{Cav1.3}$ using $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC. Indeed, blockade of $I_{Cav1.3}$ decreased the number and size of LCRs and disrupted spatiotemporal synchronization in late diastole (Figure 4, 5). It has been demonstrated by numerical simulations that synchronization of LCRs and augmented integral LCR Ca^{2+} signal during diastole is required along increased sarcolemmal currents (I_f, I_{CaL}) to accelerate AP firing rate in response to β-adrenergic stimulation (Lyashkov et al., 2018; Maltsev and Lakatta, 2010). Our results are consistent with this model of increased synchronization of LCRs in time in response to β-adrenergic stimulation. In contrast, upon $Ca_v1.3$ channels inhibition LCRs began to move away from the Ca^{2+} transient, their mean distance increasing whereas the proportion of LCRs close to the transient (< 20 ms) decreased, indicating that $Ca_v1.3$ channels regulate LCRs synchronization (Figure 5). Concomitantly with abolition of inward $I_{Cav1.3}$, extreme LCRs desynchronization could be an important contributing factor for arrested firing in dormant SANC as LCRs began to desynchronize right before the cell stopped (Supplementary Figure 4). Important evidence of a direct link between $Ca_v1.3$ channels and LCRs is that desynchronization of LCRs by inhibition of $Ca_v1.3$ channels is not dependent of SERCA activity because Nifedipine did not decrease pPLB/PLB ratio (Figure 6). Furthermore,

we previously showed that $Ca_v1.3$ channels preferentially co-localize with RyR2 suggesting a spatial proximity (Christel et al., 2012). Then LCRs synchronization upon β-adrenergic stimulation could either be due to increased $I_{Cav1.3}$ mediated Ca^{2+} entry during diastole leading to enhanced Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release mechanism, or to conformational rearrangement in RyR2 and $Ca_v1.3$ channels upon phosphorylation, or even both.

Physiological relevance of dormant SANC in vivo

If dormant SANC are indeed present *in vivo* as suggested by two different studies (Bychkov et al., 2020; Fenske et al., 2020) what could their physiological importance be ? *Hennis et al., (2021)* suggest they could act as "brakes" on neighboring firing SANC through tonic electrical interaction *via* gap junction. However they based their hypothesis on their observation of hyperpolarized (-75 mV) dormant cells when cAMP-dependent regulation of HCN4 channels is abolished (Fenske et al., 2020). Here we observed a majority of dormant SANC (in which cAMP-dependent regulation of HCN4 channels is still functional) that were depolarized (-35 mV) even though some cells were hyperpolarized (-70 mV) (Supplementary Figure 1). This could indicate different non-firing mode between dormant SANC. Heterogeneity in the whole SAN tissue in terms of cell behavior, shapes and protein expression is not new (Boyett et al., 2000; Mangoni and Nargeot, 2008; Verheijck et al., 2001). The leading pacemaker site of SAN is even shifting continually upon different external stimuli such as adrenergic and cholinergic stimulation, showing an impressive adaptability of the SAN to different constraints (Lang et al., 2011) We show here that there is a different spatial distribution of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels within the entire SAN and even among SANC (Figure 8). All of this points to different pacemaking mechanisms within the SAN. For example, why $Ca_v1.3$ inhibition stops firing in dormant SANC while it only decreased the frequency back to a basal level in firing SANC? This may be explained by imagining a firing mechanism mostly based on $Ca_v1.3$ in dormant SANC while $Ca_v1.3$ channels are essential for physiologic positive β-adrenergic chronotropic effect in firing SANC. In line with the idea of different firing mechanisms is that, even if firing rate is the same in dormant and firing SANC under β-adrenergic stimulation, AP characteristics are significantly different between the two cell types (Supplementary Figure 2). This shows that dormant SANC can reach high frequency and serve as subsidiary pacemaker cells in times when all SANC are needed (chronotropic response) while displaying a different pattern of expression in actors of pacemaking ($Ca_v1.3$, HCN4 and so on). In this idea, not all SANC contribute to heartbeat as what was suggested for cat SAN (Opthof et al., 1986). However, SANC with different ion channels expression span the whole SAN and represent a reserve pool of SANC capable of reaching normal frequency upon

different external stimuli, guarantying great adaptability of the SAN. Recent study indeed showed that all SANC with various basal rates tend to reach the same frequency under β-adrenergic stimulation (Kim et al., 2021). Here we suggest that in dormant SANC, $Ca_v1.3$ channels are essential to reach this synchronized average rate among SANC in times of fight-or-flight response.

Conclusions

Our results demonstrate that switch from dormancy to firing mode upon β-adrenergic stimulation in SANC is reliant on $Ca_v1.3$ channels. We also showed that chronotropic response in firing SANC is mainly carried by $Ca_v1.3$ channels. Our present study finally raises the possibility of different pacemaking mechanisms among SANC, allowing an adaptability of the SAN to external stimuli while keeping a physiological rate.

Acknowledgement

We thank Philippe Marin's and Chris Jopling's teams (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) for precious advice on immunostaining experiments and for sharing reagents. We thank the staff of the iExplore BioCampus Facility of Montpellier for breeding the mouse line. We also thank the Montpellier Ressources Imagerie for the help with confocal microscopy.

Author contributions

JL, ET, PM, IB performed experiments and analyses. OB created LCR analysis software and analyzed LCRs parameters. JL wrote the manuscript. PM, JYL and MEM designed and revised the manuscript. All authors provided critical reading of the manuscript.

Funding

The IGF group is a member of the Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics supported by a grant from ANR (ANR-11-LABX-0015). Research was supported by the *Fondation pour la Recherche Medicale* "Physiopathologie Cardiovasculaire" (DPC20171138970 to M.E.M.) and the *Fondation Leducq* (TNE FANTASY 19CVD03 to Matteo E. Mangoni and Peter J. Mohler). Julien Louradour is recipient of PhD fellowship by the French Ministry of Education and Research and of a temporary PhD fellowship by the FANTASY Network.

References

Alig, J., Marger, L., Mesirca, P., Ehmke, H., Mangoni, M.E., and Isbrandt, D. (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 12189–12194.

Baruscotti, M., Bucchi, A., Viscomi, C., Mandelli, G., Consalez, G., Gnecchi-Rusconi, T., Montano, N., Casali, K.R., Micheloni, S., Barbuti, A., et al. (2011). Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 1705–1710.

Baudot, M., Torre, E., Bidaud, I., Louradour, J., Torrente, A.G., Fossier, L., Talssi, L., Nargeot, J., Barrère-Lemaire, S., Mesirca, P., et al. (2020). Concomitant genetic ablation of L-type Cav1.3 (α1D) and T-type Cav3.1 (α1G) Ca2+ channels disrupts heart automaticity. Sci Rep 10, 18906.

Boyett, M.R., Honjo, H., and Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. Cardiovasc. Res. 47, 658–687.

Bychkov, R., Juhaszova, M., Tsutsui, K., Coletta, C., Stern, M.D., Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2020). Synchronized Cardiac Impulses Emerge From Heterogeneous Local Calcium Signals Within and Among Cells of Pacemaker Tissue. JACC: Clinical Electrophysiology 6, 907–931.

Christel, C.J., Cardona, N., Mesirca, P., Herrmann, S., Hofmann, F., Striessnig, J., Ludwig, A., Mangoni, M.E., and Lee, A. (2012). Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca2+ channels in mouse sinoatrial node. J Physiol 590, 6327–6341.

Clark, R.B., Mangoni, M.E., Lueger, A., Couette, B., Nargeot, J., and Giles, W.R. (2004). A rapidly activating delayed rectifier K+ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286, H1757-1766.

Demion, M., Bois, P., Launay, P., and Guinamard, R. (2007). TRPM4, a Ca2+-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. Cardiovasc Res 73, 531–538.

DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annual Review of Physiology 55.

DiFrancesco, D. (2010). The role of the funny current in pacemaker activity. Circ Res 106, 434–446.

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

Fenske, S., Hennis, K., Rötzer, R.D., Brox, V.F., Becirovic, E., Scharr, A., Gruner, C., Ziegler, T., Mehlfeld, V., Brennan, J., et al. (2020). cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells. Nature Communications 11, 1–22.

Gregory, F.D., Bryan, K.E., Pangršič, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T., and Lee, A. (2011). Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca2+ channels in mouse inner hair cells. Nat Neurosci 14, 1109–1111.

Hennis, K., Rötzer, R.D., Piantoni, C., Biel, M., Wahl-Schott, C., and Fenske, S. (2021). Speeding Up the Heart? Traditional and New Perspectives on HCN4 Function. Front Physiol 12, 669029.

Herrmann, S., Stieber, J., Stöckl, G., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2007). HCN4 provides a "depolarization reserve" and is not required for heart rate acceleration in mice. EMBO J 26, 4423–4432.

Hof, T., Simard, C., Rouet, R., Sallé, L., and Guinamard, R. (2013). Implication of the TRPM4 nonselective cation channel in mammalian sinus rhythm. Heart Rhythm 10, 1683–1689.

Ju, Y.-K., Chu, Y., Chaulet, H., Lai, D., Gervasio, O.L., Graham, R.M., Cannell, M.B., and Allen, D.G. (2007). Store-operated Ca2+ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. Circ. Res. 100, 1605–1614.

Kennedy, A., Finlay, D.D., Guldenring, D., Bond, R., Moran, K., and McLaughlin, J. (2016). The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. Crit Care Nurs Clin North Am 28, 269–279.

Kim, M.S., Maltsev, A.V., Monfredi, O., Maltseva, L.A., Wirth, A., Florio, M.C., Tsutsui, K., Riordon, D.R., Parsons, S.P., Tagirova, S., et al. (2018). Heterogeneity of calcium clock functions in dormant, dysrhythmically and rhythmically firing single pacemaker cells isolated from SA node. Cell Calcium 74, 168–179.

Kim, M.S., Monfredi, O., Maltseva, L.A., Lakatta, E.G., and Maltsev, V.A. (2021). β-Adrenergic Stimulation Synchronizes a Broad Spectrum of Action Potential Firing Rates of Cardiac Pacemaker Cells toward a Higher Population Average. Cells 10.

Laasmaa, M., Karro, N., Birkedal, R., and Vendelin, M. (2019). IOCBIO Sparks detection and analysis software. PeerJ 7, e6652.

Lakatta, E.G., Maltsev, V.A., and Vinogradova, T.M. (2010). A coupled SYSTEM of intracellular Ca2+ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. Circ. Res. 106, 659–673.

Lang, D., Petrov, V., Lou, Q., Osipov, G., and Efimov, I.R. (2011). Spatiotemporal control of heart rate in a rabbit heart. J Electrocardiol 44, 626–634.

Lei, M., Jones, S.A., Liu, J., Lancaster, M.K., Fung, S.S.-M., Dobrzynski, H., Camelliti, P., Maier, S.K.G., Noble, D., and Boyett, M.R. (2004). Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. J. Physiol. (Lond.) 559, 835–848.

Lyashkov, A.E., Behar, J., Lakatta, E.G., Yaniv, Y., and Maltsev, V.A. (2018). Positive Feedback Mechanisms among Local Ca Releases, NCX, and ICaL Ignite Pacemaker Action Potentials. Biophys J 114, 1176–1189.

Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2010). A novel quantitative explanation for the autonomic modulation of cardiac pacemaker cell automaticity via a dynamic system of sarcolemmal and intracellular proteins. Am J Physiol Heart Circ Physiol 298, H2010-2023.

Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2001). Properties of the hyperpolarization-activated current (I(f)) in isolated mouse sino-atrial cells. Cardiovasc. Res. 52, 51–64.

Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. Physiol. Rev. 88, 919–982.

Mangoni, M.E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca2+ channels in cardiac pacemaker activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 5543–5548.

Mangoni, M.E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2006). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. Prog. Biophys. Mol. Biol. 90, 38–63.

Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M.E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., and Demolombe, S. (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. J. Physiol. (Lond.) 562, 223–234.

Mesirca, P., Marger, L., Toyoda, F., Rizzetto, R., Audoubert, M., Dubel, S., Torrente, A.G., Difrancesco, M.L., Muller, J.C., Leoni, A.-L., et al. (2013). The G-protein-gated K+ channel, IKACh, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. J Gen Physiol 142, 113–126.

Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A.G., Müller, J.C., Marger, L., Rollin, A., Marquilly, C., Vincent, A., Dubel, S., Bidaud, I., et al. (2014). Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of "funny" (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. Nat Commun 5, 4664.

Mesirca, P., Torrente, A.G., and Mangoni, M.E. (2015). Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. Front Physiol 6, 19.

Opthof, T., de Jonge, B., Masson-Pevet, M., Jongsma, H.J., and Bouman, L.N. (1986). Functional and morphological organization of the cat sinoatrial node. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 18, 1015–1031.

Saponaro, A., Cantini, F., Porro, A., Bucchi, A., DiFrancesco, D., Maione, V., Donadoni, C., Introini, B., Mesirca, P., Mangoni, M.E., et al. (2018). A synthetic peptide that prevents cAMP regulation in mammalian hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. Elife 7.

Schweizer, P.A., Duhme, N., Thomas, D., Becker, R., Zehelein, J., Draguhn, A., Bruehl, C., Katus, H.A., and Koenen, M. (2010). cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. Circ Arrhythm Electrophysiol 3, 542–552.

Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renström, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschütz, R., et al. (2004). Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca 2+ channels. J. Clin. Invest. 113, 1430–1439.

Torrente, A.G., Mesirca, P., Neco, P., Rizzetto, R., Dubel, S., Barrere, C., Sinegger-Brauns, M., Striessnig, J., Richard, S., Nargeot, J., et al. (2016). L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca2+ release during sino-atrial node pacemaker activity. Cardiovasc. Res. 109, 451–461.

Toyoda, F., Mesirca, P., Dubel, S., Ding, W.-G., Striessnig, J., Mangoni, M.E., and Matsuura, H. (2017). CaV1.3 L-type Ca2+ channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na+ current. Sci Rep 7, 7869.

Tsutsui, K., Florio, M.C., Yang, A., Wirth, A.N., Yang, D., Kim, M.S., Ziman, B.D., Bychkov, R., Monfredi, O.J., Maltsev, V.A., et al. (2021). cAMP-Dependent Signaling Restores AP Firing in Dormant SA Node Cells via Enhancement of Surface Membrane Currents and Calcium Coupling. Front Physiol 12, 596832.

Van Borren, M.M.G.J., Verkerk, A.O., Wilders, R., Hajji, N., Zegers, J.G., Bourier, J., Tan, H.L., Verheijck, E.E., Peters, S.L.M., Alewijnse, A.E., et al. (2010). Effects of muscarinic receptor stimulation on Ca2+ transient, cAMP production and pacemaker frequency of rabbit sinoatrial node cells. Basic Res Cardiol 105, 73–87.

Verheijck, E.E., van Ginneken, A.C., Bourier, J., and Bouman, L.N. (1995). Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. Circ. Res. 76, 607–615.

Verheijck, E.E., van Ginneken, A.C., Wilders, R., and Bouman, L.N. (1999). Contribution of L-type Ca2+ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. Am. J. Physiol. 276, H1064-1077.

Verheijck, E.E., van Kempen, M.J., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongsma, H.J., and Bouman, L.N. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. Cardiovasc. Res. 52, 40–50.

Vinogradova, T.M., Zhou, Y.Y., Bogdanov, K.Y., Yang, D., Kuschel, M., Cheng, H., and Xiao, R.P. (2000). Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation. Circ Res 87, 760–767.

Vinogradova, T.M., Zhou, Y.-Y., Maltsev, V., Lyashkov, A., Stern, M., and Lakatta, E.G. (2004). Rhythmic ryanodine receptor Ca2+ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. Circ. Res. 94, 802–809.

Vinogradova, T.M., Lyashkov, A.E., Zhu, W., Ruknudin, A.M., Sirenko, S., Yang, D., Deo, S., Barlow, M., Johnson, S., Caffrey, J.L., et al. (2006). High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca2+ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. Circ Res 98, 505–514.

Vinogradova, T.M., Sirenko, S., Lyashkov, A.E., Younes, A., Li, Y., Zhu, W., Yang, D., Ruknudin, A.M., Spurgeon, H., and Lakatta, E.G. (2008). Constitutive phosphodiesterase activity restricts spontaneous beating rate of cardiac pacemaker cells by suppressing local Ca2+ releases. Circ Res 102, 761–769.

Vinogradova, T.M., Brochet, D., Sirenko, S., Li, Y., Spurgeon, H., and Lakatta, E.G. (2010). Sarcoplasmic reticulum Ca2+ pumping kinetics regulates timing of local Ca2+ releases and spontaneous beating rate of rabbit sinoatrial node pacemaker cells. Circ Res 107, 767–775.

Weisbrod, D., Khun, S.H., Bueno, H., Peretz, A., and Attali, B. (2016). Mechanisms underlying the cardiac pacemaker: the role of SK4 calcium-activated potassium channels. Acta Pharmacol Sin 37, 82–97.

Yaniv, Y., Lakatta, E.G., and Maltsev, V.A. (2015). From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. Front Physiol 6, 28.

Supplementary material

Supplementary table 1: Comparison of AP parameters between dormant and firing WT SANC

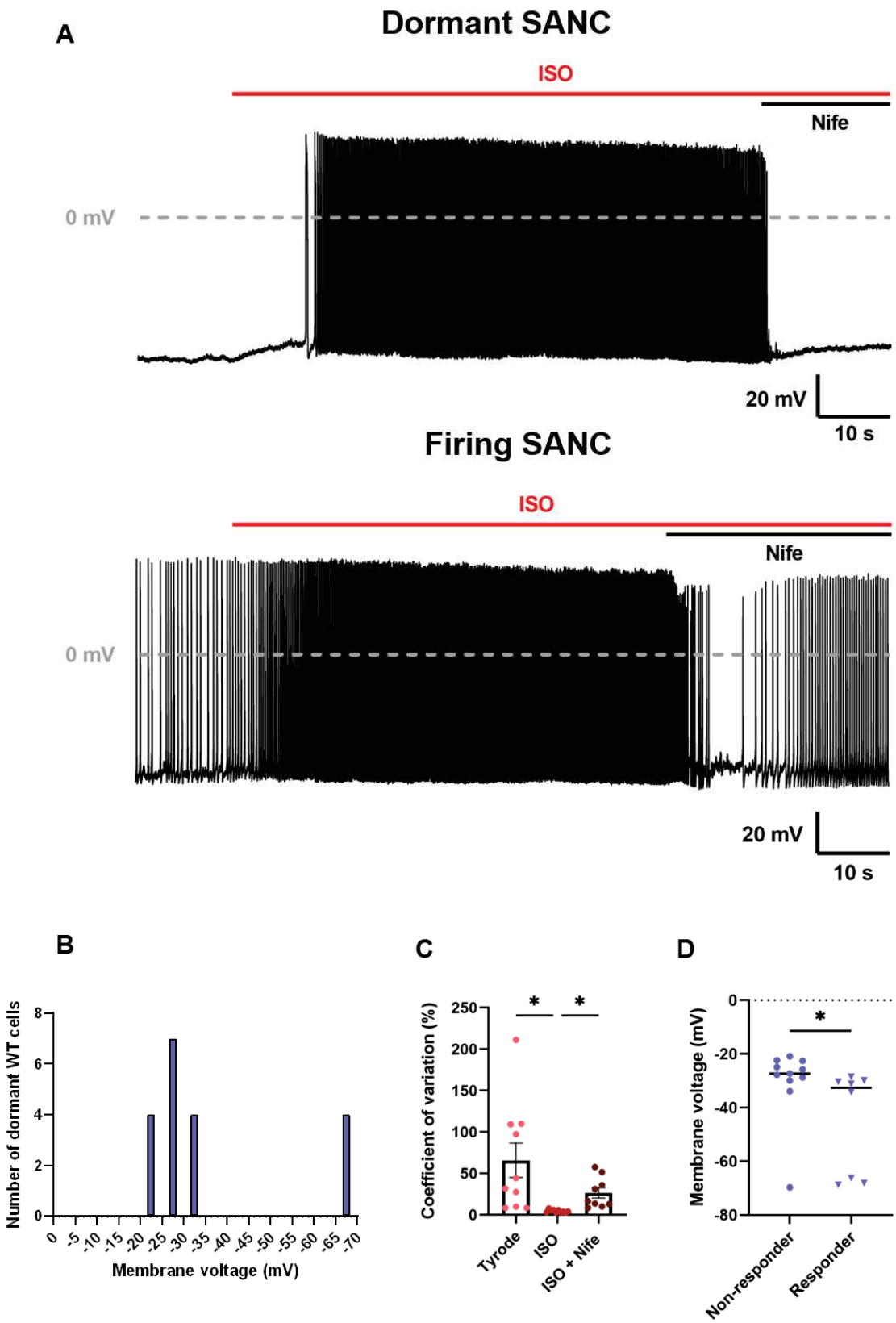
	Firing WT SANC			Responder dormant WT SANC		
	Baseline	ISO	ISO + Nife	Baseline	ISO	ISO + Nife
Frequency (AP.min^{-1})	156 ± 33	409 ± 21****	142 ± 27$^{\$\$\$\$}$	NA	433 ± 30	11
MDP (mV)	- 55.7 ± 1.5	- 57 ± 1.2	- 58.5 ± 1.5	NA	- 58.3 ± 2.6	- 65.1
Linear slope (mV.ms^{-1})	0.037 ± 0.010	0.097 ± 0.018*	0.044 ± 0.007	NA	0.089 ± 0.019	0.016
Exponential slope (mV.ms-1)	0.522 ± 0.067	0.740 ± 0.103*	0.542 ± 0.099	NA	0.579 ± 0.079	0.421
AP threshold (mV)	- 35.5 ± 1.2	- 38.2 ± 1.6	- 33.6 ± 1.9	NA	- 40.6 ± 2.7	- 44.7
Upstroke (mV.ms-1)	24.1 ± 7.4	12.1 ± 4.2	9.6 ± 3.6	NA	12 ± 5.7	5.6
AP amplitude (mV)	82.7 ± 5.8	83.5 ± 4.4	77.1 ± 6.7	NA	81.8 ± 6.1	89
AP duration (ms)	159.7 ± 18.3	111.2 ± 8.5*	133.7 ± 19	NA	96.7 ± 4.7	113.1
Coefficient of variation	0.66 ± 0.21	0.04 ± 0.01*	0.26 ± 0.06$^{\$}$	NA	0.04 ± 0.01	0.83

Data are expressed as mean ± SEM; MDP, maximum diastolic pontential; NA, not applicable
$^{*}p < 0.05$ vs firing SANC at baseline control by one-way ANOVA (parametric) or Friedman test (non parametric)
$^{\$}p < 0.05$ vs firing SANC under ISO perfusion by one-way ANOVA (parametric) or Friedman test (non parametric)
Only n = 1 dormant SANC did not stop under ISO + Nife condition, hence no statistical analysis was done

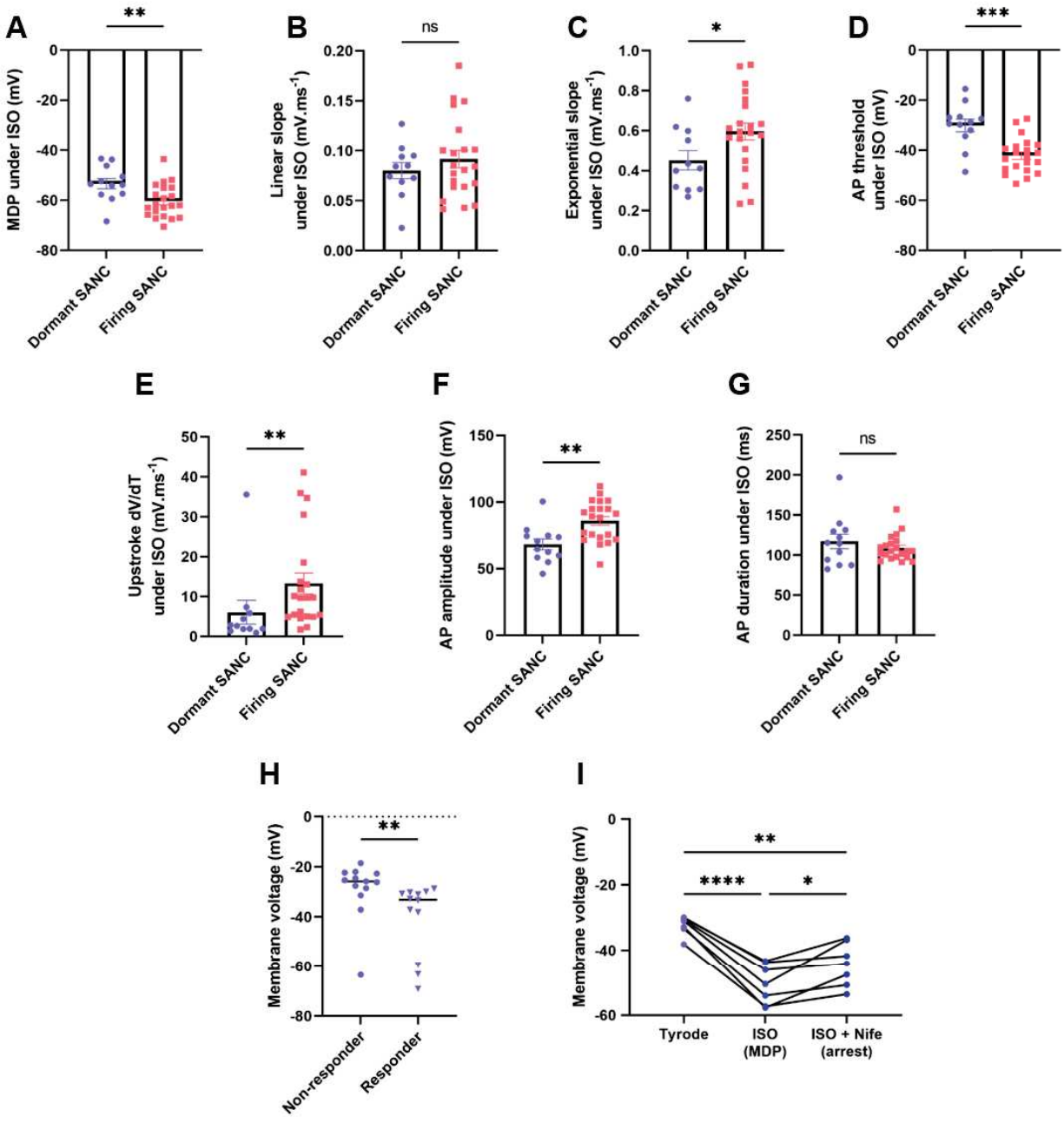
Supplementary table 2: Comparison of AP parameters between WT and $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC in all tested conditions

	Tyrode		ISO		ISO + Nife		ISO	
	WT	$Ca_V1.2^{DHP-/-}$	WT	$Ca_V1.2^{DHP-/-}$	WT	$Ca_V1.2^{DHP-/-}$	WT	$Ca_V1.2^{DHP-/-}$
Frequency (AP.min^{-1})	156 ± 33	197 ± 22	409 ± 21	401 ± 15	142 ± 27	176 ± 30	433 ± 30	320 ± 46
MDP (mV)	- 55.7 ± 1.5	- 59.8 ± 1.5	- 57 ± 1.2	- 60.3 ± 1.4	- 58.5 ± 1.5	- 61.7 ± 1.6	- 58.3 ± 2.6	- 53.4 ± 2
Linear slope (mV.ms^{-1})	0.037 ± 0.010	0.042 ± 0.005	0.097 ± 0.018	0.092 ± 0.009	0.044 ± 0.007	0.053 ± 0.004	0.089 ± 0.019	0.080 ± 0.008
Exponential slope (mV.ms-1)	0.522 ± 0.067	0.317 ± 0.019***	0.740 ± 0.103	0.596 ± 0.042	0.542 ± 0.099	0.340 ± 0.018*	0.579 ± 0.079	0.452 ± 0.046
AP threshold (mV)	- 35.5 ± 1.2	- 43.7 ± 1.5**	- 38.2 ± 1.6	- 42.2 ± 1.5	- 33.6 ± 1.9	- 41.7 ± 1.7**	- 40.6 ± 2.7	- 30.1 ± 2.5*
Upstroke (mV.ms-1)	24.1 ± 7.4	13.9 ± 2.8	12.1 ± 4.2	13.3 ± 2.6	9.6 ± 3.6	13.4 ± 2.8	12 ± 5.7	6.1 ± 2.9
AP amplitude (mV)	82.7 ± 5.8	82.3 ± 2.9	83.5 ± 4.4	85.9 ± 3.3	77.1 ± 6.7	89.1 ± 4	81.8 ± 6.1	68.3 ± 4
AP duration (ms)	159.7 ± 18.3	133.6 ± 4.4	111.2 ± 8.5	108.9 ± 3.5	133.7 ± 19	111.4 ± 4.3	96.7 ± 4.7	117.1 ± 9.1
Coefficient of variation	0.66 ± 0.21	0.42 ± 0.12	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.26 ± 0.06	0.47 ± 0.15	0.04 ± 0.01	0.43 ± 0.22

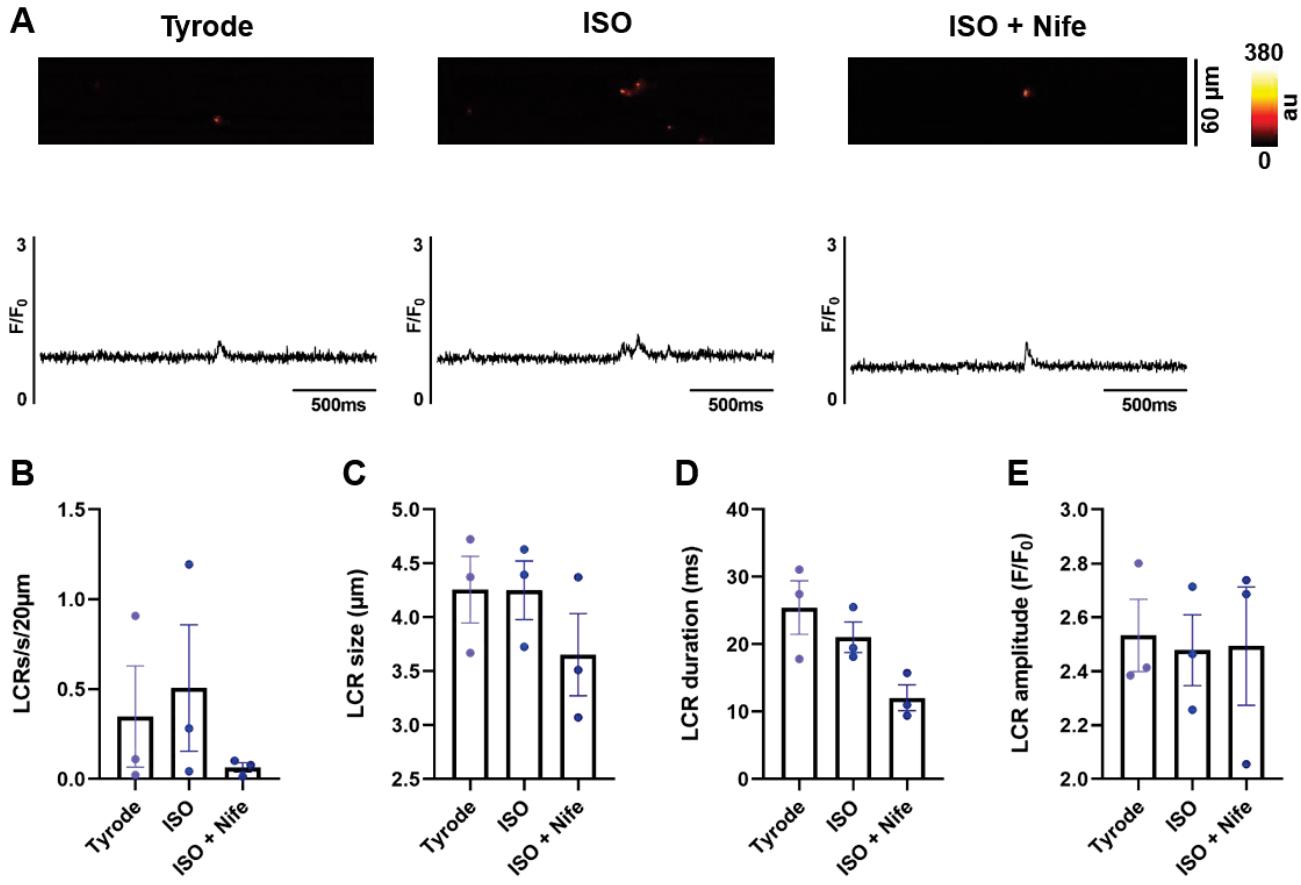
Data are expressed as mean ± SEM; MDP, maximum diastolic pontential
$^{*}p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$ vs WT SANC by unpaired t-test (parametric) or Mann-Whitney test (non parametric)



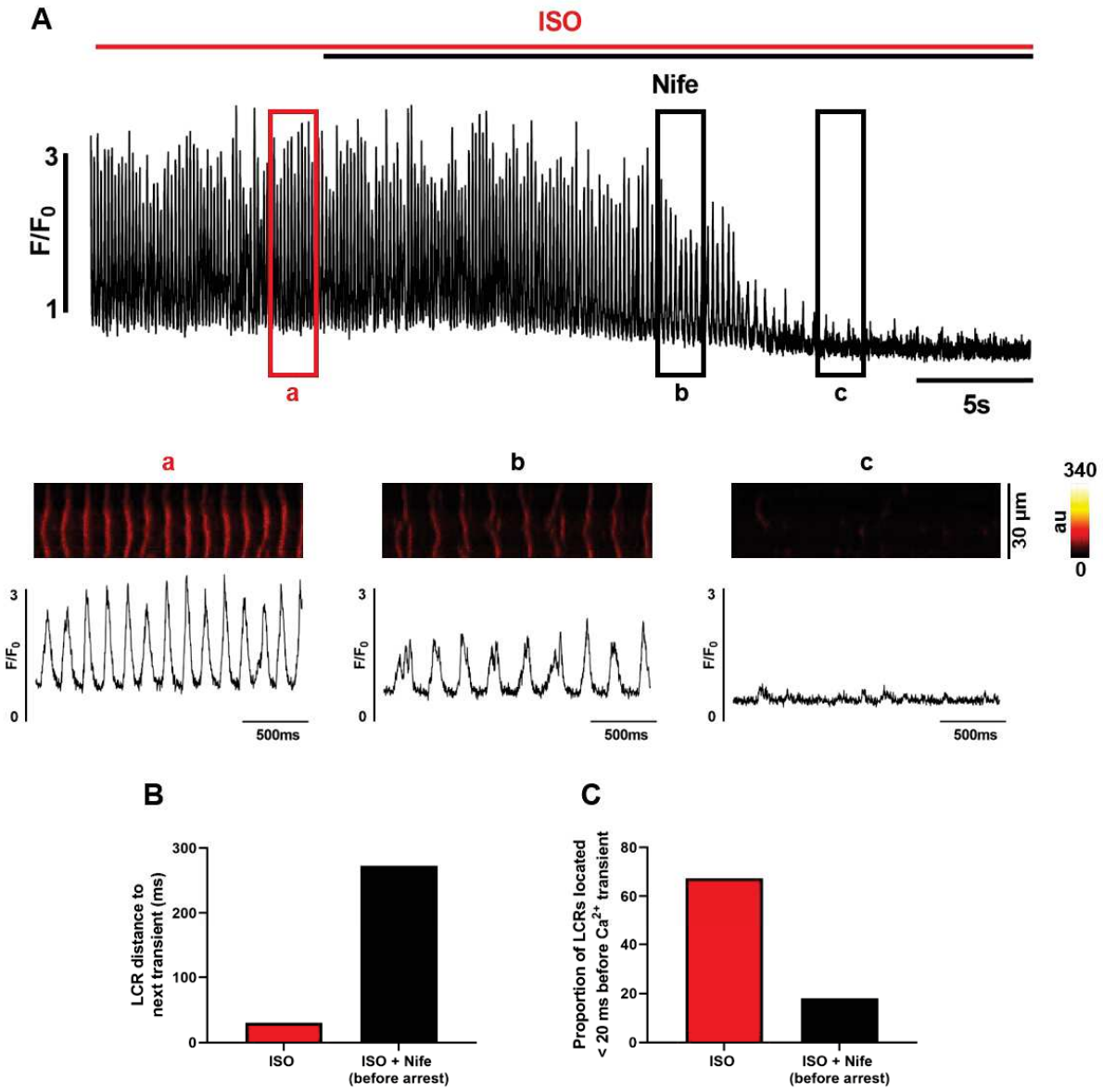
Supplementary figure 1: (A) Representative trace of a dormant and firing WT SANC under adrenergic stimulation (ISO 100 nM) and subsequent perfusion of Nifedipine (3 µM). (B) Histogram of the membrane potential of dormant WT SANC at baseline. (C) Mean coefficient of variation of WT firing SANC under ISO and ISO + Nife perfusion. (D) Comparison of membrane voltage between the WT dormant SANC that started firing under adrenergic stimulation (responder) and the ones that did not (non-responder).



Supplementary figure 2: Comparison of AP parameters under adrenergic stimulation (ISO 100 nM) between dormant and firing $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC (A-G). Data are represented as mean + SEM. (H) Comparison of membrane voltage between the $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ dormant SANC that started firing under adrenergic stimulation (responder) and the ones that did not (non-responder). (I) Comparison of membrane potential (Vm) under Tyrode, MDP under ISO 100 nM and Vm under ISO + Nife 3 µM in dormant $Ca_V1.2^{DHP-/-}$ SANC that stopped firing upon $Ca_V1.3$ inhibition. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 by unpaired t-test (A-H) or one-way ANOVA (I).



Supplementary figure 3: (A) Line-scan and corresponding time-course of Ca^{2+} fluorescence in dormant $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC that did not respond to β-adrenergic stimulation along with the average number (B), size (C), duration (D) and amplitude (E) of LCRs.



Supplementary figure 4: (A) Time course of Ca^{2+} fluorescence in an example of dormant $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC that stopped firing under $Ca_v1.3$ inhibition. Line-scan and time-course of Ca^{2+} fluorescence of specific time points (a, b and c squares) are represented below. Average distance between LCRs and following Ca^{2+} transient (B) and proportion of LCRs located < 20 ms before Ca^{2+} transient in the two $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SANC in which early effects of $Ca_v1.3$ inhibition could be observed.

Résultats supplémentaires

Les résultats présentés dans le papier montrent que les canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ sont essentiels pour maintenir une activité électrique spontanée induite par une stimulation adrénergique dans des cellules sinusales isolées (SANC) dormantes. En effet, l'inhibition pharmacologique de $Ca_v1.3$ par la Nifédipine (Nife) stoppe totalement l'activité spontanée des SANC dormantes sous stimulation adrénergique (Isoprénaline, ISO). Afin de vérifier si les canaux $Ca_v1.3$ étaient également impliqués dans le mécanisme d'induction de l'activité spontanée par une stimulation adrénergique, un protocole inverse à celui présenté dans le papier a été testé. Ainsi, au lieu d'étudier l'effet de l'inhibition de $Ca_v1.3$ après une stimulation avec de l'ISO, nous avons regardé si la délétion génétique de $Ca_v1.3$ ou son inhibition pharmacologique empêchaient l'induction d'une activité électrique spontanée par la stimulation adrénergique dans des SANC dormantes.

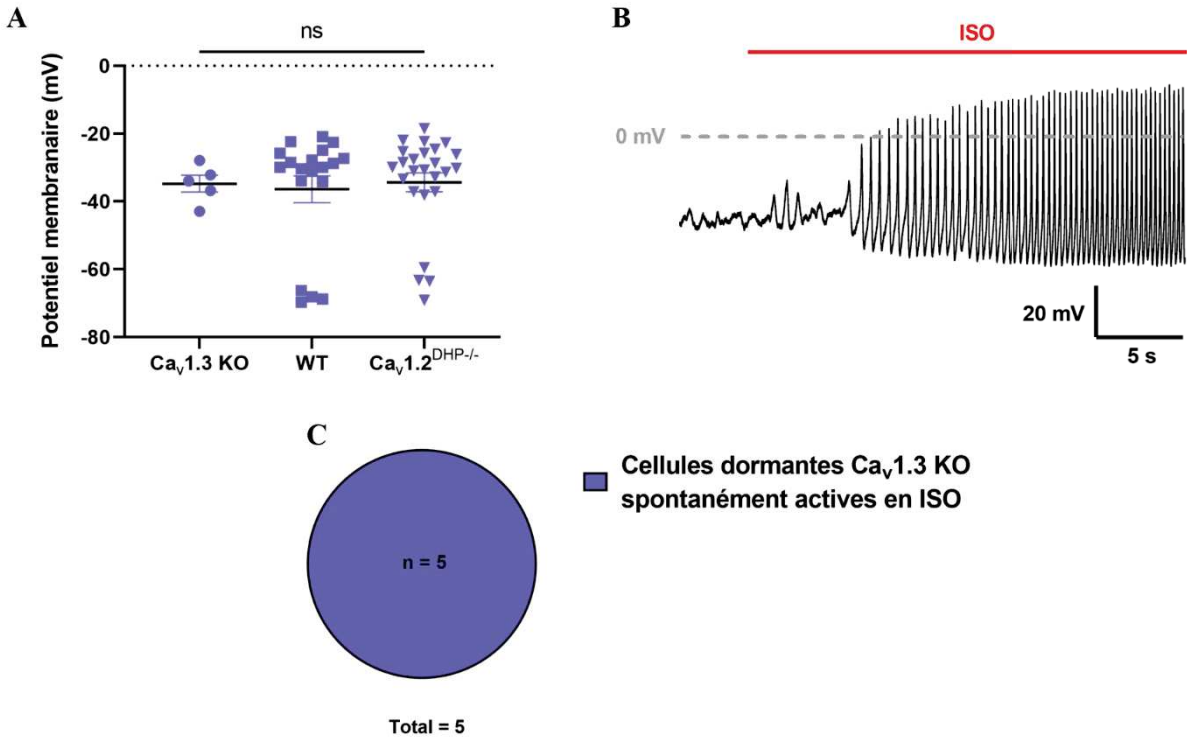


Figure 39 : La délétion génétique de $Ca_v1.3$ n'empêche pas la stimulation adrénergique d'induire une activité électrique spontanée dans des cellules sinusales dormantes. (A) Comparaison du potentiel membranaire basal de cellules dormantes issues de souris $Ca_v1.3^{-/-}$, WT et $Ca_v1.2^{DHP-/-}$. (B) Tracé exemple de l'apparition de PA spontanés dans une cellule dormante $Ca_v1.3^{-/-}$ sous stimulation adrénergique (ISO 100 nM). (C) Proportion de cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ répondant à la stimulation adrénergique (PAs spontanés).

La délétion génétique de $Ca_v1.3$ n'empêche pas l'induction d'une activité spontanée par la stimulation adrénergique dans les SANC dormantes

L'activité électrique spontanée de 5 SANC dormantes isolées à partir de 4 cœurs de souris $Ca_v1.3^{-/-}$ a été étudiée par la technique du patch perforé. A l'instar de ce qui a été observé chez les SANC dormantes isolées de souris WT ou $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ (Figure 2, Supplementary Figure 1 et 2 du papier), les SANC dormantes $Ca_v1.3^{-/-}$ sont dépolarisées aux alentours de -35 mV. Aucune différence statistique n'est observée entre le potentiel membranaire en condition basale des SANC $Ca_v1.3^{-/-}$, WT, et $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ ($Ca_v1.3^{-/-}$: -34,8 ± 2,5 ; WT : -26,4 ± 4 ; $Ca_v1.2^{DHP-/-}$: - 34,4 ± 2,8 mV) (Figure 39 A). De manière surprenante, les 5 cellules dormantes ont répondu à une stimulation adrénergique avec 100 nM d'ISO et ont commencé à avoir une activité électrique spontanée (Figure 39 B,C). Ainsi, la délétion génétique de $Ca_v1.3$ n'empêche pas l'induction d'une activité électrique spontanée sous stimulation adrénergique dans des SANC dormantes, indiquant que les canaux $Ca_v1.3$ ne semblent pas impliqués dans ce mécanisme.

L'inhibition pharmacologique de $Ca_v1.3$ peut empêcher l'induction d'une activité spontanée par la stimulation adrénergique dans les SANC dormantes

La délétion d'un gène entraîne souvent des phénomènes de compensation, c'est-à-dire qu'il peut y avoir des régulations de l'expression d'autres protéines pour pallier l'absence de la protéine d'intérêt. Ainsi, afin de vérifier les résultats obtenus sur les SANC $Ca_v1.3^{-/-}$, les canaux $Ca_v1.3$ ont été inhibés par 3 µM de Nifédipine préalablement à une stimulation adrénergique par 100 nM d'ISO dans des SANC $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormantes (Figure 40). Sur les 14 cellules étudiées, la moitié n'a pas répondu à la stimulation adrénergique, les cellules restant dormantes. Sur les 7 cellules qui ont répondu, 4 ont commencé à avoir une activité électrique spontanée sous perfusion d'ISO alors que les canaux $Ca_v1.3$ étaient toujours inhibés par la Nifédipine, reproduisant les résultats obtenus sur les SANC $Ca_v1.3$ KO. Cependant, il est intéressant de constater ici que, pour 3 cellules, l'inhibition de $Ca_v1.3$ empêche l'induction d'une activité spontanée par l'ISO. En effet, les cellules n'ont commencé à avoir des PAs spontanés seulement lorsque la perfusion de la Nifédipine a été arrêtée et que les cellules n'étaient plus que sous stimulation adrénergique. Ainsi, il semblerait que, finalement, les canaux $Ca_v1.3$ puissent contribuer au mécanisme d'induction d'une activité spontanée par une stimulation adrénergique dans des SANC dormantes. Cependant, les canaux $Ca_v1.3$ ne semblent pas être les acteurs

majoritaires de ce mécanisme puisque certaines cellules répondent tout de même à la stimulation sous inhibition de $Ca_v1.3$ (Figure 40).

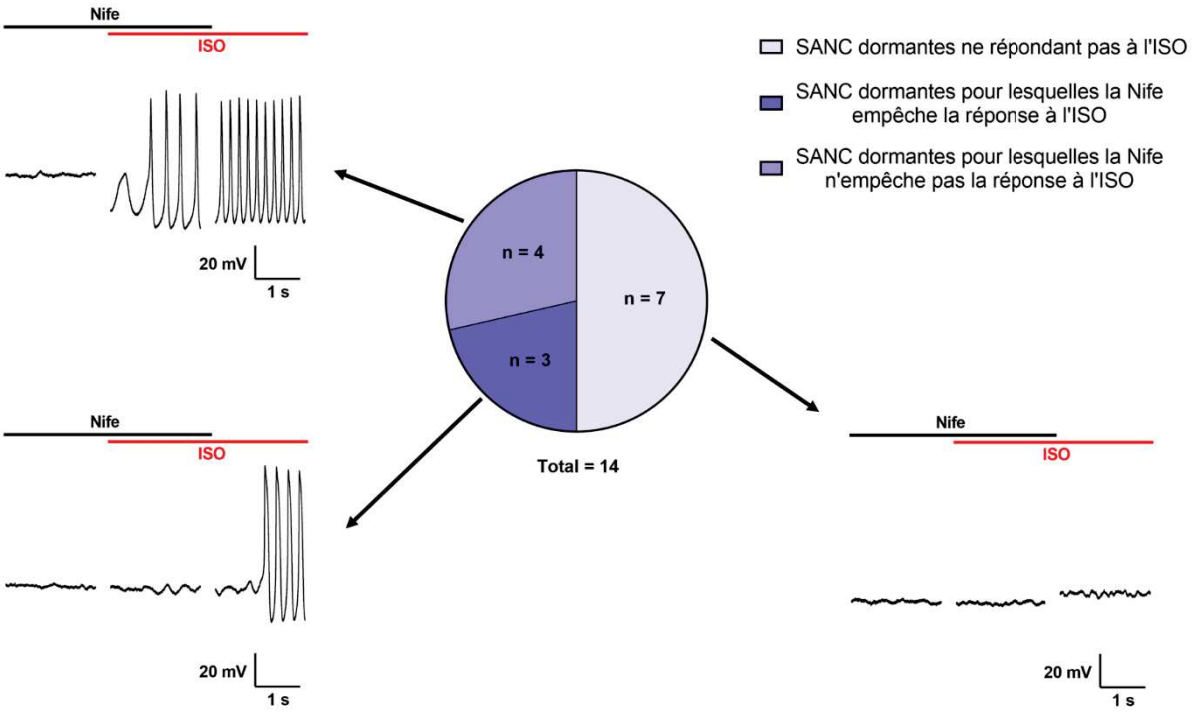


Figure 40 : Proportion de SANC $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ ayant répondu (tracés de gauches) ou non (tracé de droite) à la stimulation adrénergique. Parmi les cellules pouvant répondre à la stimulation adrénergique, l'inhibition pharmacologique de $Ca_v1.3$ par la Nifédipine a empêché la réponse (trace en bas à gauche) ou non (trace en haut à gauche).

Les SANC dormantes et firing ne semblent pas dépendre des mêmes mécanismes de régulation de leur fréquence de dépolarisation par stimulation adrénergique

Afin de déterminer l'importance des canaux HCN4 dans la régulation adrénergique, le courant I_f a été inhibé par 3 µM de ZD7288 après stimulation adrénergique avec 100 nM d'ISO (Figure 41). Des résultats préliminaires sur 2 cellules $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormantes montrent que l'inhibition d'I_f n'a aucun effet sur la fréquence des PAs induits par la stimulation adrénergique. Au contraire, une inhibition subséquente de $Ca_v1.3$ par 3 µM de Nifédipine stoppe totalement l'activité électrique spontanée, qui reprend lorsque l'inhibition de $Ca_v1.3$ est levée (Figure 41 A,C). De manière intéressante, à l'instar de l'inhibition de $Ca_v1.3$ dans les cellules spontanément actives en condition basale (SANC firing) (Figure 2 du papier), l'inhibition du courant I_f inverse les effets de la stimulation adrénergique : la fréquence revient à un niveau basal (Figure 41 B,D). Il a également été possible de tester une inhibition subséquente de $Ca_v1.3$

sur 1 des 3 SANC $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ firing étudiées. L'inhibition successive de HCN4 et $Ca_v1.3$ a stoppé l'activité électrique spontanée : la cellule est devenue dormante alors qu'elle était spontanément active en condition basale (Figure 41 B,D).

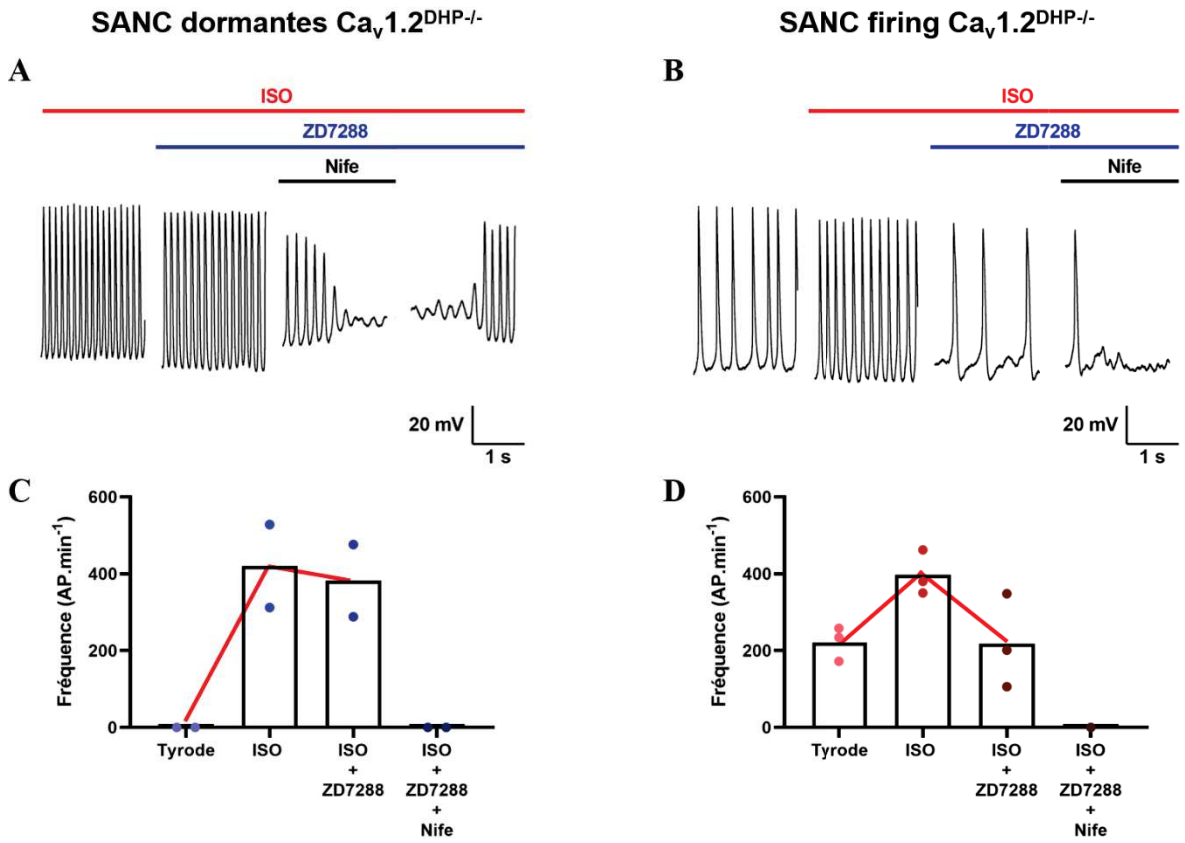


Figure 41 : Les cellules dormantes et firing n'ont pas la même sensibilité à l'inhibition du courant I_f en contexte de stimulation adrénergique. Exemple d'enregistrement de l'activité électrique spontanée avec la fréquence des PAs associée dans des cellules $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormantes (A, C) et firing (B, D).

Ainsi, pour les SANC $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ firing, les canaux HCN4 et $Ca_v1.3$ semblent avoir la même contribution dans l'accélération de la fréquence de dépolarisation par la stimulation adrénergique, l'inhibition de l'un ou l'autre inversant totalement les effets de l'ISO. Au contraire, les SANC $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormantes semblent seulement dépendre de $Ca_v1.3$ pour induire une activité spontanée sous stimulation adrénergique, l'inhibition d'I_f n'ayant aucun effet tandis que l'inhibition de $Ca_v1.3$ stoppe l'activité.

Discussion

La génération de l'activité électrique au sein des SANC implique des mécanismes encore largement controversés de nos jours. Notamment, l'implication et les rôles des acteurs ioniques tels que HCN4, $Ca_v1.3$ ou RyR2 reste source de débats. Existe-t-il un courant pacemaker comme initialement supposé pour le courant I_f ? Est-ce que les canaux ioniques sarcolemmaux sont responsables de l'activité pacemaker ou bien est-ce la dynamique calcique intracellulaire ? Si ces deux mécanismes sont couplés, est-ce que les LCRs initient bien la dépolarisation diastolique comme stipulé par la théorie du *coupled-clock* ? La réponse à ces questions n'est pas simple, sans compter qu'il faut ajouter l'influence des régulations adrénergiques et muscariniques à l'équation. En effet, la fréquence cardiaque est constamment régulée par ces deux systèmes afin de rester dans une gamme de fréquence physiologique (Scalco *et al.*, 2021). Notamment, le cœur de souris est sous tonus sympathique en condition basale puisque l'inhibition pharmacologique du système nerveux autonome diminue la fréquence cardiaque du cœur de souris (Gehrmann *et al.*, 2000). Il est donc important de considérer l'influence de la régulation adrénergique dans la génération de l'activité électrique spontanée chez la souris, d'autant plus que la stimulation adrénergique cible directement la PKA qui, avec la CaMKII, permet de coupler les deux horloges membranaire et calcique (Lakatta *et al*., 2010).

Dans la version la plus couramment acceptée de la théorie du *coupled-clock* les canaux calciques de type L ont un rôle secondaire (Lyashkov *et al.*, 2018). De précédents travaux de l'équipe montrent pourtant que $Ca_v1.3$ est très important dans la génération du pacemaking et notamment dans la génération de la dépolarisation diastolique. Premièrement, le PA des cellules pacemaker $Ca_v1.3^{-/-}$ est normal, seules la fréquence et la génération du PA sont impactées par la délétion du canal. Deuxièmement, le canal $Ca_v1.3$ conduit du courant lors de la DD et contribue donc à cette dernière (Baudot *et al*., 2020; Mangoni *et al*., 2003; Torrente *et al.*, 2016). A leur tour, mes travaux de thèse mettent maintenant en lumière un nouveau rôle de $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique chez la souris. Premièrement, nos résultats démontrent que les canaux $Ca_v1.3$ sont essentiels pour maintenir une activité électrique spontanée dans des SANC dormantes en contexte de stimulation adrénergique. Dans un second temps, mes travaux attestent d'un rôle central de $Ca_v1.3$ dans le couplage des horloges membranaire et calcique sous tonus sympathique. Notamment, les canaux $Ca_v1.3$ régulent la synchronisation spatiale et temporelle des LCRs, ce qui permet d'initier le PA sinusal.

Les canaux $Ca_v1.3$ sont des acteurs clés de l'activité spontanée des SANC dormantes en contexte de stimulation adrénergique

La majorité des SANC isolées de cœurs de souris présentent un phénotype dormant, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas d'activité électrique spontanée et que leur potentiel membranaire reste dépolarisé (Figure 1 et 2 du papier). De plus, certaines SANC spontanément actives en condition basale (SANC firing) ne sont pas régulières (coefficient de variation > 0,2) (Table 1 du papier). Comparé à un rythme régulier du NSA *in vivo*, l'existence de ces cellules dormantes ou irrégulières semble plutôt surprenante. Historiquement, les SANC dormantes étaient considérées comme des cellules « endommagées » par la dissociation enzymatique, sinon, comment expliquer une activité spontanée du NSA mais un état de dormance des SANC isolées ? Pourtant, de précédentes études ont montré qu'il était possible de rendre quiescentes des SANC ayant des PAs ou transitoires calciques spontanés par inhibition pharmacologique d'I_{Kr} (Verheijck *et al.*, 1995), d'$I_{Ca,L}$ (Verheijck *et al.*, 1999), de la PKA (Vinogradova *et al.*, 2006), de la CaMKII (Vinogradova *et al.*, 2000) ou par stimulation vagale accentuée avec de fortes doses d'acétylcholine (Van Borren et al., 2010). Il devient alors facile d'imaginer l'effet inverse : des cellules dormantes en condition basale qui peuvent acquérir une activité spontanée si elles sont stimulées de la bonne manière. Dans cette logique, *Kim et al*. ont été les premiers à démontrer qu'une stimulation adrénergique pouvait induire une activité spontanée dans des SANC dormantes de cobaye ce qui prouve que les cellules dormantes sont fonctionnelles (Kim et al., 2018). Ici, nous montrons que des SANC dormantes de souris peuvent également être « réveillées » par une stimulation adrénergique, ce qui montre que ce phénomène n'est pas restreint à une seule espèce (Figure 1, 2 et 3 du papier). En outre, ce phénomène est aussi observé dans des SANC dormantes humaines (Tsutsui *et al*., 2018). Cependant, la possibilité que certaines SANC soient bel et bien endommagées par la dissociation enzymatique, notamment les SANC dormantes qui ne répondent pas à la stimulation adrénergique, ne peut être entièrement exclue. Néanmoins, il a été montré récemment que les courants I_f, $I_{Ca,L}$ et K^+ repolarisants I_K augmentaient sous stimulation adrénergique dans des SANC ne répondant pas à la stimulation (restant dormantes), et ce, de la même manière que pour les SANC répondant à la stimulation (Tsutsui *et al.*, 2021). Il semble alors évident que la voie adrénergique est préservée dans ces SANC dormantes ne répondant pas à la stimulation. De plus, les SANC dormantes ont été observées *ex vivo* dans le tissu sinusal intact de souris (Bychkov *et al.*, 2020; Fenske *et al.*, 2020) ce qui laisse présager leur existence *in vivo*. Ainsi, il devient de plus en plus évident que les cellules sinusales dormantes ne sont pas des artefacts de la digestion enzymatique. En revanche, leur rôle physiologique n'a toujours pas été élucidé.

La transition d'un état dormant à un état spontanément actif (firing) est permise grâce à l'augmentation de la signalisation AMPc-PKA qui hyperpolarise la membrane jusqu'à atteindre la gamme de voltage de la DD (Supplementary Figure 2I du papier). De manière intéressante, les SANC ne répondant pas à la stimulation adrénergique étaient significativement dépolarisées comparées aux SANC répondant à la stimulation (Supplementary Figure 2H du papier). Cela sous-entend que l'hyperpolarisation provoquée par l'augmentation de la signalisation AMPc-PKA n'est pas suffisante si la cellule dormante est trop dépolarisée. Nous avons montré que les canaux $Ca_v1.3$ étaient essentiels dans ce firing induit par la stimulation adrénergique puisque leur inhibition pharmacologique arrête totalement l'automaticité des SANC dormantes (Figure 2 et 3 du papier). Il est intéressant de constater que le potentiel membranaire des SANC dormantes arrêtées est légèrement dépolarisé sous inhibition de $Ca_v1.3$, comparé à la MDP sous stimulation adrénergique seule, mais ne revient pas pour autant au niveau de dépolarisation basal (~ -35mV) (Supplementary Figure 2I du papier). Cela montre que les canaux $Ca_v1.3$ sont essentiels pour maintenir le firing induit par la stimulation adrénergique et qu'ils sont impliqués, dans une moindre mesure, dans le phénomène d'hyperpolarisation des SANC dormantes. En effet, l'inhibition préalable de $Ca_v1.3$ n'a pu empêcher le firing induit par la stimulation adrénergique que dans une faible proportion de SANC $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ dormantes, tandis que la délétion génétique n'a pas non plus empêché l'apparition du firing (Figure 39, 40). Cela montre bien que les canaux $Ca_v1.3$ ne jouent qu'un faible rôle dans le phénomène d'hyperpolarisation et que d'autres acteurs sont sûrement impliqués, comme par exemple les canaux K^+ activés par le calcium (Weisbrod *et al.*, 2016). De manière intéressante, il a été récemment démontré qu'un état dormant pouvait être induit dans des SANC de souris en bloquant la fixation de l'AMPc aux canaux HCN4 par un peptide (TAT-TRIP8b$_{nano}$) qui se fixe également sur le domaine CNBD (Fenske *et al.*, 2020). Ainsi, la régulation directe des canaux HNC4 par l'AMPc pourrait être impliquée dans la transition dormance-firing.

Les canaux $Ca_v1.3$ régulent le couplage des horloges membranaire et calcique en réponse à une stimulation adrénergique

La stimulation β-adrénergique accélère la fréquence cardiaque en stimulant la voie AMPc-PKA qui phosphoryle à la fois des acteurs de l'horloge membranaire ($Ca_v1.3$, $Ca_v1.2$) et de l'horloge calcique (RyR2, PLB), tandis que les canaux HCN4 sont directement régulés par l'AMPc (Mangoni and Nargeot, 2008). Ici, nous montrons que les SANC dormantes ont une réduction des courants I_f et $I_{Cav1.3}$, du nombre de LCRs et de la concentration calcique intracellulaire diastolique comparé aux SANC firing, ce qui suggère un découplage des deux horloges (Figure 7 du papier). De manière intéressante, l'activité de la SERCA et la charge Ca^{2+}

du réticulum ne semblent pas impacter dans les SANC dormantes, en témoigne l'absence de différence significative de la charge Ca^{2+} et de la constante de temps *tau* du transitoire induit par la caféine (Figure 7 du papier). *Tsutsui et al*. ont rapporté une diminution du ratio pPLB/PLB dans les SANC dormantes de cobaye comparé aux SANC firing (Tsutsui *et al.*, 2021), ce qui ne semble pas être le cas dans notre étude car cela impliquerait en théorie une réduction de l'activité de la SERCA. Néanmoins, le découplage des SANC dormantes pourrait être la résultante d'une diminution du taux d'APMc intracellulaire et donc des niveaux de phosphorylation des acteurs des deux horloges. Or, dans les SANC, le taux d'AMPc est finement régulé par les AC et les PDE (Vinogradova *et al.*, 2008). Il ne serait donc pas surprenant de découvrir une activité basale des PDE augmentée dans les SANC dormantes comparé aux SANC firing.

La stimulation β-adrénergique restaure donc l'automaticité dans des SANC dormantes, probablement en augmentant les taux d'AMPc intracellulaires et les phosphorylations dépendantes de la PKA. Cette idée est supportée par le fait qu'amener le potentiel membranaire dans la gamme de potentiel de la DD n'est pas suffisant pour maintenir l'automaticité dans des SANC dormantes. En effet, bien qu'il soit possible d'induire un firing spontané dans des SANC dormantes en injectant artificiellement un courant hyperpolarisant, ce firing cesse dès l'instant où le courant est arrêté (Figure 1 du papier). Les phosphorylations induites par la stimulation adrénergique sont donc requises pour maintenir une automaticité dans les SANC dormantes. Parmi les acteurs phosphorylés par la PKA, les canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ semblent être les régulateurs majoritaires de la réponse chronotrope positive. Tout d'abord, dans les SANC dormantes l'automaticité ne peut être maintenue sous inhibition de $Ca_v1.3$. De plus, l'inhibition de $Ca_v1.3$ dans les SANC firing sous stimulation adrénergique diminue la fréquence jusqu'à un niveau basal (Figure 2 du papier). Ainsi, que cela soit dans les SANC dormantes ou firing, l'inhibition de $Ca_v1.3$ ramène les cellules dans leur état basal (dormance pour les SANC dormantes et fréquence basale pour les SANC firing) comme si les cellules n'avaient plus en mémoire le fait d'être sous stimulation adrénergique. Cela est d'autant plus surprenant étant donné que les autres acteurs du pacemaking sont toujours dans leur état phosphorylé ce qui ne semble pourtant pas suffisant pour maintenir une fréquence élevée. De récentes études ont par ailleurs montré que la régulation dépendante de l'AMPc des canaux HCN4 n'était pas requise pour la régulation de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome chez la souris et que d'autres canaux ioniques ou transporteurs doivent être responsables de la réponse chronotropique (Alig *et al.*, 2009; Fenske *et al.*, 2020). Cette idée que les canaux HCN4 ne sont

pas requis pour la réponse chronotrope positive chez la souris est supportée par 2 autres études sur un modèle inductible de souris HCN4 KO (Baruscotti *et al*., 2011; Herrmann *et al.*, 2007) et par une étude sur l'expression inductible dans le cœur d'une sous-unité HCN4 mutante qui ne conduit pas de courant I_f (HCN4-AYA) (Mesirca *et al.,* 2014). Les résultats préliminaires (Figure 41) sur l'inhibition du courant I_f dans les SANC dormantes sous stimulation adrénergique semblent également soutenir cette idée. Ici, nous montrons que les principaux régulateurs de la réponse chronotrope positive chez la souris sont les canaux calciques de type L $Ca_v1.3$.

Les canaux $Ca_v1.3$ font le lien entre l'horloge membranaire et calcique en régulant les LCRs

Une précédente étude de l'équipe a montré que les canaux $Ca_v1.3$ et les LCRs étaient étroitement liés et que le nombre de LCRs diastoliques était diminué dans les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (Torrente *et al*., 2016). Néanmoins, des phénomènes de compensation interviennent souvent dans des souris KO et peuvent entraîner une incertitude quant au rôle physiologique des gènes étudiés. Ainsi, il est toujours utile de vérifier si l'inhibition pharmacologique de la protéine d'intérêt reproduit les résultats observés chez la souris KO. Ici nous montrons donc que l'inhibition pharmacologique de $Ca_v1.3$ par la Nifédipine dans les souris $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ supporte bien l'idée d'une régulation des LCRs par $Ca_v1.3$. En effet, l'inhibition de $Ca_v1.3$ diminue le nombre et la taille des LCRs ainsi que leur synchronisation à la fin de la DD (Figure 4 et 5 du papier). Il a été démontré par modélisation numérique que la synchronisation des LCRs et l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ étaient requis en parallèle d'une augmentation des courants diastoliques (I_f, $I_{Ca,L}$) pour accélérer la fréquence de dépolarisation des SANC en réponse à une stimulation adrénergique (Lyashkov *et al.*, 2018; Maltsev and Lakatta, 2010). Mes résultats supportent ce modèle avec une augmentation de la synchronisation temporelle des LCRs en réponse à une stimulation β-adrénergique. Au contraire, lorsque les canaux $Ca_v1.3$ sont inhibés les LCRs commencent à s'éloigner du transitoire calcique, leur distance moyenne au transitoire suivant augmentant alors que la proportion de LCRs proches du transitoire (< 20 ms) diminue (Figure 5). Cela montre donc que les canaux $Ca_v1.3$ régulent la synchronisation des LCRs. La désynchronisation des LCRs pourrait même être responsable de l'arrêt du firing dans les SANC dormantes car les LCRs se désynchronisent progressivement juste avant que la cellule ne s'arrête (Supplementary Figure 4 du papier), sans compter que l'inhibition du courant entrant $I_{Cav1.3}$ contribuant à la DD ne joue pas en la faveur d'un maintien de l'automaticité. De manière intéressante, cette désynchronisation des LCRs par inhibition de $Ca_v1.3$ ne semble pas être dépendante de l'activité de la SERCA puisque la Nifédipine ne diminue pas le ratio pPLB/PLB

(Figure 6 du papier). De plus, nous avons déjà montré que les canaux $Ca_v1.3$ colocalisaient de préférence avec RyR2 ce qui suggère une proximité spatiale (Christel *et al.*, 2012). Tout cela indique donc qu'il y a un lien direct entre l'activation de $Ca_v1.3$ et les LCRs. Ainsi, la synchronisation des LCRs sous stimulation β-adrénergique pourrait être due à une augmentation du courant $I_{Cav1.3}$ et du phénomène de CICR durant la diastole, ou à un changement de conformation de RyR2 et $Ca_v1.3$ induit par phosphorylation, ou bien les deux.

Rôle physiologique des SANC dormantes *in vivo*

Quel pourrait bien être le rôle des SANC dormantes *in vivo* ? Bien qu'elles aient pour l'instant été majoritairement observées *in vitro*, deux études ont montré qu'elles étaient présentes *ex vivo* sur tissu NSA intact (Bychkov *et al.*, 2020; Fenske *et al.*, 2020). De là à supposer qu'elles sont également présentes *in vivo*, il n'y a qu'un pas que je franchis. *Hennis et al*. suggèrent qu'*in vivo*, les SANC dormantes agiraient en tant que « freins » pour les SANC firing voisines par hyperpolarisation électrotonique *via* les jonctions communicantes (Hennis *et al*., 2021). Il est cependant important de noter ici qu'ils basent leur observation sur des SANC dormantes hyperpolarisées (~ -75 mV) obtenues par abolition de la régulation directe des canaux HCN4 par l'AMPc (Fenske *et al*., 2020). Or la majorité des SANC dormantes dans notre étude sont dépolarisées (~ -35 mV), sans compter que la régulation des canaux HCN4 par l'APMc est toujours fonctionnelle dans ces cellules. De manière intéressante, ce potentiel dépolarisé aux alentours de – 35 mV semble lié à la dynamique calcique intracellulaire étant donné que la chélation de Ca^{2+} par le BAPTA arrête des SANC de cobaye dans cette même gamme de potentiel (Capel and Terrar, 2015). Ainsi la diminution de $[Ca^{2+}]_i$ semble induire un état dormant dépolarisé, or les SANC dormantes ont bien une diminution significative de $[Ca^{2+}]_i$ comparé aux SANC firing (Figure 7 du papier). L'hypothèse d'un « frein » des SANC adjacentes par interaction électrotonique n'est donc pas applicable pour notre étude, mais cela pourrait indiquer qu'il existe différents états dormants des SANC.

L'existence d'une hétérogénéité du tissu NSA en terme de comportements, formes et expression protéique des SANC est loin d'être nouvelle (Boyett *et al.*, 2000; Mangoni and Nargeot, 2008; Verheijck *et al*., 2001). Le site d'initiation de l'impulsion électrique au sein du NSA se déplace même en fonction des stimuli extérieurs tel qu'une stimulation adrénergique ou cholinergique, ce qui témoigne d'une adaptabilité impressionnante du NSA à différentes contraintes (Lang *et al*., 2011). Ici, nous montrons qu'il y a une distribution spatiale hétérogène de $Ca_v1.3$ et HCN4 à travers le NSA et même parmi les SANC isolées (Figure 8 du papier). Tout cela appuie l'idée de l'existence de mécanismes pacemaker différents. En effet, pourquoi

l'inhibition de $Ca_v1.3$ stoppe totalement l'automaticité des SANC dormantes alors qu'elle diminue seulement la fréquence dans les SANC firing ? Si on imagine des mécanismes pacemaker différents, c'est-à-dire par exemple que dans les SANC dormantes le mécanisme pacemaker en contexte de stimulation adrénergique est principalement dépendant de $Ca_v1.3$ tandis que dans les SANC firing il est dépendant à la fois de $Ca_v1.3$ et HCN4, cela pourrait répondre à la question précédente. Le fait que l'inhibition de HCN4 n'a aucun effet sur la fréquence des SANC dormantes sous stimulation adrénergique alors qu'elle diminue la fréquence des SANC firing à un niveau basal supporte cette idée (Figure 41). Toujours en lien avec cette idée de mécanismes pacemaker différents, la fréquence de dépolarisation des SANC est identique sous stimulation adrénergique dans les cellules dormantes et firing alors que les paramètres du PA sont significativement différents entre les deux types de cellules (Supplementary Figure 2 du papier). Cela montre donc que les SANC dormantes peuvent atteindre la même fréquence élevée que les SANC firing et peuvent donc servir de cellules auxiliaires de réserve lorsque toutes les SANC sont requises (réponse chronotropique) tout en ayant une expression différente des acteurs du pacemaking ($Ca_v1.3$, HCN4). Dans cette idée, toutes les cellules sinusales ne contribuent pas à la génération de l'impulsion électrique dans le NSA comme cela a été suggéré précédemment pour le NSA de chat (Opthof *et al.*, 1986). Au contraire, des cellules sinusales avec différentes expressions des canaux ioniques sont disséminées à travers tout le NSA et représentent une réserve de SANC capable d'atteindre une fréquence normale en fonction de différents stimuli extérieurs, garantissant une grande adaptabilité du NSA. Dans cette optique, les SANC dormantes sont recrutées par stimulation adrénergique pour atteindre une fréquence élevée du signal en sortie du NSA. Le recrutement des SANC dormantes permettrait alors d'augmenter la synchronisation des SANC selon la théorie d'entrainement mutuel des SANC (Jalife, 1984). Cette théorie stipule en effet qu'au sein du NSA les SANC ont différentes fréquences intrinsèques qui se synchronisent pour donner un signal avec une fréquence unique en sortie du NSA. Recruter les SANC dormantes permettrait alors de synchroniser plus rapidement ce signal en contexte de fréquence élevée en réponse à une stimulation adrénergique. Une étude a justement montré récemment que des SANC isolées avec des fréquences intrinsèques variées tendaient à atteindre une même fréquence unique sous stimulation β-adrénergique (Kim *et al.*, 2021). Ici nous suggérons alors que dans les SANC dormantes les canaux $Ca_v1.3$ sont essentiels pour atteindre cette fréquence synchronisée en réponse à une stimulation adrénergique.

Conclusion et perspectives

Les résultats de mes travaux de thèse mettent en lumière un nouveau rôle majeur des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique des SANC. En régulant la synchronisation des LCRs en parallèle de l'augmentation d'un courant entrant dépolarisant $I_{Cav1.3}$, ils permettent d'atteindre plus rapidement le seuil d'activation des canaux calciques de type L $Ca_v1.2$, ce qui déclenche le PA. Ainsi, les canaux $Ca_v1.3$ ont un rôle central qui permet de lier l'horloge membranaire à l'horloge calcique. L'influx calcique transitant par ces canaux activés lors de la DD favorise la dépolarisation progressive de la membrane d'une part (horloge membranaire) et stimule et synchronise les relargages calciques par RyR2 *via* calcium-induced calcium release, ou bien lien physique (horloge calcique), d'autre part. En contexte de stimulation adrénergique, ces deux phénomènes semblent essentiels pour maintenir une fréquence élevée (Figure 42).

En plus de ces deux rôles, les canaux $Ca_v1.3$ pourraient bien contribuer à l'accélération de la fréquence cardiaque en stimulant la production d'ATP. En effet, certaines enzymes du cycle de Krebs telles que la pyruvate déshydrogénase ou l'isocitrate déshydrogénase sont régulées par le Ca^{2+} (Tarasov *et al.,* 2012; Wan *et al.,* 1989). Or, il a été montré que l'inhibition de l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie chez la souris diminue la réponse à la stimulation adrénergique (Fernández-Sada *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Etant donné le rôle prédominant de $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique révélé par notre étude, il se pourrait bien que cet influx de Ca^{2+} dans la mitochondrie provienne de l'activation de $Ca_v1.3$ (Figure 42). En perspective, grâce à nos souris $Ca_v1.2^{DHP-/-}$, le lien entre $Ca_v1.3$ et l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie pourrait facilement être étudié par inhibition pharmacologique et serait une piste intéressante pour identifier un potentiel nouveau rôle de $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique.

Enfin, il ne faut pas oublier que dans notre étude, l'implication de $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique a été étudiée en bloquant le courant $I_{Cav1.3}$. Dans les résultats préliminaires sur l'inhibition d'I_f dans les SANC firing, il est observé le même effet qu'une inhibition des canaux $Ca_v1.3$ (Figure 40), suggérant que les canaux HCN4 sont également essentiels dans la régulation adrénergique des SANC firing, ce qui est en contradiction avec ce qu'une équipe allemande a récemment montré (Fenske *et al.*, 2020). Cependant, alors que nous avons inhibé le courant I_f entièrement, ils ont au contraire seulement bloqué la régulation des canaux HCN4 par l'AMPc. Il serait alors intéressant d'appliquer la même méthode pour $Ca_v1.3$, c'est-à-dire de rendre le canal insensible à la PKA. Selon de récentes études, cela pourrait se faire en supprimant l'expression de la protéine Rad associée aux canaux calciques de type L et qui est la cible de la PKA (Levitan *et al*., 2021; Liu *et al.*, 2020)

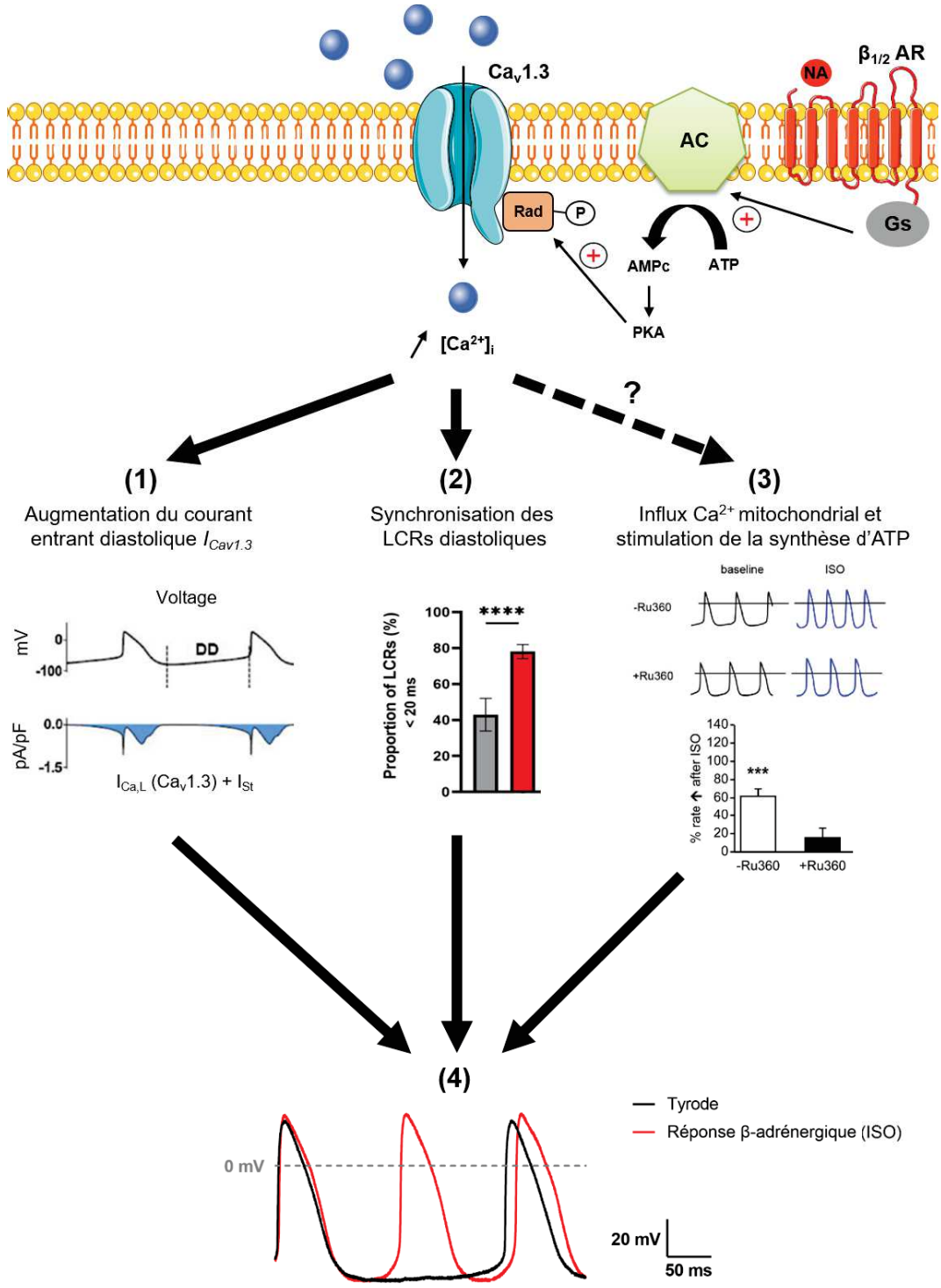


Figure 42 : Rôle central des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ dans la régulation adrénergique des SANC. L'activation des récepteurs β-adrénergiques par la noradrénaline (NA) déclenche la voie de signalisation AMPc/PKA ce qui entraîne la phosphorylation de la petite protéine G Rad associée aux canaux $Ca_v1.3$. La phosphorylation entraîne une augmentation du courant diastolique entrant $I_{Cav1.3}$ (1), la synchronisation des LCRs diastoliques (2), et pourrait potentiellement être responsable de l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie (3). L'inhibition de l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie par le RU360 diminue en effet la réponse des SANC à une stimulation adrénergique. Ces 3 phénomènes entraînent alors une accélération de la fréquence de dépolarisation des SANC (4). D'après *Mesirca et al., (2018)* (1) et *Wu et al., (2015)* (3).

Bibliographie

Alig, J., Marger, L., Mesirca, P., Ehmke, H., Mangoni, M.E., and Isbrandt, D. (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 12189–12194.

Alings, A.M., and Bouman, L.N. (1993). Electrophysiology of the ageing rabbit and cat sinoatrial node--a comparative study. Eur Heart J *14*, 1278–1288.

Anderson, J.B., and Benson, D.W. (2010). Genetics of sick sinus syndrome. Card Electrophysiol Clin *2*, 499–507.

Anderson, R.H., Yanni, J., Boyett, M.R., Chandler, N.J., and Dobrzynski, H. (2009). The anatomy of the cardiac conduction system. Clin Anat *22*, 99–113.

Arikkath, J., and Campbell, K.P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr. Opin. Neurobiol. *13*, 298–307.

Aziz, Q., Finlay, M., Montaigne, D., Ojake, L., Li, Y., Anderson, N., Ludwig, A., and Tinker, A. (2018). ATP-sensitive potassium channels in the sinoatrial node contribute to heart rate control and adaptation to hypoxia. J. Biol. Chem. *293*, 8912–8921.

Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., et al. (2011). Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. Nat. Neurosci. *14*, 77–84.

Barold, S.S. (2003). Willem Einthoven and the birth of clinical electrocardiography a hundred years ago. Card Electrophysiol Rev *7*, 99–104.

Baruscotti, M., DiFrancesco, D., and Robinson, R.B. (1996). A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells. J. Physiol. (Lond.) *492 (Pt 1)*, 21–30.

Baruscotti, M., DiFrancesco, D., and Robinson, R.B. (2000). Na(+) current contribution to the diastolic depolarization in newborn rabbit SA node cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *279*, H2303-2309.

Baruscotti, M., Bucchi, A., Viscomi, C., Mandelli, G., Consalez, G., Gnecchi-Rusconi, T., Montano, N., Casali, K.R., Micheloni, S., Barbuti, A., et al. (2011). Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 1705–1710.

Baudot, M., Torre, E., Bidaud, I., Louradour, J., Torrente, A.G., Fossier, L., Talssi, L., Nargeot, J., Barrère-Lemaire, S., Mesirca, P., et al. (2020). Concomitant genetic ablation of L-type Cav1.3 (α1D) and T-type Cav3.1 (α1G) Ca2+ channels disrupts heart automaticity. Sci Rep *10*, 18906.

Baumgarten, C.M., and Fozzard, H.A. (1981). Intracellular chloride activity in mammalian ventricular muscle. Am. J. Physiol. *241*, C121-129.

Beau, S., Hand, D., Schuessler, R., Bromberg, B., Kwon, B., Boineau, J., and Saffitz, J. (1995). Relative densities of muscarinic cholinergic and beta-adrenergic receptors in the canine sinoatrial node and their relation to sites of pacemaker activity. Circulation Research *77*.

Benson, D.W., Wang, D.W., Dyment, M., Knilans, T.K., Fish, F.A., Strieper, M.J., Rhodes, T.H., and George, A.L. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). J Clin Invest *112*, 1019–1028.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. Nature *415*, 198–205.

Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. Nature *351*, 751–754.

Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., and Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. Physiol. Rev. *89*, 847–885.

Billette, J., and Tadros, R. (2019). An integrated overview of AV node physiology. Pacing Clin Electrophysiol *42*, 805–820.

Bogdanov Konstantin Y., Vinogradova Tatiana M., and Lakatta Edward G. (2001). Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na+-Ca2+ Exchanger. Circulation Research *88*, 1254–1258.

Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2000). Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. FEBS Lett. *481*, 73–76.

Boyett, M.R., Honjo, H., Yamamoto, M., Nikmaram, M.R., Niwa, R., and Kodama, I. (1998). Regional differences in effects of 4-aminopyridine within the sinoatrial node. Am J Physiol *275*, H1158-1168.

Boyett, M.R., Honjo, H., Yamamoto, M., Nikmaram, M.R., Niwa, R., and Kodama, I. (1999). Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. Am J Physiol *276*, H686-698.

Boyett, M.R., Honjo, H., and Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. Cardiovasc. Res. *47*, 658–687.

Boyett, M.R., Inada, S., Yoo, S., Li, J., Liu, J., Tellez, J., Greener, I.D., Honjo, H., Billeter, R., Lei, M., et al. (2006). Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. Adv Cardiol *42*, 175–197.

Brown, H.F., DiFrancesco, D., and Noble, S.J. (1979). How does adrenaline accelerate the heart? Nature *280*, 235–236.

Brown, H.F., Kimura, J., Noble, D., Noble, S.J., and Taupignon, A. (1984). The slow inward current, isi, in the rabbit sino-atrial node investigated by voltage clamp and computer simulation. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences *222*, 305–328.

Bychkov, R., Juhaszova, M., Tsutsui, K., Coletta, C., Stern, M.D., Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2020). Synchronized Cardiac Impulses Emerge From Heterogeneous Local Calcium Signals Within and Among Cells of Pacemaker Tissue. JACC: Clinical Electrophysiology *6*, 907–931.

Callewaert, G., Carmeliet, E., and Vereecke, J. (1984). Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. J. Physiol. (Lond.) *349*, 643–661.

Camelliti, P., Borg, T.K., and Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. Cardiovasc. Res. *65*, 40–51.

Capel, R.A., and Terrar, D.A. (2015). Cytosolic calcium ions exert a major influence on the firing rate and maintenance of pacemaker activity in guinea-pig sinus node. Front Physiol *6*.

Carmeliet, E. (2019). Pacemaking in cardiac tissue. From IK2 to a coupled-clock system. Physiol Rep *7*, e13862.

Catterall, W.A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*.

Chandler, N., Aslanidi, O., Buckley, D., Inada, S., Birchall, S., Atkinson, A., Kirk, D., Monfredi, O., Molenaar, P., Anderson, R., et al. (2011). Computer three-dimensional anatomical reconstruction of the human sinus node and a novel paranodal area. Anat Rec (Hoboken) *294*, 970–979.

Chen, C.-C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., et al. (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca2+ channels. Science *302*, 1416–1418.

Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. Science *262*, 740–744.

Christel, C.J., Cardona, N., Mesirca, P., Herrmann, S., Hofmann, F., Striessnig, J., Ludwig, A., Mangoni, M.E., and Lee, A. (2012). Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca2+ channels in mouse sinoatrial node. J Physiol *590*, 6327–6341.

Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. Nature *426*, 517–524.

Clark, R.B., Mangoni, M.E., Lueger, A., Couette, B., Nargeot, J., and Giles, W.R. (2004). A rapidly activating delayed rectifier K+ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol *286*, H1757-1766.

Davis, L.M., Kanter, H.L., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E. (1994). Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. J. Am. Coll. Cardiol. *24*, 1124–1132.

De Bruin, M.L., Pettersson, M., Meyboom, R.H.B., Hoes, A.W., and Leufkens, H.G.M. (2005). Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. Eur. Heart J. *26*, 590–597.

De Waard, S., Montnach, J., Cortinovis, C., Chkir, O., Erfanian, M., Hulin, P., Gaborit, N., Lemarchand, P., Mesirca, P., Bidaud, I., et al. (2020). Maurocalcin and its analog MCaE12A facilitate Ca2+ mobilization in cardiomyocytes. The Biochemical Journal *477*.

Demion, M., Bois, P., Launay, P., and Guinamard, R. (2007). TRPM4, a Ca2+-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. Cardiovasc Res *73*, 531–538.

Demoulin, J.C., and Kulbertus, H.E. (1972). Histopathological examination of concept of left hemiblock. Br Heart J *34*, 807–814.

Desplantez, T., Dupont, E., Severs, N.J., and Weingart, R. (2007). Gap junction channels and cardiac impulse propagation. J. Membr. Biol. *218*, 13–28.

DiFrancesco, D. (1981). A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. J Physiol *314*, 377–393.

DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annual Review of Physiology *55*.

DiFrancesco, D. (2010). The role of the funny current in pacemaker activity. Circ Res *106*, 434–446.

DiFrancesco, D. (2019). A Brief History of Pacemaking. Front Physiol *10*, 1599.

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

DiFrancesco, D., and Tromba, C. (1988). Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. J Physiol *405*, 477–491.

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

DiFrancesco, D., Ducouret, P., and Robinson, R.B. (1989). Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. Science *243*, 669–671.

Dobrzynski, H., Li, J., Tellez, J., Greener, I.D., Nikolski, V.P., Wright, S.E., Parson, S.H., Jones, S.A., Lancaster, M.K., Yamamoto, M., et al. (2005). Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. Circulation *111*, 846–854.

Du, Y.-M., and Nathan, R.D. (2007). Ionic basis of ischemia-induced bradycardia in the rabbit sinoatrial node. J Mol Cell Cardiol *42*, 315–325.

Duan, D.D. (2013). Phenomics of cardiac chloride channels. Compr Physiol *3*, 667–692.

Durrer, D., van Dam, R.T., Freud, G.E., Janse, M.J., Meijler, F.L., and Arzbaecher, R.C. (1970). Total excitation of the isolated human heart. Circulation *41*, 899–912.

Efimov, I.R., Nikolski, V.P., Rothenberg, F., Greener, I.D., Li, J., Dobrzynski, H., and Boyett, M. (2004). Structure-function relationship in the AV junction. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol *280*, 952–965.

El Khoury, N., Ross, J.L., Long, V., Thibault, S., Ethier, N., and Fiset, C. (2018). Pregnancy and oestrogen regulate sinoatrial node calcium homeostasis and accelerate pacemaking. Cardiovasc. Res. *114*, 1605–1616.

Fabiato, A. (1985). 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 *85*, 247–289.

Fenske, S., Hennis, K., Rötzer, R.D., Brox, V.F., Becirovic, E., Scharr, A., Gruner, C., Ziegler, T., Mehlfeld, V., Brennan, J., et al. (2020). cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells. Nature Communications *11*, 1–22.

Fernández-Sada, E., Silva-Platas, C., Villegas, C.A., Rivero, S.L., Willis, B.C., García, N., Garza, J.R., Oropeza-Almazán, Y., Valverde, C.A., Mazzocchi, G., et al. (2014). Cardiac responses to β-adrenoceptor stimulation is partly dependent on mitochondrial calcium uniporter activity. Br J Pharmacol *171*, 4207–4221.

Ferron, L., Capuano, V., Deroubaix, E., Coulombe, A., and Renaud, J.-F. (2002). Functional and molecular characterization of a T-type Ca(2+) channel during fetal and postnatal rat heart development. J. Mol. Cell. Cardiol. *34*, 533–546.

Fleg, J.L., Schulman, S., O'Connor, F., Becker, L.C., Gerstenblith, G., Clulow, J.F., Renlund, D.G., and Lakatta, E.G. (1994). Effects of acute beta-adrenergic receptor blockade on age-associated changes in cardiovascular performance during dynamic exercise. Circulation *90*, 2333–2341.

Flynn, G.E., and Zagotta, W.N. (2018). Insights into the molecular mechanism for hyperpolarization-dependent activation of HCN channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *115*, E8086–E8095.

Galetin, T., Tevoufouet, E.E., Sandmeyer, J., Matthes, J., Nguemo, F., Hescheler, J., Weiergräber, M., and Schneider, T. (2013). Pharmacoresistant Cav 2·3 (E-type/R-type) voltage-gated calcium channels influence heart rate dynamics and may contribute to cardiac impulse conduction. Cell Biochem. Funct. *31*, 434–449.

Gehrmann, J., Hammer, P.E., Maguire, C.T., Wakimoto, H., Triedman, J.K., and Berul, C.I. (2000). Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol *279*, H733-740.

Gregory, F.D., Bryan, K.E., Pangršič, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T., and Lee, A. (2011). Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca^{2+} channels in mouse inner hair cells. Nat Neurosci *14*, 1109–1111.

Gryshchenko, O., Qu, J., and Nathan, R.D. (2002). Ischemia alters the electrical activity of pacemaker cells isolated from the rabbit sinoatrial node. Am J Physiol Heart Circ Physiol *282*, H2284-2295.

Guo, J., Ono, K., and Noma, A. (1995). A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. J. Physiol. (Lond.) *483 (Pt 1)*, 1–13.

Habuchi, Y., Lu, L.L., Morikawa, J., and Yoshimura, M. (1995). Angiotensin II inhibition of L-type Ca2+ current in sinoatrial node cells of rabbits. Am J Physiol *268*, H1053-1060.

Hadziselimović, H. (1978). Vascularization of the conducting system in the human heart. Acta Anat (Basel) *102*, 105–110.

Hagiwara, N., and Irisawa, H. (1989). Modulation by intracellular Ca2+ of the hyperpolarization-activated inward current in rabbit single sino-atrial node cells. J. Physiol. (Lond.) *409*, 121–141.

Hagiwara, N., Masuda, H., Shoda, M., and Irisawa, H. (1992). Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. J. Physiol. (Lond.) *456*, 285–302.

Haissaguerre, M., Vigmond, E., Stuyvers, B., Hocini, M., and Bernus, O. (2016). Ventricular arrhythmias and the His-Purkinje system. Nat Rev Cardiol *13*, 155–166.

Han, X., Habuchi, Y., and Giles, W.R. (1994). Relaxin increases heart rate by modulating calcium current in cardiac pacemaker cells. Circ. Res. *74*, 537–541.

Han, X., Light, P.E., Giles, W.R., and French, R.J. (1996). Identification and properties of an ATP-sensitive K+ current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. J. Physiol. (Lond.) *490 (Pt 2)*, 337–350.

Hennis, K., Rötzer, R.D., Piantoni, C., Biel, M., Wahl-Schott, C., and Fenske, S. (2021). Speeding Up the Heart? Traditional and New Perspectives on HCN4 Function. Front Physiol *12*, 669029.

Herrmann, S., Stieber, J., Stöckl, G., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2007). HCN4 provides a "depolarization reserve" and is not required for heart rate acceleration in mice. EMBO J *26*, 4423–4432.

Herrmann, S., Hofmann, F., Stieber, J., and Ludwig, A. (2012). HCN channels in the heart: lessons from mouse mutants. Br J Pharmacol *166*, 501–509.

Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. Physiol. Rev. *90*, 291–366.

Hof, T., Simard, C., Rouet, R., Sallé, L., and Guinamard, R. (2013). Implication of the TRPM4 nonselective cation channel in mammalian sinus rhythm. Heart Rhythm *10*, 1683–1689.

Hof, T., Chaigne, S., Récalde, A., Sallé, L., Brette, F., and Guinamard, R. (2019). Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. Nat Rev Cardiol *16*, 344–360.

Huang, Z.M., Prasad, C., Britton, F.C., Ye, L.L., Hatton, W.J., and Duan, D. (2009). Functional role of CLC-2 chloride inward rectifier channels in cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells. J. Mol. Cell. Cardiol. *47*, 121–132.

Hunter, S., and Robson, S.C. (1992). Adaptation of the maternal heart in pregnancy. Br Heart J *68*, 540–543.

Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. Science *270*, 1166–1170.

Inoue, S., Shinohara, F., Niitani, H., and Gotoh, K. (1986). A new method for the histological study of aging changes in the sinoatrial node. Jpn Heart J *27*, 653–660.

Inui, M., Saito, A., and Fleischer, S. (1987). Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. J. Biol. Chem. *262*, 1740–1747.

Jalife, J. (1984). Mutual entrainment and electrical coupling as mechanisms for synchronous firing of rabbit sino-atrial pace-maker cells. J Physiol *356*, 221–243.

James, T.N. (2003). Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: part II--function. Prog Cardiovasc Dis *45*, 327–360.

James, T.N., Sherf, L., Fine, G., and Morales, A.R. (1966). Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. Circulation *34*, 139–163.

Janczewski, A.M., and Lakatta, E.G. (1993). Buffering of calcium influx by sarcoplasmic reticulum during the action potential in guinea-pig ventricular myocytes. J Physiol *471*, 343–363.

Joyner, R.W., Kumar, R., Golod, D.A., Wilders, R., Jongsma, H.J., Verheijck, E.E., Bouman, L., Goolsby, W.N., and Van Ginneken, A.C. (1998). Electrical interactions between a rabbit atrial cell and a nodal cell model. Am. J. Physiol. *274*, H2152-2162.

Ju, Y.-K., and Allen, D.G. (2000). The distribution of calcium in toad cardiac pacemaker cells during spontaneous firing. Pflügers Arch - Eur J Physiol *441*, 219–227.

Ju, Y.-K., Chu, Y., Chaulet, H., Lai, D., Gervasio, O.L., Graham, R.M., Cannell, M.B., and Allen, D.G. (2007). Store-operated Ca2+ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. Circ. Res. *100*, 1605–1614.

Kaplan, W.D., and Trout, W.E. (1969). The Behavior of Four Neurological Mutants of Drosophila. Genetics *61*, 399–409.

Keith, A., and Flack, M. (1907). The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. J Anat Physiol *41*, 172–189.

Kennedy, A., Finlay, D.D., Guldenring, D., Bond, R., Moran, K., and McLaughlin, J. (2016). The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. Crit Care Nurs Clin North Am *28*, 269–279.

Kennedy, M.E., Nemec, J., Corey, S., Wickman, K., and Clapham, D.E. (1999). GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein-gated potassium channels. J. Biol. Chem. *274*, 2571–2582.

Kim, M.S., Maltsev, A.V., Monfredi, O., Maltseva, L.A., Wirth, A., Florio, M.C., Tsutsui, K., Riordon, D.R., Parsons, S.P., Tagirova, S., et al. (2018). Heterogeneity of calcium clock functions in dormant, dysrhythmically and rhythmically firing single pacemaker cells isolated from SA node. Cell Calcium *74*, 168–179.

Kim, M.S., Monfredi, O., Maltseva, L.A., Lakatta, E.G., and Maltsev, V.A. (2021). β-Adrenergic Stimulation Synchronizes a Broad Spectrum of Action Potential Firing Rates of Cardiac Pacemaker Cells toward a Higher Population Average. Cells *10*.

Kirchhof, C.J., Bonke, F.I., Allessie, M.A., and Lammers, W.J. (1987). The influence of the atrial myocardium on impulse formation in the rabbit sinus node. Pflugers Arch. *410*, 198–203.

Kodama, I., Nikmaram, M.R., Boyett, M.R., Suzuki, R., Honjo, H., and Owen, J.M. (1997). Regional differences in the role of the Ca2+ and Na+ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. Am J Physiol *272*, H2793-2806.

Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D. (1995). G beta gamma binds directly to the G protein-gated K+ channel, IKACh. The Journal of Biological Chemistry *270*.

Kumar, D., Pawar, A., Sabnis, G., Shah, H., Lanewar, C., Kerkar, P., and More, D. (2018). Reversible SA Nodal Dysfunction. Interventional Cardiology *10*, 37–38.

Kurian, T., Ambrosi, C., Hucker, W., Fedorov, V.V., and Efimov, I.R. (2010). Anatomy and electrophysiology of the human AV node. Pacing Clin Electrophysiol *33*, 754–762.

Kusumoto, F.M., Schoenfeld, M.H., Barrett, C., Edgerton, J.R., Ellenbogen, K.A., Gold, M.R., Goldschlager, N.F., Hamilton, R.M., Joglar, J.A., Kim, R.J., et al. (2019). 2018 ACC/AHA/HRS Guideline on the Evaluation and Management of Patients With Bradycardia and Cardiac Conduction Delay: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines, and the Heart Rhythm Society. J Am Coll Cardiol *74*, 932–987.

Laasmaa, M., Karro, N., Birkedal, R., and Vendelin, M. (2019). IOCBIO Sparks detection and analysis software. PeerJ *7*, e6652.

Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q.Y., and Meissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature *331*, 315–319.

Lakatta, E.G., Maltsev, V.A., and Vinogradova, T.M. (2010). A coupled SYSTEM of intracellular Ca2+ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. Circ. Res. *106*, 659–673.

Lande, G., Demolombe, S., Bammert, A., Moorman, A., Charpentier, F., and Escande, D. (2001). Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part II: Pharmacological profile. Cardiovasc. Res. *50*, 328–334.

Lang, D., Petrov, V., Lou, Q., Osipov, G., and Efimov, I.R. (2011). Spatiotemporal control of heart rate in a rabbit heart. J Electrocardiol *44*, 626–634.

Larson, L., Jr, S.C., Wa, S., Ra, B., and C, P. (2013). Depressed pacemaker activity of sinoatrial node myocytes contributes to the age-dependent decline in maximum heart rate.

Lees-Miller, J.P., Guo, J., Somers, J.R., Roach, D.E., Sheldon, R.S., Rancourt, D.E., and Duff, H.J. (2003). Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates I(Kr) in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia. Mol. Cell. Biol. *23*, 1856–1862.

Lei, M., Cooper, P.J., Camelliti, P., and Kohl, P. (2002). Role of the 293b-sensitive, slowly activating delayed rectifier potassium current, i(Ks), in pacemaker activity of rabbit isolated sino-atrial node cells. Cardiovasc. Res. *53*, 68–79.

Lei, M., Jones, S.A., Liu, J., Lancaster, M.K., Fung, S.S.-M., Dobrzynski, H., Camelliti, P., Maier, S.K.G., Noble, D., and Boyett, M.R. (2004). Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. J. Physiol. (Lond.) *559*, 835–848.

Levitan, B.M., Ahern, B.M., Aloysius, A., Brown, L., Wen, Y., Andres, D.A., and Satin, J. (2021). Rad-GTPase contributes to heart rate via L-type calcium channel regulation. J Mol Cell Cardiol *154*, 60–69.

Li, J., Qu, J., and Nathan, R.D. (1997). Ionic basis of ryanodine's negative chronotropic effect on pacemaker cells isolated from the sinoatrial node. Am. J. Physiol. *273*, H2481-2489.

Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D.B., Belmares, R., and Jiang, Y. (2012). Structural Insight into the Ion-Exchange Mechanism of the Sodium/Calcium Exchanger. Science *335*, 686–690.

Liu, G., Papa, A., Katchman, A.N., Zakharov, S.I., Roybal, D., Hennessey, J., Kushner, J., Yang, L., Chen, B.-X., Kushnir, A., et al. (2020). Mechanism of adrenergic CaV1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. Nature *577*, 695–700.

Liu, L., S, S., M, J., Sj, S., S, S., Y, Y., and Eg, L. (2014). Age-associated abnormalities of intrinsic automaticity of sinoatrial nodal cells are linked to deficient cAMP-PKA-Ca(2+) signaling.

Lown, B. (1967). Electrical reversion of cardiac arrhythmias. Br Heart J *29*, 469–489.

Lu, Z.-J., Pereverzev, A., Liu, H.-L., Weiergräber, M., Henry, M., Krieger, A., Smyth, N., Hescheler, J., and Schneider, T. (2004). Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca2+ channels. Cell. Physiol. Biochem. *14*, 11–22.

Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., and Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. Nature *393*, 587–591.

Lyashkov, A.E., Vinogradova, T.M., Zahanich, I., Li, Y., Younes, A., Nuss, H.B., Spurgeon, H.A., Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2009). Cholinergic receptor signaling modulates spontaneous firing of sinoatrial nodal cells via integrated effects on PKA-dependent Ca(2+) cycling and I(KACh). Am J Physiol Heart Circ Physiol *297*, H949-959.

Lyashkov, A.E., Behar, J., Lakatta, E.G., Yaniv, Y., and Maltsev, V.A. (2018). Positive Feedback Mechanisms among Local Ca Releases, NCX, and ICaL Ignite Pacemaker Action Potentials. Biophys J *114*, 1176–1189.

MacDonald, E.A., Rose, R.A., and Quinn, T.A. (2020). Neurohumoral Control of Sinoatrial Node Activity and Heart Rate: Insight From Experimental Models and Findings From Humans. Front Physiol *11*.

Maltsev, V., and Lakatta, E. (2009). Synergism of coupled subsarcolemmal Ca2+ clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model.

Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2010). A novel quantitative explanation for the autonomic modulation of cardiac pacemaker cell automaticity via a dynamic system of sarcolemmal and intracellular proteins. Am J Physiol Heart Circ Physiol *298*, H2010-2023.

Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2001). Properties of the hyperpolarization-activated current (I(f)) in isolated mouse sino-atrial cells. Cardiovasc. Res. *52*, 51–64.

Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. Physiol. Rev. *88*, 919–982.

Mangoni, M.E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca2+ channels in cardiac pacemaker activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 5543–5548.

Mangoni, M.E., Traboulsie, A., Leoni, A.-L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H.-S., et al. (2006a). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. Circ. Res. *98*, 1422–1430.

Mangoni, M.E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2006b). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. Prog. Biophys. Mol. Biol. *90*, 38–63.

Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M.E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., and Demolombe, S. (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. J. Physiol. (Lond.) *562*, 223–234.

Matsuura, H., Ehara, T., Ding, W.-G., Omatsu-Kanbe, M., and Isono, T. (2002). Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K+ current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. J Physiol *540*, 815–830.

Mattick, P., Parrington, J., Odia, E., Simpson, A., Collins, T., and Terrar, D. (2007). 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 *582*, 1195–1203.

Mesirca, P., Marger, L., Toyoda, F., Rizzetto, R., Audoubert, M., Dubel, S., Torrente, A.G., Difrancesco, M.L., Muller, J.C., Leoni, A.-L., et al. (2013). The G-protein-gated K+ channel, IKACh, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. J Gen Physiol *142*, 113–126.

Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A.G., Müller, J.C., Marger, L., Rollin, A., Marquilly, C., Vincent, A., Dubel, S., Bidaud, I., et al. (2014). Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of “funny” (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. Nat Commun *5*, 4664.

Mesirca, P., Torrente, A.G., and Mangoni, M.E. (2015). Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. Front Physiol *6*, 19.

Mesirca, P., Torrente, A.-G., Bidaud, I., Baudot, M., Nargeot, J., and Mangoni, M.-E. (2018). [Genesis of cardiac sinus automaticity and therapeutic perspectives]. Arch Mal Coeur Vaiss Pratique *2018*, 35–39.

Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H.V.M., Abran, P., Jongsma, H., Nargeot, J., and Gros, D. (2004). Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. Cardiovasc. Res. *63*, 77–86.

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

Mobley, B.A., and Page, E. (1972). The surface area of sheep cardiac Purkinje fibres. J Physiol *220*, 547–563.

Monfredi, O., and Boyett, M.R. (2015). Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons - A view from the sinoatrial nodal myocyte. J Mol Cell Cardiol *83*, 88–100.

Monfredi, O., Dobrzynski, H., Mondal, T., Boyett, M.R., and Morris, G.M. (2010). The Anatomy and Physiology of the Sinoatrial Node-A Contemporary Review: SINOATRIAL NODAL ANATOMY AND PHYSIOLOGY. Pacing and Clinical Electrophysiology *33*, 1392–1406.

Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. Sci. STKE *2005*, re3.

Neco, P., Torrente, A., Mesirca, P., Zorio, E., Liu, N., Priori, S.G., Napolitano, C., Richard, S., Benitah, J.-P., Mangoni, M.E., et al. (2012). Paradoxical Effect of Increased Diastolic Ca2+ Release and Decreased Sinoatrial

Node Activity in a Mouse Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. Circulation *126*, 392–401.

Nerbonne, J.M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K+ channel diversity in the mammalian myocardium. J. Physiol. (Lond.) *525 Pt 2*, 285–298.

Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G., and Voets, T. (2005). Gating of TRP channels: a voltage connection? J. Physiol. (Lond.) *567*, 35–44.

Noble, D., and Tsien, R.W. (1969). Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. (Lond.) *200*, 205–231.

Noma, A. (1983). ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. Nature *305*, 147–148.

Ono, K., Shibata, S., and Iijima, T. (2000). Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. J Physiol *524*, 51–62.

Ono, N., Yamaguchi, T., Ishikawa, H., Arakawa, M., Takahashi, N., Saikawa, T., and Shimada, T. (2009). Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. Arch. Histol. Cytol. *72*, 139–149.

Opthof, T. (1988). The mammalian sinoatrial node. Cardiovasc Drugs Ther *1*, 573–597.

Opthof, T., de Jonge, B., Masson-Pevet, M., Jongsma, H.J., and Bouman, L.N. (1986). Functional and morphological organization of the cat sinoatrial node. Journal of Molecular and Cellular Cardiology *18*, 1015–1031.

Pauza, D., Skripka, V., Pauziene, N., and Stropus, R. (1999). Anatomical study of the neural ganglionated plexus in the canine right atrium: implications for selective denervation and electrophysiology of the sinoatrial node in dog. The Anatomical Record *255*.

Pauza, D., Skripka, V., Pauziene, N., and Stropus, R. (2000). Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. The Anatomical Record *259*.

Pauza, D.H., Rysevaite, K., Inokaitis, H., Jokubauskas, M., Pauza, A.G., Brack, K.E., and Pauziene, N. (2014). Innervation of sinoatrial nodal cardiomyocytes in mouse. A combined approach using immunofluorescent and electron microscopy. Journal of Molecular and Cellular Cardiology *75*, 188–197.

Peters, C.H., Sharpe, E.J., and Proenza, C. (2020). Cardiac Pacemaker Activity and Aging. Annu Rev Physiol *82*, 21–43.

Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N., et al. (2016). Revisiting Cardiac Cellular Composition. Circ Res *118*, 400–409.

Pitts, B.J. (1979). Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Coupling to the sodium pump. J. Biol. Chem. *254*, 6232–6235.

Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca2+ channels. Cell *102*, 89–97.

Pond, A.L., Scheve, B.K., Benedict, A.T., Petrecca, K., Van Wagoner, D.R., Shrier, A., and Nerbonne, J.M. (2000). Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I(Kr) channels. J. Biol. Chem. *275*, 5997–6006.

Quednau, B.D., Nicoll, D.A., and Philipson, K.D. (1997). Tissue specificity and alternative splicing of the Na+/Ca2+ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. American Journal of Physiology-Cell Physiology *272*, C1250–C1261.

Ren, X., and Philipson, K.D. (2013). The Topology of the Cardiac Na+/Ca2+ Exchanger, NCX1. J Mol Cell Cardiol *57*, 68–71.

Ren, F., Niu, X., Ou, Y., Han, Z., Ling, F., Zhou, S., and Li, Y. (2006). Morphological and electrophysiological properties of single myocardial cells from Koch triangle of rabbit heart. Chin. Med. J. *119*, 2075–2084.

Renaudon, B., Lenfant, J., Decressac, S., and Bois, P. (2000). Thyroid hormone increases the conductance density of f-channels in rabbit sino-atrial node cells. Recept Channels *7*, 1–8.

Rigg, L., and Terrar, D.A. (1996). Possible role of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in pacemaking in guinea-pig sino-atrial node. Exp. Physiol. *81*, 877–880.

Robinson, S. (1938). Experimental studies of physical fitness in relation to age. Arbeitsphysiologie *10*, 251–323.

Robinson, R.B., Yu, H., Chang, F., and Cohen, I.S. (1997). Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, if, in rat ventricle cells. Pflugers Arch. *433*, 533–535.

Rousseau, E., Smith, J.S., and Meissner, G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca2+ release channel. Am. J. Physiol. *253*, C364-368.

Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.Y., and Meissner, G. (1988). Activation of the Ca2+ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. Arch. Biochem. Biophys. *267*, 75–86.

Rubenstein, D.S., and Lipsius, S.L. (1989). Mechanisms of automaticity in subsidiary pacemakers from cat right atrium. Circ. Res. *64*, 648–657.

Sah, R., Mesirca, P., Van den Boogert, M., Rosen, J., Mably, J., Mangoni, M.E., and Clapham, D.E. (2013). Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, E3037-3046.

Sakmann, B., and Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. Annu Rev Physiol *46*, 455–472.

Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Tibbs, G.R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. Cell *93*, 717–729.

Saponaro, A., Cantini, F., Porro, A., Bucchi, A., DiFrancesco, D., Maione, V., Donadoni, C., Introini, B., Mesirca, P., Mangoni, M.E., et al. (2018). A synthetic peptide that prevents cAMP regulation in mammalian hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. Elife *7*.

Scalco, A., Moro, N., Mongillo, M., and Zaglia, T. (2021). Neurohumoral Cardiac Regulation: Optogenetics Gets Into the Groove. Front Physiol *12*, 726895.

Schneider, T., Dibue-Adjei, M., Neumaier, F., Akhtar, I., Hescheler, J., Kamp, M.A., and Tevoufouet, E.E. (2015). R-Type Voltage-Gated Ca^{2+} Channels in Cardiac and Neuronal Rhythmogenesis. Curr Mol Pharmacol *8*, 102–108.

Schuessler, R.B., Boineau, J.P., and Bromberg, B.I. (1996). Origin of the sinus impulse. J. Cardiovasc. Electrophysiol. *7*, 263–274.

Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U.B., Breithardt, G., Pongs, O., and Isbrandt, D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. J Clin Invest *111*, 1537–1545.

Schweizer, P.A., Duhme, N., Thomas, D., Becker, R., Zehelein, J., Draguhn, A., Bruehl, C., Katus, H.A., and Koenen, M. (2010). cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. Circ Arrhythm Electrophysiol *3*, 542–552.

Sharpe, E.J., St Clair, J.R., and Proenza, C. (2016). Methods for the Isolation, Culture, and Functional Characterization of Sinoatrial Node Myocytes from Adult Mice. J Vis Exp.

Sharpe, E.J., Larson, E.D., and Proenza, C. (2017). Cyclic AMP reverses the effects of aging on pacemaker activity and If in sinoatrial node myocytes. J Gen Physiol *149*, 237–247.

Sheng, J.-W., Wang, W.-Y., and Xu, Y.-F. (2011). Angiotensin II decreases spontaneous firing rate of guinea-pig sino-atrial node cells. Eur J Pharmacol *660*, 387–393.

Shiraishi, I., Takamatsu, T., Minamikawa, T., Onouchi, Z., and Fujita, S. (1992). Quantitative histological analysis of the human sinoatrial node during growth and aging. Circulation *85*, 2176–2184.

Silverman, M.E., Grove, D., and Upshaw, C.B. (2006). Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. Circulation *113*, 2775–2781.

Simmerman, H., Jh, C., Jl, T., Ad, W., and Lr, J. (1986). Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. The Journal of Biological Chemistry *261*.

Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renström, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschütz, R., et al. (2004). Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca 2+ channels. J. Clin. Invest. *113*, 1430–1439.

Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca2+ and ATP and modulation by Mg2+. J. Gen. Physiol. *88*, 573–588.

Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R., and Snutch, T.P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. Science *260*, 1133–1136.

Stephenson, R.S., Atkinson, A., Kottas, P., Perde, F., Jafarzadeh, F., Bateman, M., Iaizzo, P.A., Zhao, J., Zhang, H., Anderson, R.H., et al. (2017). High resolution 3-Dimensional imaging of the human cardiac conduction system from microanatomy to mathematical modeling. Scientific Reports *7*, 1–13.

Stratton, J.R., Cerqueira, M.D., Schwartz, R.S., Levy, W.C., Veith, R.C., Kahn, S.E., and Abrass, I.B. (1992). Differences in cardiovascular responses to isoproterenol in relation to age and exercise training in healthy men. Circulation *86*, 504–512.

Swaminathan, P.D., Purohit, A., Soni, S., Voigt, N., Singh, M.V., Glukhov, A.V., Gao, Z., He, B.J., Luczak, E.D., Joiner, M.A., et al. (2011). Oxidized CaMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice. J Clin Invest *121*, 3277–3288.

Talman, V., and Kivelä, R. (2018). Cardiomyocyte-Endothelial Cell Interactions in Cardiac Remodeling and Regeneration. Front Cardiovasc Med *5*, 101.

Tanaka, H., Desouza, C.A., Jones, P.P., Stevenson, E.T., Davy, K.P., and Seals, D.R. (1997). Greater rate of decline in maximal aerobic capacity with age in physically active vs. sedentary healthy women. J Appl Physiol (1985) *83*, 1947–1953.

Tanaka, H., Monahan, K.D., and Seals, D.R. (2001). Age-predicted maximal heart rate revisited. J Am Coll Cardiol *37*, 153–156.

Tarasov, A.I., Griffiths, E.J., and Rutter, G.A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca2+. Cell Calcium *52*, 28–35.

Tellez, J.O., Dobrzynski, H., Greener, I.D., Graham, G.M., Laing, E., Honjo, H., Hubbard, S.J., Boyett, M.R., and Billeter, R. (2006). Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. Circ. Res. *99*, 1384–1393.

Tevoufouet, E.E., Nembo, E.N., Dibué-Adjei, M., Hescheler, J., Nguemo, F., and Schneider, T. (2014). Cardiac functions of voltage-gated Ca(2+) channels: role of the pharmacoresistant type (E-/R-Type) in cardiac modulation and putative implication in sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. *167*, 115–139.

Thomas, G., Chung, M., and Cohen, C.J. (1985). A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. Circ. Res. *56*, 87–96.

Tinker, A., and Williams, A.J. (1992). Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. *100*, 479–493.

Torrente, A.G., Mesirca, P., Neco, P., Rizzetto, R., Dubel, S., Barrere, C., Sinegger-Brauns, M., Striessnig, J., Richard, S., Nargeot, J., et al. (2016). L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca2+ release during sino-atrial node pacemaker activity. Cardiovasc. Res. *109*, 451–461.

Toyoda, F., Mesirca, P., Dubel, S., Ding, W.-G., Striessnig, J., Mangoni, M.E., and Matsuura, H. (2017). CaV1.3 L-type Ca2+ channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na+ current. Sci Rep *7*, 7869.

Tranum-Jensen, J., Wilde, A.A., Vermeulen, J.T., and Janse, M.J. (1991). Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. Circ. Res. *69*, 429–437.

Tsutsui, K., Monfredi, O., Sirenko-Tagirova, S., Maltseva, L., Bychkov, R., Kim, M., Ziman, B., Tarasov, K., Tarasova, Y., Zhang, J., et al. (2018). A coupled-clock system drives the automaticity of human sinoatrial nodal pacemaker cells. Science Signaling *11*.

Tsutsui, K., Florio, M.C., Yang, A., Wirth, A.N., Yang, D., Kim, M.S., Ziman, B.D., Bychkov, R., Monfredi, O.J., Maltsev, V.A., et al. (2021). cAMP-Dependent Signaling Restores AP Firing in Dormant SA Node Cells via Enhancement of Surface Membrane Currents and Calcium Coupling. Front Physiol *12*, 596832.

Van Borren, M.M.G.J., Verkerk, A.O., Wilders, R., Hajji, N., Zegers, J.G., Bourier, J., Tan, H.L., Verheijck, E.E., Peters, S.L.M., Alewijnse, A.E., et al. (2010). Effects of muscarinic receptor stimulation on Ca2+ transient, cAMP production and pacemaker frequency of rabbit sinoatrial node cells. Basic Res Cardiol *105*, 73–87.

Vandenberg, J.I., Perry, M.D., Perrin, M.J., Mann, S.A., Ke, Y., and Hill, A.P. (2012). hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. Physiol. Rev. *92*, 1393–1478.

Verheijck, E.E., van Ginneken, A.C., Bourier, J., and Bouman, L.N. (1995). Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. Circ. Res. *76*, 607–615.

Verheijck, E.E., Wessels, A., van Ginneken, A.C., Bourier, J., Markman, M.W., Vermeulen, J.L., de Bakker, J.M., Lamers, W.H., Opthof, T., and Bouman, L.N. (1998). Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition. Circulation *97*, 1623–1631.

Verheijck, E.E., van Ginneken, A.C., Wilders, R., and Bouman, L.N. (1999). Contribution of L-type Ca2+ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. Am. J. Physiol. *276*, H1064-1077.

Verheijck, E.E., van Kempen, M.J., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongsma, H.J., and Bouman, L.N. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. Cardiovasc. Res. *52*, 40–50.

Verkerk, A.O., Wilders, R., Zegers, J.G., van Borren, M.M.G.J., Ravesloot, J.H., and Verheijck, E.E. (2002). Ca(2+)-activated Cl(-) current in rabbit sinoatrial node cells. J. Physiol. (Lond.) *540*, 105–117.

Vinogradova, T., and Lakatta, E. (2021). Dual Activation of Phosphodiesterase 3 and 4 Regulates Basal Cardiac Pacemaker Function and Beyond. International Journal of Molecular Sciences *22*.

Vinogradova, Ky, B., and Eg, L. (2002). beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. Circulation Research *90*.

Vinogradova, T.M., Zhou, Y.Y., Bogdanov, K.Y., Yang, D., Kuschel, M., Cheng, H., and Xiao, R.P. (2000). Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation. Circ Res *87*, 760–767.

Vinogradova, T.M., Zhou, Y.-Y., Maltsev, V., Lyashkov, A., Stern, M., and Lakatta, E.G. (2004). Rhythmic ryanodine receptor Ca2+ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. Circ. Res. *94*, 802–809.

Vinogradova, T.M., Lyashkov, A.E., Zhu, W., Ruknudin, A.M., Sirenko, S., Yang, D., Deo, S., Barlow, M., Johnson, S., Caffrey, J.L., et al. (2006). High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca2+ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. Circ Res *98*, 505–514.

Vinogradova, T.M., Sirenko, S., Lyashkov, A.E., Younes, A., Li, Y., Zhu, W., Yang, D., Ruknudin, A.M., Spurgeon, H., and Lakatta, E.G. (2008). Constitutive phosphodiesterase activity restricts spontaneous beating rate of cardiac pacemaker cells by suppressing local Ca2+ releases. Circ Res *102*, 761–769.

Vinogradova, T.M., Brochet, D., Sirenko, S., Li, Y., Spurgeon, H., and Lakatta, E.G. (2010). Sarcoplasmic reticulum Ca2+ pumping kinetics regulates timing of local Ca2+ releases and spontaneous beating rate of rabbit sinoatrial node pacemaker cells. Circ Res *107*, 767–775.

Wan, B., LaNoue, K.F., Cheung, J.Y., and Scaduto, R.C. (1989). Regulation of citric acid cycle by calcium. J Biol Chem *264*, 13430–13439.

Weidmann, S. (1951). Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. J Physiol *115*, 227–236.

Weiergräber, M., Henry, M., Südkamp, M., de Vivie, E.-R., Hescheler, J., and Schneider, T. (2005). Ablation of Ca(v)2.3 / E-type voltage-gated calcium channel results in cardiac arrhythmia and altered autonomic control within the murine cardiovascular system. Basic Res. Cardiol. *100*, 1–13.

Weisbrod, D., Khun, S.H., Bueno, H., Peretz, A., and Attali, B. (2016). Mechanisms underlying the cardiac pacemaker: the role of SK4 calcium-activated potassium channels. Acta Pharmacol Sin *37*, 82–97.

Whittaker, D.G., Colman, M.A., Ni, H., Hancox, J.C., and Zhang, H. (2018). Human Atrial Arrhythmogenesis and Sinus Bradycardia in KCNQ1-Linked Short QT Syndrome: Insights From Computational Modelling. Front Physiol *9*, 1402.

Wickman, K., Nemec, J., Gendler, S.J., and Clapham, D.E. (1998). Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. Neuron *20*, 103–114.

Wickman, K., Krapivinsky, G., Corey, S., Kennedy, M., Nemec, J., Medina, I., and Clapham, D.E. (1999). Structure, G protein activation, and functional relevance of the cardiac G protein-gated K+ channel, IKACh. Ann. N. Y. Acad. Sci. *868*, 386–398.

Wickman, K.D., Iñiguez-Lluhl, J.A., Davenport, P.A., Taussig, R., Krapivinsky, G.B., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Clapham, D.E. (1994). Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. Nature *368*, 255–257.

Wu, Y., Rasmussen, T.P., Koval, O.M., Joiner, M.A., Hall, D.D., Chen, B., Luczak, E.D., Wang, Q., Rokita, A.G., Wehrens, X.H.T., et al. (2015). The mitochondrial uniporter controls fight or flight heart rate increases. Nat Commun *6*, 6081.

Yaniv, Y., Lakatta, E.G., and Maltsev, V.A. (2015). From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. Front Physiol *6*, 28.

Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. Genome Biol. *4*, 207.

Zaza, Rb, R., and D, D. (1996). Basal responses of the L-type Ca2+ and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. The Journal of Physiology *491 (Pt 2)*.

Zhang, H., Holden, A.V., and Boyett, M.R. (2002a). Sustained inward current and pacemaker activity of mammalian sinoatrial node. J. Cardiovasc. Electrophysiol. *13*, 809–812.

Zhang, Z., Xu, Y., Song, H., Rodriguez, J., Tuteja, D., Namkung, Y., Shin, H.-S., and Chiamvimonvat, N. (2002b). Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. Circ. Res. *90*, 981–987.

Zhou, P., and Pu, W.T. (2016). Recounting Cardiac Cellular Composition. Circ. Res. *118*, 368–370.

Zhou, Z., and Lipsius, S.L. (1993). Na(+)-Ca2+ exchange current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. J Physiol *466*, 263–285.

Annexe

scientific reports

Check for updates

OPEN

Concomitant genetic ablation of L-type $Ca_v1.3$ (α_{1D}) and T-type $Ca_v3.1$ (α_{1G}) Ca^{2+} channels disrupts heart automaticity

Matthias Baudot[1,2], Eleonora Torre[1,2,3], Isabelle Bidaud[1,2], Julien Louradour[1,2], Angelo G. Torrente[1,2], Lucile Fossier[1,2], Leïla Talssi[1,2], Joël Nargeot[1,2], Stéphanie Barrère-Lemaire[1,2], Pietro Mesirca[1,2]✉ & Matteo E. Mangoni[1,2]✉

Cardiac automaticity is set by pacemaker activity of the sinus node (SAN). In addition to the ubiquitously expressed cardiac voltage-gated L-type $Ca_v1.2$ Ca^{2+} channel isoform, pacemaker cells within the SAN and the atrioventricular node co-express voltage-gated L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ Ca^{2+} channels (SAN-VGCCs). The role of SAN-VGCCs in automaticity is incompletely understood. We used knockout mice carrying individual genetic ablation of $Ca_v1.3$ ($Ca_v1.3^{-/-}$) or $Ca_v3.1$ ($Ca_v3.1^{-/-}$) channels and double mutant $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice expressing only $Ca_v1.2$ channels. We show that concomitant loss of SAN-VGCCs prevents physiological SAN automaticity, blocks impulse conduction and compromises ventricular rhythmicity. Coexpression of SAN-VGCCs is necessary for impulse formation in the central SAN. In mice lacking SAN-VGCCs, residual pacemaker activity is predominantly generated in peripheral nodal and extranodal sites by f-channels and TTX-sensitive Na^+ channels. In beating SAN cells, ablation of SAN-VGCCs disrupted late diastolic local intracellular Ca^{2+} release, which demonstrates an important role for these channels in supporting the sarcoplasmic reticulum based "*Ca^{2+} clock*" mechanism during normal pacemaking. These data implicate an underappreciated role for co-expression of SAN-VGCCs in heart automaticity and define an integral role for these channels in mechanisms that control the heartbeat.

Heart automaticity is reliant on the primary pacemaker activity of the sino-atrial node (SAN) and impulse conduction through the principal components of the conduction system: the atrioventricular node (AVN), the His bundle and the Purkinje fibres network[1]. Under physiological conditions, the SAN generates cardiac automaticity whereas the AVN and the Purkinje fibres network initiate automaticity in case of SAN failure. Automaticity in cardiac cells is due to diastolic depolarization, a slow phase of the action potential cycle driving the membrane voltage from the end of the repolarization to the threshold of the following action potential[2]. While several aspects of SAN pacemaker mechanisms are still incompletely understood, there is general agreement that diastolic depolarization is generated by an interplay between the activity of ion channels of the plasma membrane and local diastolic intracellular Ca^{2+} release (LCR) from ryanodine receptors (RyRs) of the sarcoplasmic reticulum (SR)[3–5].

Among plasmalemmal ion channels, hyperpolarization-activated "funny" f-channels of the HCN family[6], voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs)[7], voltage-dependent tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ channels mediating the neuronal Na^+ current ($I_{Na(TTX)}$)[8–11] and transient receptor potential (TRPM and TRPC)[12–14] channels have been shown to contribute to automaticity in the SAN or in the AVN. The contribution of RyR-dependent Ca^{2+} release to automaticity is currently interpreted in the framework of the "*coupled clock*" model of pacemaking[3,15,16]. Two functional components form the *coupled clock*: the spontaneous SR-based "*Ca^{2+} clock*" mechanism and the "*membrane clock*" (or voltage clock)[15]. A cyclical phenomenon of spontaneous voltage-independent LCR events generates the *Ca^{2+} clock*. Indeed, spontaneous LCRs can be observed in the absence of changes in membrane voltage and constitute the hallmark of the *Ca^{2+} clock*[17]. During pacemaking, spontaneous LCRs are generated by early diastolic openings of RyRs that activate the cardiac Na^+–Ca^{2+} exchanger (NCX1)[17,18]. This electrogenic

[1]Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS, Inserm, 141, rue de la cardonille, 34094 Montpellier, France. [2]LabEx ICST, Montpellier, France. [3]Department of Biotechnology and Biosciences, Università Degli Studi di Milano-Bicocca, Milan, Italy. ✉email: Pietro.Mesirca@igf.cnrs.fr; matteo.mangoni@igf.cnrs.fr

transport generates an inward current that contributes to diastolic depolarization[19]. Sequential and cyclical activation of plasmalemmal ion channels during pacemaking forms the *membrane clock*[15,16]. In the *coupled-clock* model of pacemaking, f-channels are important activators of the *membrane clock* at the beginning of diastolic depolarization[15]. In the last fraction of diastolic depolarization, T- and L-type Ca^{2+} channels activate in cooperation with NCX to drive the membrane voltage to the action potential threshold[16]. During the action potential phase, Ca^{2+} entry via L-type VGCCs refills the SR Ca^{2+} load, allowing new diastolic LCRs to occur in the following cycle. Therefore, under normal conditions, the *Ca^{2+} clock* and the *membrane clock* mutually entrain and synchronize to generate robust physiological pacemaking[15,16] (see Refs.[3–5] for review).

The adult mammalian heart expresses three VGCCs isoforms[7]: L-type $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels, as well as T-type $Ca_v3.1$ channels. These isoforms show differential expression in the working myocardium and in automatic tissue. In particular, adult ventricular myocytes express L-type $Ca_v1.2$ channels[20], which couple excitation to contraction in the myocardium[21]. $Ca_v1.2$ channels are also ubiquitously expressed in the SAN region and in the conduction system[20]. In contrast, L-type $Ca_v1.3$ channels are highly expressed in automatic tissue[20] and, in lower densities, in atria[20,22]. Finally, T-type $Ca_v3.1$ channels are not functionally expressed in the adult working myocardium but show strong expression in the SAN and in the AVN[23]. $Ca_v1.3$ functionally differs from the other cardiac L-type isoform. Under basal conditions, the threshold for activation of $Ca_v1.3$-mediated L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) in SAN cells is significantly more negative (− 50 mV) than that of $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} (− 30 mV)[24], which controls the excitation–contraction coupling mechanism in the working myocardium. β-adrenergic activation shifts the threshold of both $Ca_v1.3$- and $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} by ~ 5 mV to more negative voltages[24]. T-type $Ca_v3.1$ channels activate at more negative voltages than $Ca_v1.3$. In SAN cells, the threshold for activation of $Ca_v3.1$-mediated T-type Ca^{2+} current (I_{CaT}) is more negative than that of $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} (− 55 mV) and its half-inactivation voltage is more negative (− 70 mV)[23,24]. Previous studies showed that L-type $Ca_v1.3$ channels contribute to the generation of diastolic depolarization in the SAN[24] and AVN[25,26]. In addition, we have showed that $Ca_v1.3$ channels contribute to the generation of diastolic LCRs and are necessary to synchronize LCRs events under β-adrenergic activation of pacemaking[27]. T-type $Ca_v3.1$ channels have also been shown to contribute to automaticity in the SAN[24,28] and in the AVN[25]. Importantly, loss-of-function of $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ channels underlies congenital[29] and autoimmune[30] forms of SAN dysfunction associated with disturbances of atrioventricular conduction.

Despite this physiological relevance, it is currently unknown whether normal automaticity, heart rate and rhythm are contingent on the co-expression of L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ channels (hereby named SAN-VGCCs). In addition, genetic and functional evidence of the impact of co-expression of SAN-VGCCs within the *coupled clock* model are currently lacking. Here we hypothesised that co-expression of SAN-VGCCs is necessary to generate normal cardiac automaticity and to ensure synchrony between atrial and ventricular rhythmicity. We also hypothesised that, because of their negative voltage threshold for activation, SAN-VGCCs may constitute an important factor for generating the *coupled clock* pacemaker mechanism. To address this, we created a mouse model in which the two SAN-VGCCs expressed in the SAN and the AVN but not in the ventricle have been ablated ($Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$). We demonstrate that co-expression of SAN-VGCCs is necessary to maintain pacemaking in the SAN and for proper impulse propagation, as well as to maintain normal impulse conduction and ventricular rhythmicity. We also show that SAN-VGCCs are necessary to generate late diastolic LCRs involved in the *coupled clock* pacemaker mechanism, a function that $Ca_v1.2$ channels cannot maintain in the absence of SAN-VGCCs.

Results

Concomitant ablation of SAN-VGCCs abolishes VGCCs-mediated Ca^{2+} current in the voltage range of diastolic depolarization. We studied the consequences of concomitant ablation of SAN-VGCCs on total VGCCs-mediated current (I_{Ca}) in isolated SAN pacemaker cells from control and mutant ($Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) mice. I_{Ca} was first recorded from a holding potential (HP) of − 80 mV to record I_{CaL} and I_{CaT}[23,24]. Samples traces of total Ca^{2+} current (I_{Ca}) are reported in Fig. 1A for wild-type, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. To separate I_{CaL} from I_{CaT}, we switched the HP to − 55 mV to inactivate I_{CaT} (Fig. 1A). This HP inactivates about 15–20% of $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}, but completely inactivates $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT}[7]. In wild-type SAN cells, net I_{CaT} was calculated as the difference between traces obtained at HP of − 55 mV from those at HP − 80 mV (Fig. 1B-a, dashed line). We recorded only I_{CaL} flowing through $Ca_v1.3$ and $Ca_v1.2$ isoforms in $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, whereas I_{CaT} was undetectable (Fig. 1B-b). In $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN cells, total I_{Ca} (black dots, Fig. 1B-c) was generated by $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} and $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} (red dots, Fig. 1B-c). We quantified I_{CaT} by subtracting traces obtained at the two different HPs (Fig. 1B-c, dashed line). In $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells the residual I_{Ca} recorded was $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL}, which was recognizable by its activation at positive membrane voltages, and faster inactivation kinetics than $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} recorded in wild-type cells (Fig. 1B-d). No I_{Ca} could be recorded at voltages negative to − 35 mV in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. A comparison between I_{Ca} densities recorded in SAN cells from wild-type and mutant animals is depicted in Fig. 1C (HP = − 80 mV) and Fig. 1D (HP = − 55 mV). In conclusion, concomitant ablation of SAN-VGCCs abolished diastolic I_{Ca} in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells.

Deep bradycardia and heart block in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice. To evaluate SAN pacemaking and atrioventricular (AV) conduction, we recorded in vivo atrial rates (P–P interval) and ventricular rates (HRs) in mutant mice, under control conditions (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1, ANS+) and following combined injection of atropine and propranolol (Fig. 2B, ANS−) to inhibit autonomic input. All mutant mice displayed significant slowing of atrial and ventricular rates: $Ca_v3.1^{-/-}$ (~ 10%), $Ca_v1.3^{-/-}$ (~ 30%) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (~ 35%) in comparison to wild-type counterparts under control conditions (Fig. 2A,C,E and Supplementary

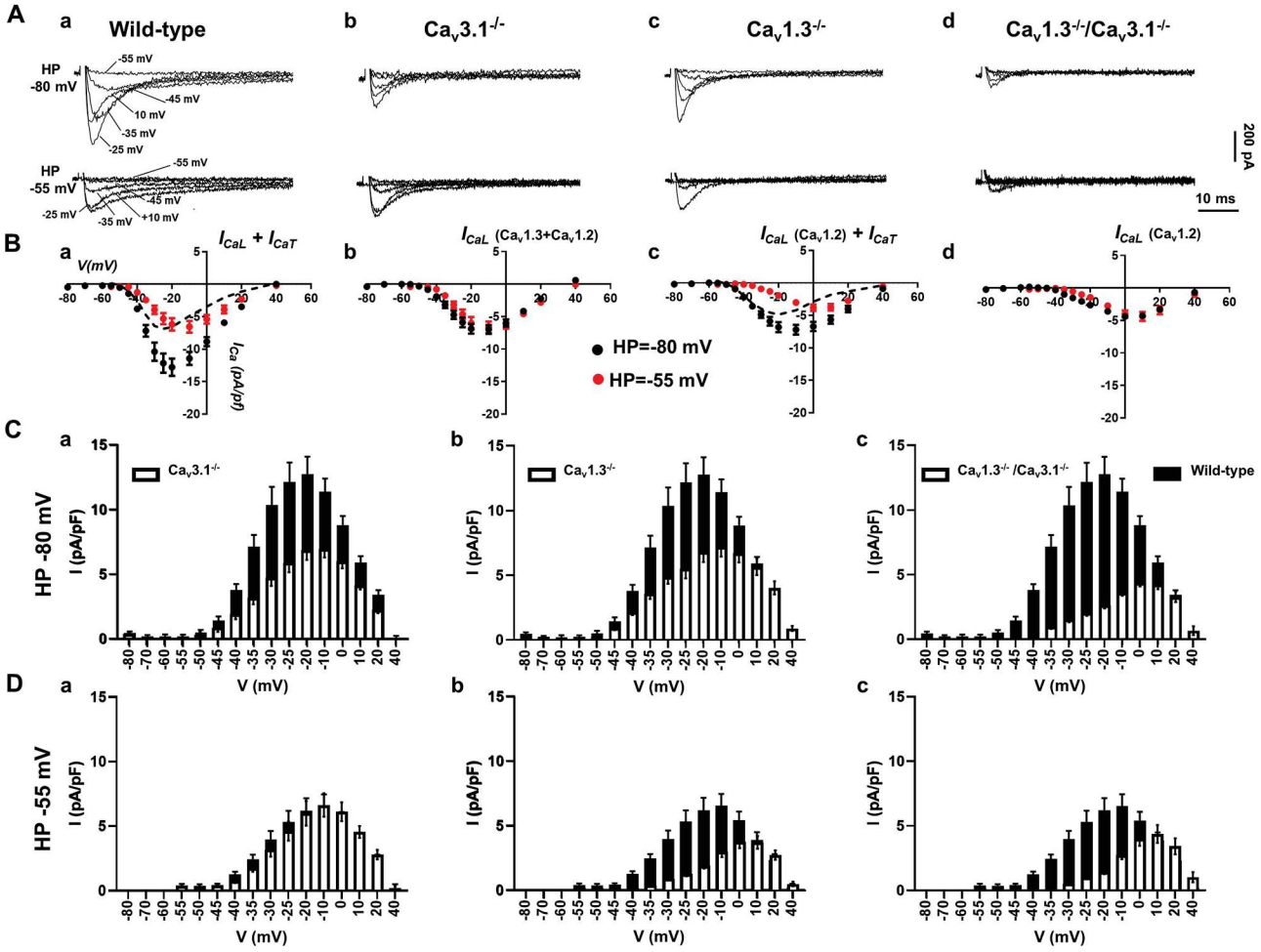
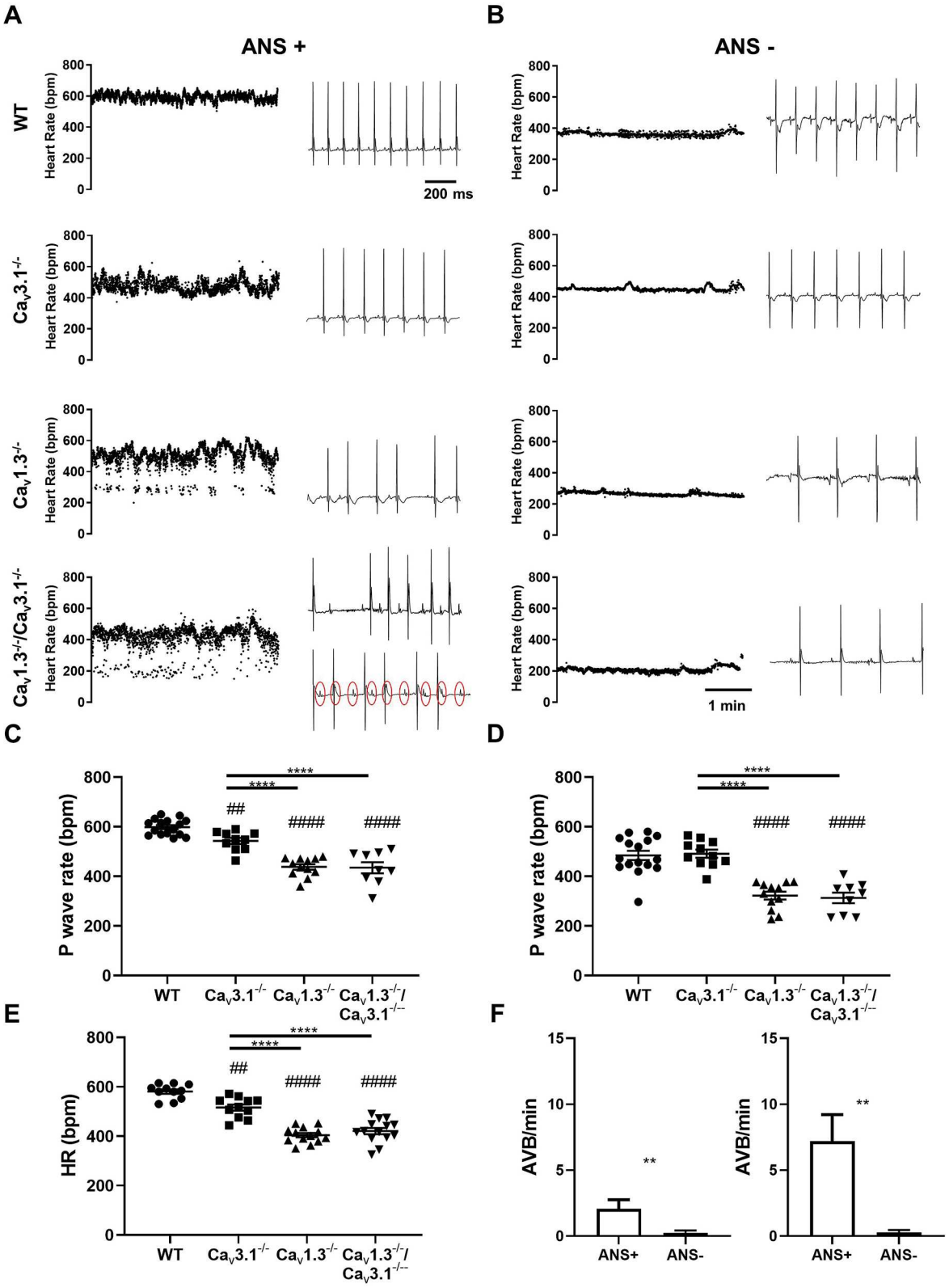


Figure 1. I_{Ca} in isolated SAN cells from wild-type and mutant mice. (**A**) Sample traces recorded from a HP of − 80 mV (top line) or from − 55 mV (bottom line) in SAN cells of wild-type *(WT)* (a), $Ca_v3.1^{-/-}$ (b), $Ca_v1.3^{-/-}$ (c) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (d). (**B**) Current-to-voltage (I–V) relationship of Ca^{2+} current recorded from a HP = − 80 mV (black circles) or from HP = − 55 mV (red circles) in SAN cells from the following genotypes: wild-type (a, n = 16), $Ca_v3.1^{-/-}$ (b, n = 15), $Ca_v1.3^{-/-}$ (c, n = 15) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (d, n = 18). In (a) and (b), the dashed line indicates the net I_{CaT} I–V curve, calculated as the difference between values obtained from HP of − 55 mV from those from HP − 80 mV. (**C**,**D**) Relative density of I_{CaT} and I_{CaL} recorded in SAN cells isolated from wild-type (black bars, n = 16), $Ca_v3.1^{-/-}$ (a, open bars, n = 15), $Ca_v1.3^{-/-}$ (b, open bars, n = 15) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (c, open bars, n = 18) at different test potentials from HP = − 80 mV (**C**) and HP = − 55 mV (**D**).

Fig. 1). We recorded deep bradycardia in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under inhibition of autonomic nervous system (~ 310 bpm, Fig. 2B–D). The averaged atrial rates of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice did not differ significantly, either under control conditions or following inhibition of autonomic nervous system input, suggesting that $Ca_v3.1$ channels may share a common downstream effector with $Ca_v1.3$ to generate pace-making. Both $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice showed high incidence of 2nd degree AV block (Fig. 2A). None of the $Ca_v1.3^{-/-}$ mice studied presented with complete 3rd degree AV block (complete heart block). In contrast, 25% of $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice presented complete 3rd degree AV block (Fig. 2A), indicating additive effects of SAN-VGCCs ablation on AV conduction. Inhibition of the autonomic nervous system input reduced atrial rates in all genotypes tested and abolished 2nd and 3rd degree AV blocks in mutant mice (Fig. 2F). The AV conduction time (PR interval) was increasingly prolonged in mutant $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 1). The uncorrected QT interval was also significantly prolonged in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 1). Taken together, these results indicate additive effects of $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ loss-of-function on AV conduction.

Rhythm dissociation and ventricular arrhythmia in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts. Because we observed complete 3rd degree AV block in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice, we addressed the consequences of concomitant ablation of SAN-VGCCs on intrinsic heart automaticity, in the absence of autonomic input, in Langendorff-perfused hearts (Fig. 3). The spontaneous atrial rates of mutant hearts were lower than that of wild-type counterparts. Contrary to what we observed in vivo, all $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts investigated displayed complete 3rd degree AV block and rhythm dissociation (Fig. 3A,B). Rhythm dissociation was evidenced by the difference


A
ANS +
B
ANS -
WT
Cav3.1-/-
Cav1.3-/-
Cav1.3-/-/Cav3.1-/-
Heart Rate (bpm)
200 ms
1 min
C
P wave rate (bpm)
D
E
HR (bpm)
F
AVB/min
WT
Cav3.1-/-
Cav1.3-/-
Cav1.3-/-/
Cav3.1-/--
ANS+
ANS-

◂**Figure 2.** ECG recordings in wild-type and mutant mice. (**A**) Sample dot plots of heart rate (left panels) and ECG recordings (right panels) under control conditions with autonomic nervous system (ANS+) in wild-type (*WT*, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice. Red circles indicate P waves in ECG recording in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice presenting 3rd degree AV block. (**B**) Dot plots of heart rate (left panels) and ECG recordings (right panels) following intraperitoneal injection of atropine (1 mg/kg) and propranolol (5 mg/kg) to inhibit the input of the autonomic nervous system (ANS−) in *WT*, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$mice. (**C**,**D**). Averaged rate of P waves (atrial rate) in wild-type (n = 16) and mutant mice under control conditions (ANS+) (**C**, $Ca_v3.1^{-/-}$ n = 10, $Ca_v1.3^{-/-}$ n = 12, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n = 9) or following concomitant injection of atropine and propranolol (ANS−) (**D**, *WT* n = 16 $Ca_v3.1^{-/-}$ n = 11, $Ca_v1.3^{-/-}$ n = 12, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n = 9) conditions. (**E**) Averaged ventricular rates (HR) in wild-type (n = 11) and mutant mice ($Ca_v3.1^{-/-}$ n = 11, $Ca_v1.3^{-/-}$ n = 13, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n = 14) under control (ANS+) conditions. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons. Whiskers indicate mean ± the SEM. (#) Indicates comparison with wild-type. (**F**) Number of atrioventricular blocks (AVB) under control and atropine and propranolol inhibition conditions in n = 12 $Ca_v1.3^{-/-}$ (left) and n = 9 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (right) mice. Statistics: unpaired *t* test. (#) Indicates comparison with wild-type. Statistics: Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

between measured atrial and ventricular rates in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts (Fig. 3C). Furthermore, concomitant ablation of the two SAN-VGCCs was highly proarrhythmic. Indeed, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts showed atrial and ventricular escape rhythms, suggesting extranodal impulse generation, as well as episodes of ventricular tachycardia (Supplementary Fig. 2). Taken together, these observations indicated that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupted normal automaticity of intact hearts by impairing impulse generation in the SAN, as well as by inducing complete block of AV conduction and ventricular arrhythmia.

Concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupts SAN automaticity and shifts the pacemaker leading sites to peripheral SAN or to extranodal locations. Since we recorded limited residual SAN driven heart automaticity in isolated $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts we attempted to study SAN impulse formation and localization using optical mapping (OM) of membrane voltage in isolated SAN/atria preparations. All wild-type SAN/atria preparations consistently displayed the pacemaker leading site within a limited region of the central cranial side of the SAN at the entry of superior *vena cava* in the right atrium and close to the border of the *Crista Terminalis* (Fig. 4A). In contrast, we found that automaticity in $Ca_v3.1^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN/atria preparations was characterized by the presence of at least two leading sites with alternating dominance in 5 out of 8 and in 4 out of 7 tissues tested, respectively (Fig. 4A). In addition, 2 out of 7 $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN/atria preparations showed 3 alternating leading sites. Finally, all $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ preparations studied displayed alternating automaticity between two or three leading sites (Fig. 4A). In $Ca_v3.1^{-/-}$ preparations, secondary leading sites appeared in the correspondence of the nodal extension caudally to the inferior *vena cava*[31]. In $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria we observed secondary leading sites also in the right or left atrium (Fig. 4A). Emergence of multiple extranodal leading sites was accompanied by increasingly slow automaticity in $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations (Fig. 4B). Consistent with slowing of automaticity, the coefficient of variability of atrial rate also increased with concomitant ablation of SAN-VGCCs in comparison to wild-type counterparts (Fig. 4C). The rate of atrial impulse was negatively correlated with the distance between the alternating leading sites, suggesting increasing dominance of peripheral SAN or extranodal sites in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations (Fig. 4D). Taken together, these observations indicate that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupted primary SAN automaticity and shifted pacemaker activity to peripheral SAN or to extranodal sites resulting in slow atrial rates.

I_f and I_{NaTTX} sustain automaticity in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo. Since we observed residual automaticity in hearts of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, originating either in the peripheral SAN or in extranodal regions (Fig. 4), we attempted to identify the mechanisms underlying residual pacemaking. f-(HCN) channels underlie cardiac I_f[32,33]. Because of their direct sensitivity to intracellular cAMP, f-channels are targets of opposite regulation of HR by catecholamines and acetylcholine[2]. We thus hypothesized that the decrease in HR observed in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice following inhibition of the autonomic nervous system was generated by concomitant atropine induced I_{KACh} inhibition[34,35] and propranolol induced shift of I_f activation to more negative voltages (Fig. 2B). We thus administered selective I_f blocker ivabradine (6 mg/kg) to wild-type and mutant mice and recorded HR under these conditions (Fig. 5). Ivabradine decreased the HR in all genotypes and reduced atrioventricular blocks in in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (Fig. 5A–D). The HR recorded in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under ivabradine administration was similar to that observed in the same mice under atropine and propranolol, suggesting that I_f was contributing to set the HR in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo under the action of the autonomic nervous system. We did not observe episodes of spontaneous atrial or ventricular arrhythmia in wild-type or mutant mice upon administration of ivabradine. The difference in HR before and after ivabradine administration was similar among wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ mice, but was increased in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$mice (Fig. 5D), showing that individual deletion of $Ca_v1.3$ or concomitant ablation of SAN-VGCCs increased the relative importance of I_f to residual HR.

We then investigated the origin of the residual SAN automaticity following inhibition of I_f under ex vivo conditions, to prevent potentially lethal bradycardia in vivo. Similarly to in vivo conditions, ivabradine (10 μM) induced low HRs in isolated hearts from mutant $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (< 100 bpm; Fig. 6A). Previous work showed that $I_{Na(TTX)}$ contributes to the basal HR and to SAN pacemaker activity in mammals[8–11]. We thus employed a moderate concentration of TTX (100 nM) to investigate the contribution of this current to the

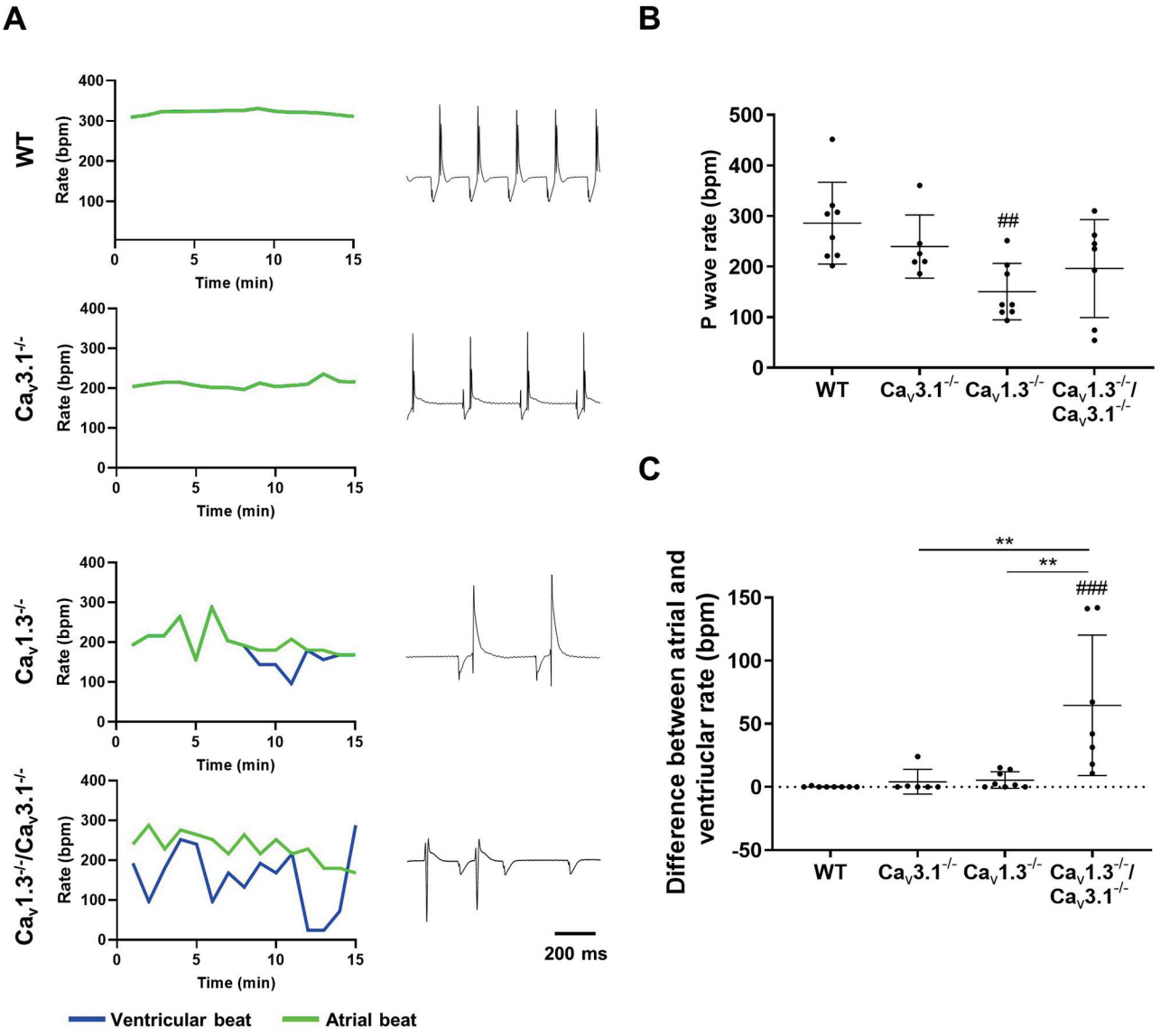


Figure 3. Rhythm dissociation in mutant hearts following concomitant deletion of SAN-VGCCs. (**A**) Line plots of atrial (green line) and ventricular (blue line) rates (left panel) and sample ECGs (right panel) recorded ex vivo on isolated Langendorff perfused heart under control conditions in n = 8 *WT*, n = 6 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 8 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 7 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. (**B**) P wave rates in isolated wild-type and mutant hearts under control conditions. (**C**) Differences between atrial and ventricular rates of isolated hearts. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons. Whiskers indicate mean ± the SEM. (#) Indicates comparison with wild-type.

residual automaticity of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts under conditions of I_f block by ivabradine. TTX further reduced HR in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts to very low levels (< 50 bpm; Fig. 6B). Since part of this residual automaticity could come from impulse generation in extranodal sites (Fig. 5), we directly investigated SAN automaticity by OM of the pacemaker impulse following pharmacologic inhibition of I_f (Fig. 6C), or concomitant I_f and $I_{Na(TTX)}$ blockade (Fig. 6D). Blockade of $I_{Na(TTX)}$ in SANs perfused with ivabradine arrested impulse generation in 4/6 $Ca_v1.3^{-/-}$ and 3/6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ preparations (Fig. 6D). Very low rates of spontaneous depolarization were recorded in 5 SAN/Atria preparations from $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice still presenting residual automaticity (< 40 bpm, Fig. 6D). In contrast, ablation of SAN-VGCCs did not affect the impulse conduction time to the atria (Supplementary Fig. 3). Similarly, ivabradine and TTX did not prolong the impulse conduction times to the right and left atria (Supplementary Fig. 3). These data indicate that while SAN-VGCCs strongly affected SAN automaticity, they were not directly involved in impulse conduction from the SAN to atria.

Concomitant ablation of SAN-VGCCs impaired the generation of SAN impulse in the SAN (Figs. 3, 4). Hence, we recorded automaticity of isolated SAN cells from wild-type and mutant mice (Fig. 7). Individual $Ca_v1.3$ knockout and concomitant ablation of the two SAN-VGCCs similarly slowed basal automaticity of isolated SAN cells and reduced the slopes of linear and exponential phases of the diastolic depolarization (Fig. 7A–D, Supplementary Table 1). In addition, individual $Ca_v1.3$ or concomitant SAN-VGCCs ablation hyperpolarized the action potential

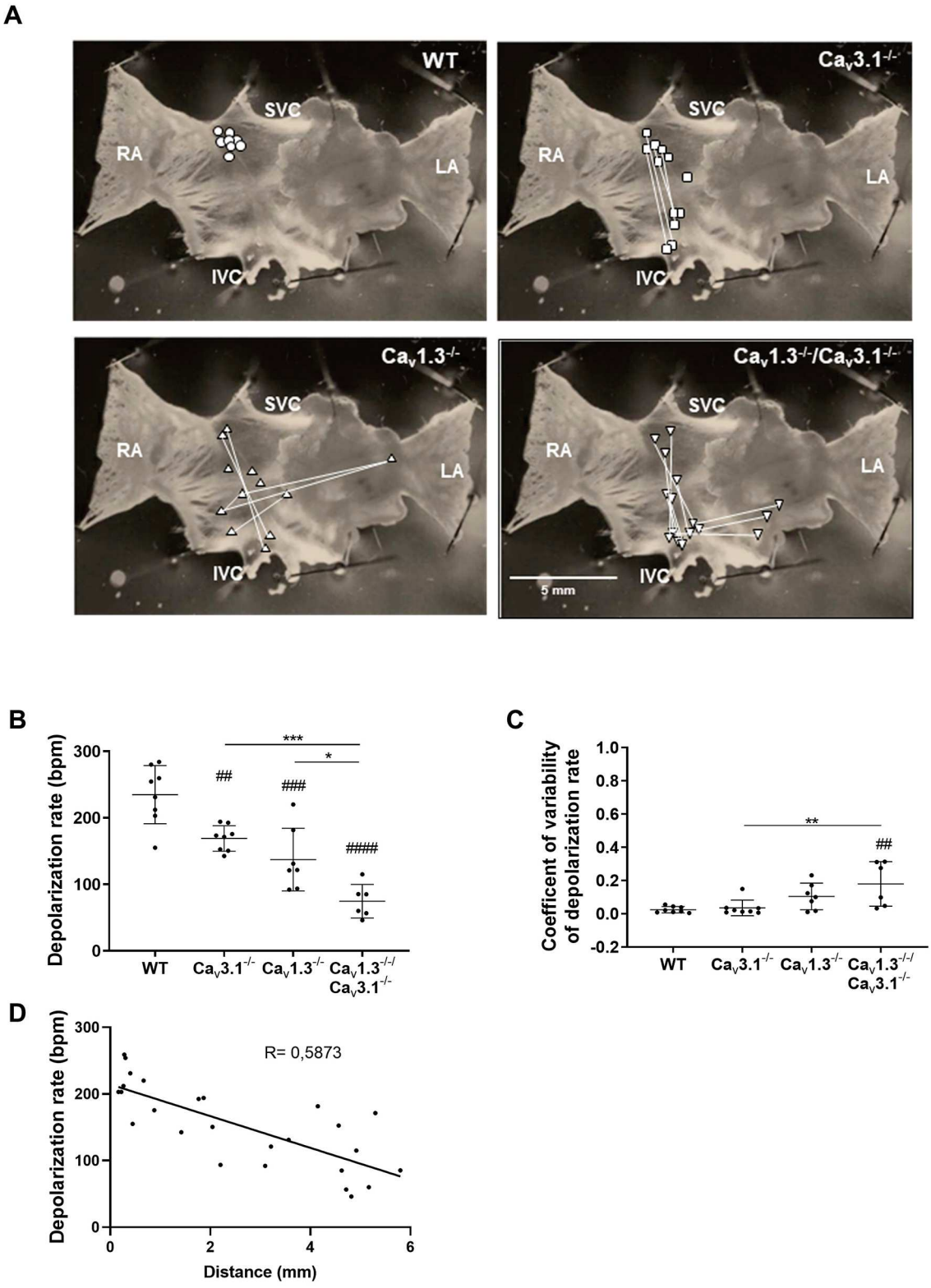


Figure 4. SAN automaticity and distribution of pacemaker leading sites in SAN/atria from wild-type and mutant mice. (**A**) Sample snapshots of SAN/atria preparations with points showing the position of the pacemaking leading region. Connecting lines indicate alternating leading regions in in the same mutant SAN. (**B**) Comparison between atrial rates of n = 8 wild-type, n = 8 *Ca$_v$3.1$^{-/-}$*, n = 7 *Ca$_v$1.3$^{-/-}$* and n = 6 *Ca$_v$1.3$^{-/-}$/Ca$_v$3.1$^{-/-}$* SAN/atria preparations. (**C**) Coefficient of variability of atrial rates from the same mice as in (**B**). Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± the SD. (**D**) Linear regression between the rate from the leading region and the distance from the normal leading region recorded in wild-type preparations. (#) Indicates comparison with wild-type.

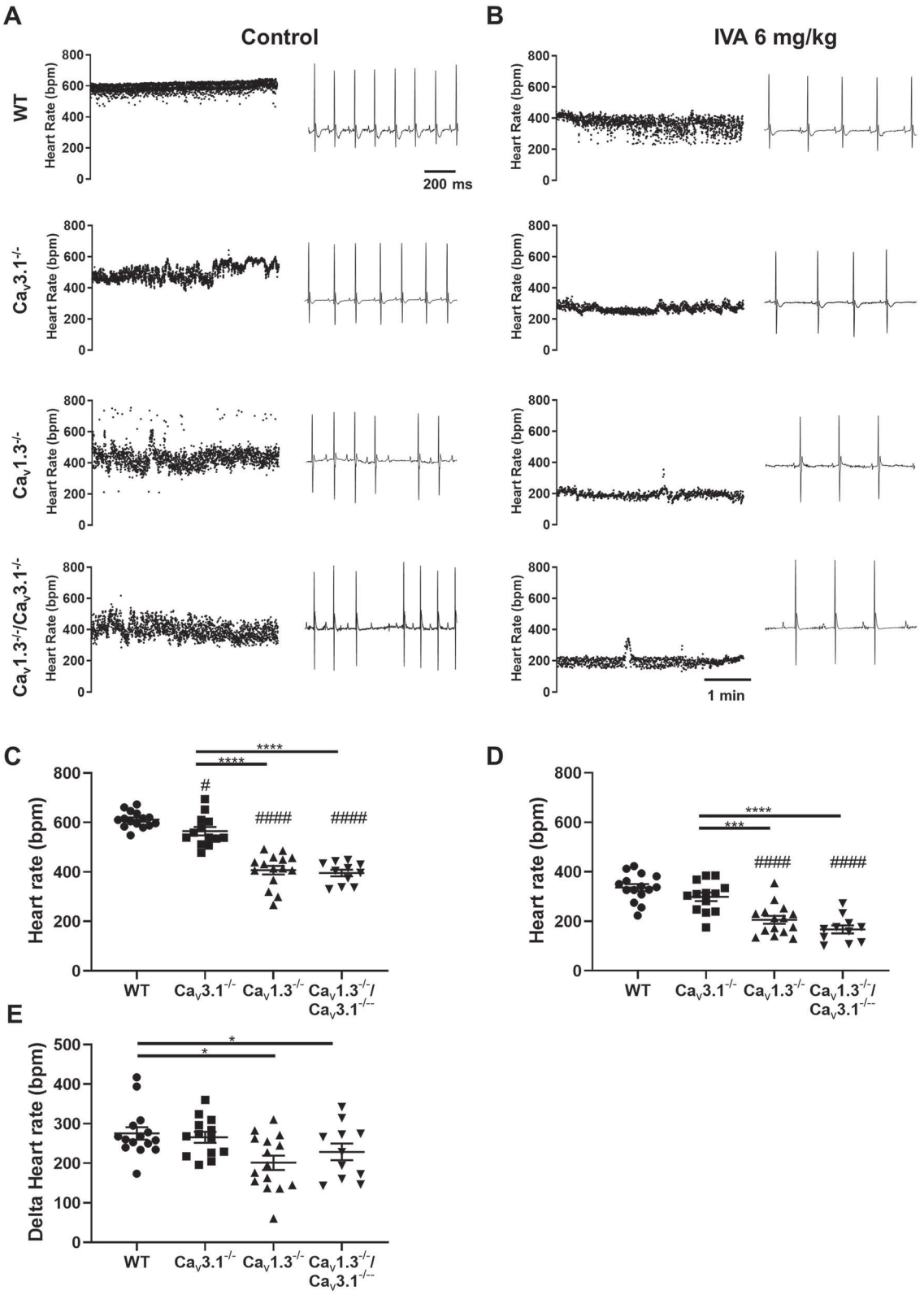


Figure 5. Heart rates in wild-type and mutant mice under pharmacologic inhibition of I_f. Dot plots of heart rates and sample ECGs recorded before (**A**) and after (**B**) intraperitoneal (IP) injection of ivabradine (IVA, 6 mg/kg) in n = 14 *WT*, n = 9 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 10 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 14 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice. Plotted averaged heart rates measured before (**C**) and after (**D**) IVA injection in all genotypes. (**E**) Relative effect of IVA 6 mg/kg (I.P. injection) on heart rates measured in all genotypes. In panels (**C**, **D**) and (**E**), whiskers indicate mean ± the SEM. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. (#) Indicates comparison with wild-type mice.

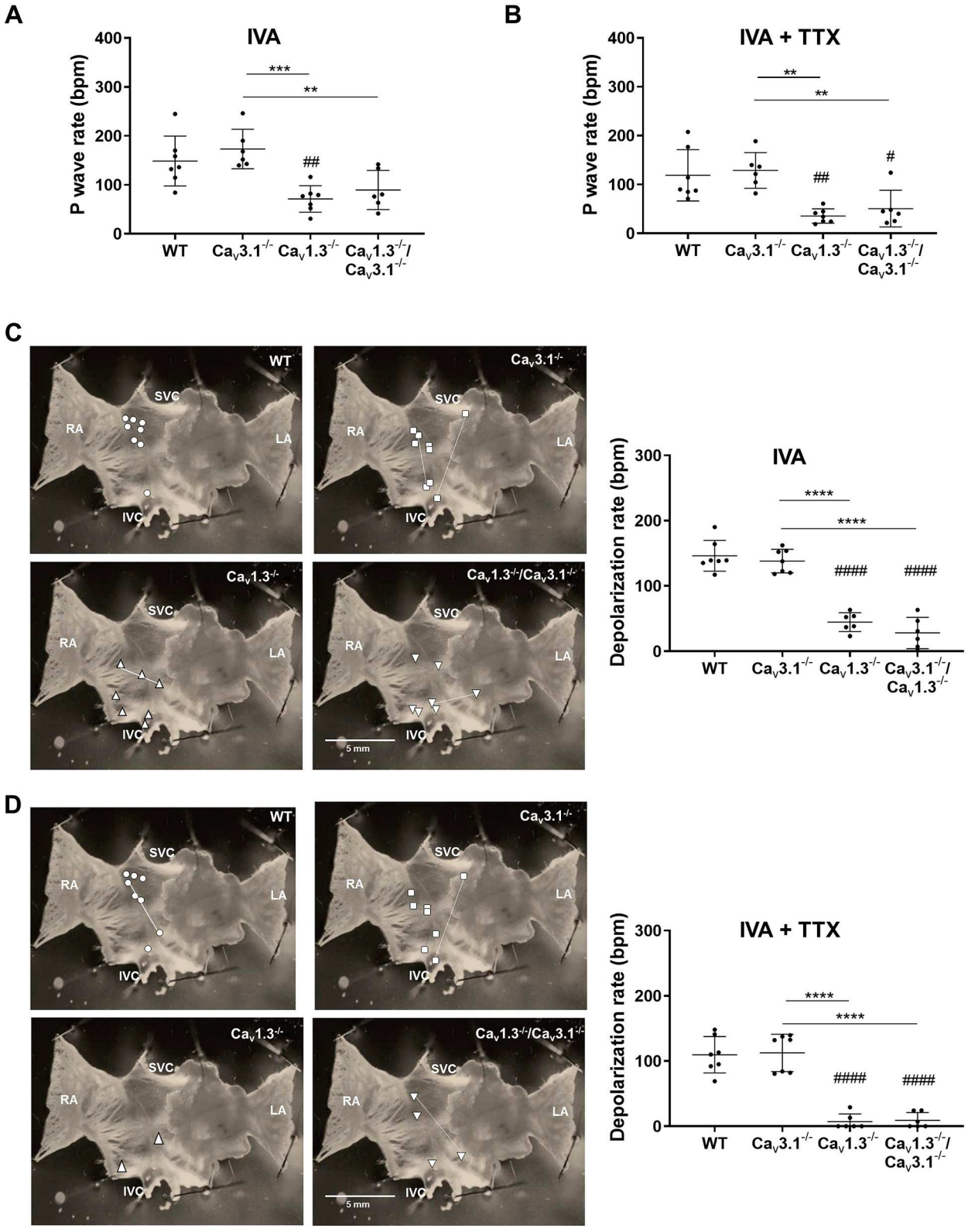


Figure 6. Pacemaker arrest by concomitant inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN/atria preparations. (**A**) Atrial rates of n = 7 *WT*, n = 6 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 7 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ isolated Langendorff hearts under ivabradine (IVA, 10 µM) perfusion. (**B**) Atrial rates of isolated hearts under IVA 10 µM + TTX 100 nM perfusion. (**C**) Sample snapshots of the localization of leading regions under IVA 10 µM perfusion (left panels) and averaged rates of depolarization in n = 7 *WT*, n = 7 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations. (**D**) Same representation as in (**C**) with leading region in IVA 10 µM + TTX 100 nM perfusion. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± the SD. (#) Indicates comparison with wild-type.

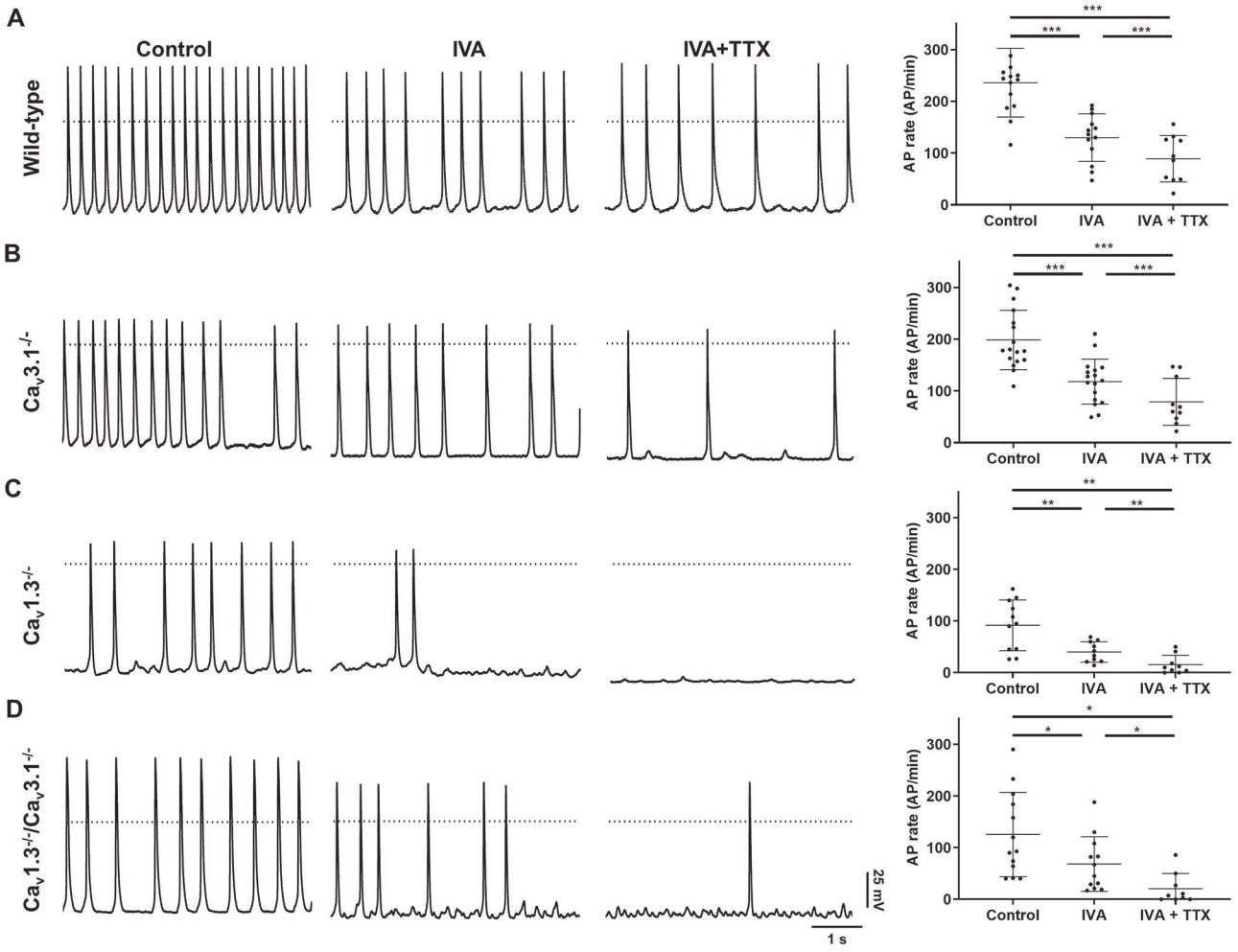


Figure 7. Pacemaker activity in SAN cells from wild-type and mutant mice. Sample perforated-patch action potential recordings (left panels) of SAN cells under control conditions (control), following perfusion of IVA (3 μM) and concomitant perfusion of IVA and TTX (IVA + TTX, 50 nM), from wild-type (**A**, n = 14), $Ca_v3.1^{-/-}$ (**B**, n = 17), $Ca_v1.3^{-/-}$ (**C**, n = 11) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (**D**, n = 13). The left panels show corresponding averaged rates of action potentials. Statistics: one-way ANOVA followed by Holm–Sidak multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± SD.

threshold to more negative voltages in comparison to wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, without affecting the cells' maximum diastolic potential (Supplementary Table 1). Superfusion of ivabradine alone significantly slowed automaticity of SAN cells isolated from all genotypes (Fig. 7A–D). Ivabradine also significantly hyperpolarized the maximum diastolic potential in SAN cells (Supplementary Table 2), indicating that I_f contributed to set the equilibrium between inward and outward currents at the end of the repolarization phase. Concomitant perfusion of ivabradine and TTX further slowed automaticity in comparison to ivabradine alone in SAN cells from all genotypes (Fig. 7A–D). Concomitant perfusion of ivabradine and TTX slowed but did not arrest automaticity of wild-type or $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells (Fig. 7A,B). In contrast with $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells and consistently with OM recordings, concomitant inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ slowed the rate of spontaneous action potentials by ~80% and arrested automaticity in 2 out of 9 of $Ca_v1.3^{-/-}$ and in 3 out of 9 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ isolated SAN cells (Fig. 7C,D). We tested also if concomitant selective pharmacologic inhibition of SAN-VGCCs affected automaticity of SAN cells similarly to genetic ablation. To obtain selective inhibition of $Ca_v1.3$ channels, we employed SAN cells from mice carrying dihydropyridine (DHP) resistant $Ca_v1.2$ channels ($Ca_v1.2^{DHP-/-}$, see Ref.[36]). In $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice, $Ca_v1.2$ channels have been rendered insensitive to DHP by knock-in a point mutation in the channel DHP binding site[36]. Concomitant perfusion of the T-type selective inhibitor TTA-A_2 and nifedipine slowed the rate of spontaneous action potentials by ~90% (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Table 3). These data indicate that the strong reduction of SAN automaticity following ablation of SAN-VGCCs could not be explained by a remodeling phenomenon of the pacemaker mechanism in mice globally lacking SAN-VGCCs.

Concomitant ablation of SAN-VGCCs reduced late diastolic local Ca^{2+} release linked to the *coupled clock* pacemaker mechanism. Experiments on SAN/Atria preparations and recordings of isolated SAN cells from $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under concomitant inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ showed

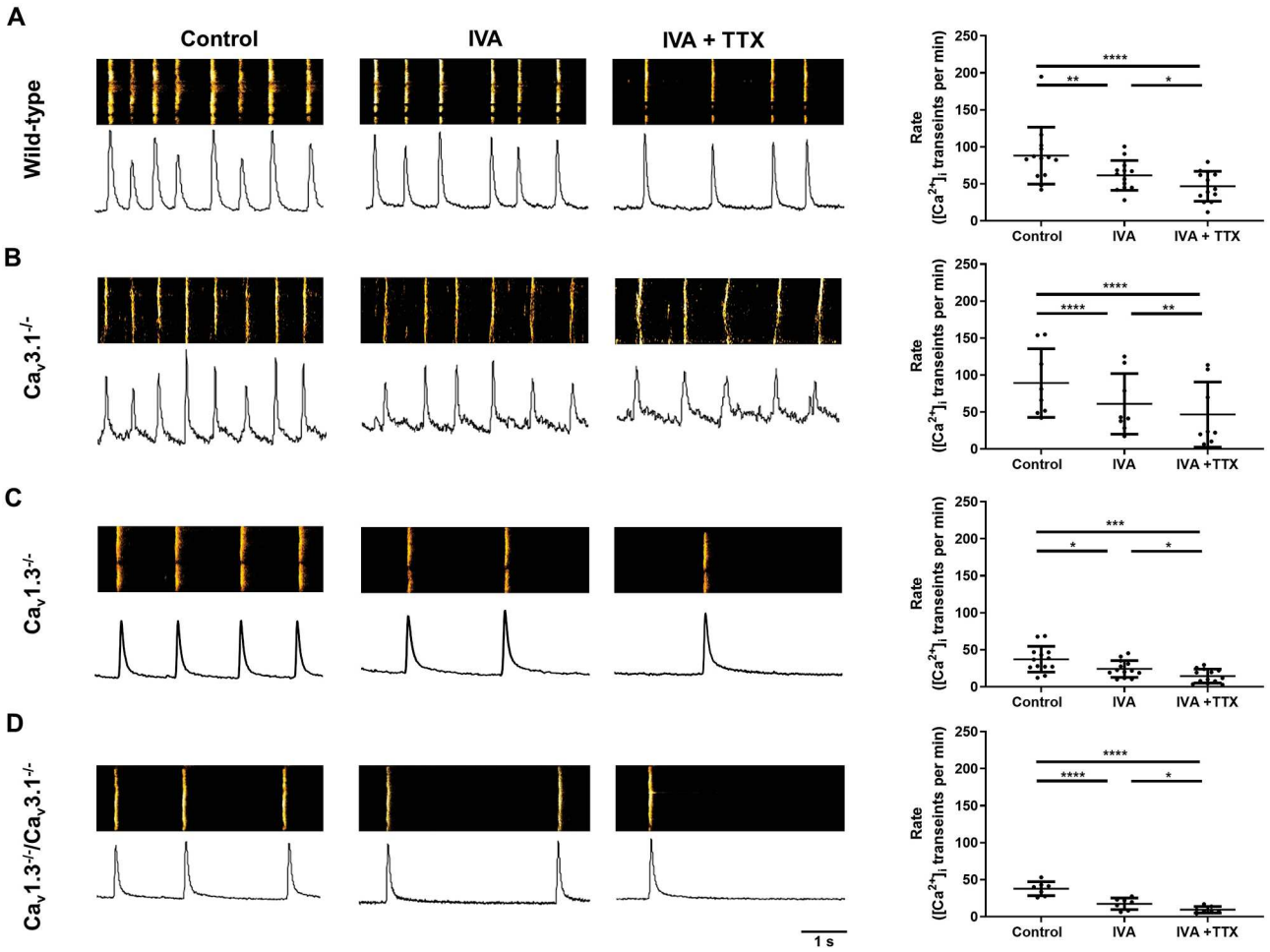


Figure 8. Confocal line scan imaging of intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) release during pacemaker activity of SAN cells from wild-type and mutant mice. Confocal line scan (left) images (top, left), corresponding sample traces of the time integral (bottom, left) and averaged frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients (right) of SAN cells form wild-type (**A**, n = 13), $Ca_v3.1^{-/-}$ (**B**, n = 8), $Ca_v1.3^{-/-}$ (**C**, n = 13) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (**D**, n = 7) loaded with Fluo-4 and perfused with Tyrode's solution (left) or IVA 3 µM (center) or IVA 3 µM + TTX 50 nM (right). Statistics: one-way ANOVA followed by Holm–Sidak multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± the SD.

arrest of automaticity. This observation suggests that, following ablation of SAN-VGCCs, functional association between RyR-dependent LCRs underlying the *Ca^{2+} clock* and L-type $Ca_v1.2$ channels could not consistently generate residual pacemaking under these conditions. We previously showed that $Ca_v1.3$ channels positively regulate the frequency and synchrony of LCRs during pacemaking[27]. Therefore, we recorded RyR-dependent Ca^{2+} release and $[Ca^{2+}]_i$ dynamics in wild-type and mutant SAN cells to investigate the consequences of SAN-VGCCs ablation on late diastolic LCRs, which constitute one hallmark of the *coupled clock* pacemaker mechanism[15]. In line with recordings of spontaneous action potentials, the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients was similar in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, but lower than in wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ counterparts (Fig. 8A–D). Concomitant blockade of I_f and $I_{Na(TTX)}$ reduced the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients by 62% in $Ca_v1.3^{-/-}$ and by 74% in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, leading to very low averaged rates of automaticity (< 15 bpm; Fig. 8C,D).

We then analyzed LCRs events occurring in the late diastolic interval[3]. These late diastolic LCRs generate an ascending phase (ramp) of the average fluorescence ratio (F/F_0) signal (Fig. 9A)[27,37]. We observed reduced events of late diastolic LCRs in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells (Fig. 9A). The reduction in LCRs was reflected in diminished time integral of the ramp phase in comparison to wild-type cells (Fig. 9B). The slope of the ramp phase is indicative of the degree of synchronization of late LCRs and constitute an important parameter of the capability of the *coupled clock* to promote diastolic NCX1 activity hence pacemaking[15,16,38]. The slope of the ramp phase was strongly decreased in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells (Fig. 9C). We did not record significant differences in the time integral or ramp slope between $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. In conclusion, these observations indicated that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupted late diastolic LCRs, which constitute an important component of the *coupled clock* pacemaker mechanism.

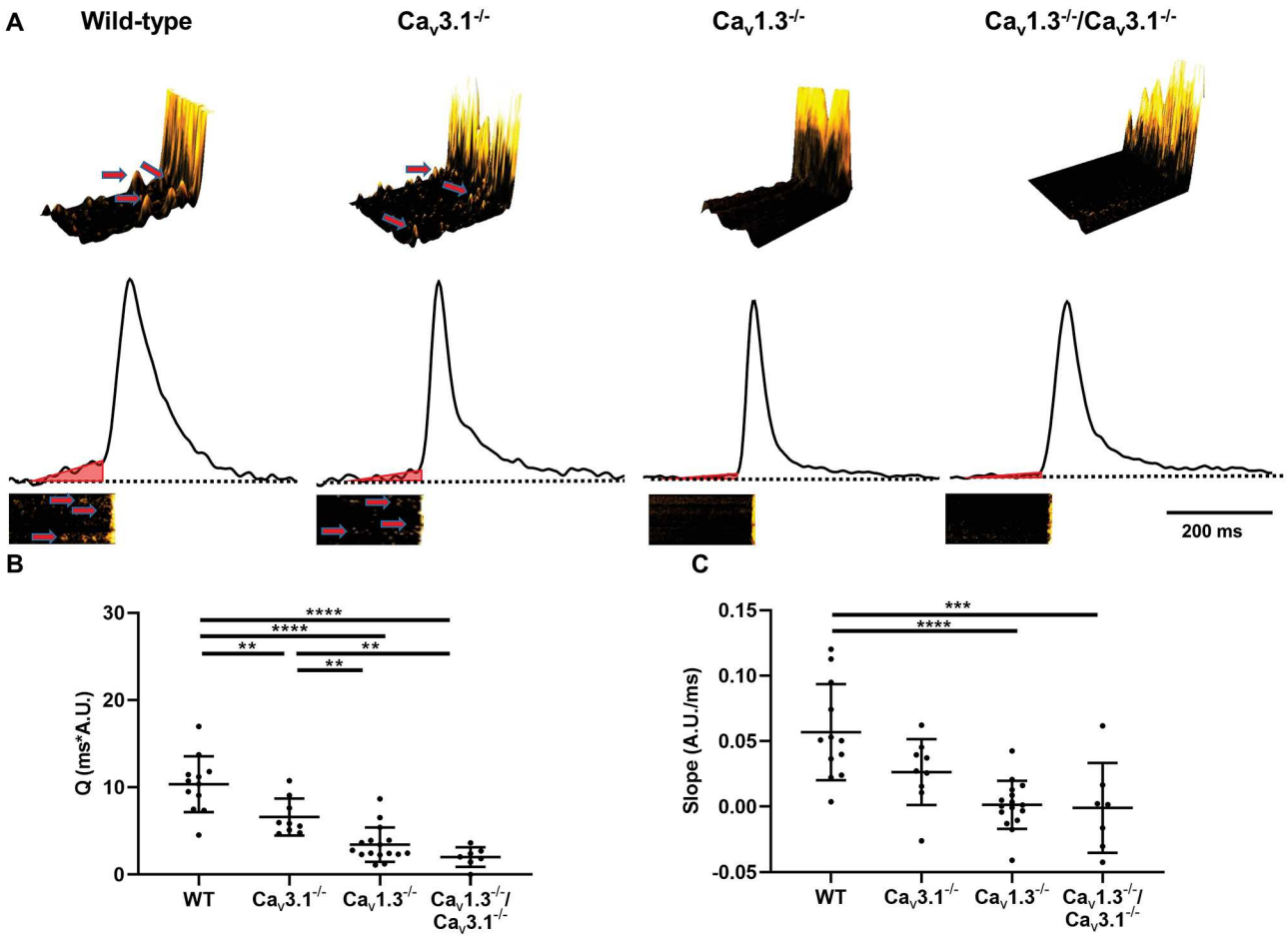


Figure 9. Genetic ablation of SAN-VGCCs suppresses late diastolic local $[Ca^{2+}]_i$ release (LCR). (**A**, top panel). Samples of 3D reconstruction of recordings of the change in fluorescence ratio F/F_0 recorded 150 ms before the spontaneous cell-wide $[Ca^{2+}]_i$ release transient. Red arrows indicate late diastolic LCR. (**A**, bottom panel). Corresponding samples traces of the time integral of the fluorescence ratio F/F_0 signal recorded from wild-type, *Ca$_v$3.1$^{-/-}$*, *Ca$_v$1.3$^{-/-}$*, *Ca$_v$1.3$^{-/-}$/Ca$_v$3.1$^{-/-}$* isolated SAN cells. Red triangles represent the zone considered for calculating the slope and time integral of ramp phases, which reflects late diastolic LCR. The ramp phase was calculated starting 150 ms before the peak of the $[Ca^{2+}]_i$ transient. The bottom insets show corresponding 2D line scan images. Time integral (Q) of F/F_0 (**B**) and slope (**C**) of the ramp phase in n = 12 wild-type, n = 9 *Ca$_v$3.1$^{-/-}$*, n = 16 *Ca$_v$1.3$^{-/-}$* and n = 7 *Ca$_v$1.3$^{-/-}$/Ca$_v$3.1$^{-/-}$* isolated SAN cells. A.U. indicate arbitrary units of the F/F_0 ratio. Statistics: one-way ANOVA followed by Holm–Sidak multi comparison test.

We previously showed that ablation of Ca$_v$1.3 channels preserves the SR Ca^{2+} load[27]. Therefore, we challenged wild-type and mutant SAN cells by rapid dumping of $[Ca^{2+}]_i$ using caffeine (10 mM). The caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transient of wild-type and *Ca$_v$3.1$^{-/-}$* SAN cells showed comparable amplitudes (F/F_0, Supplementary Fig. 5A). In contrast, *Ca$_v$1.3$^{-/-}$* and *Ca$_v$1.3$^{-/-}$/Ca$_v$3.1$^{-/-}$* SAN cells showed increased F/F_0 value in comparison to wild-type counterparts (Supplementary Fig. 5A). The decay time (τ) of the caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transient did not differ between wild-type and mutant SAN cells, indicating similar activities of SERCA and NCX in all genotypes tested (Supplementary Fig. 5B). Finally, we compared the total number of LCRs, irrespectively from their relative position in diastolic interval, as we described previously[27]. We did not record significant differences in the total number of diastolic LCRs under perfusion of ivabradine (3 μM) or concomitant perfusion of ivabradine (3 μM) and TTX (50 nM) in comparison to control conditions in all the genotypes tested (Supplementary Fig. 5C), indicating that inhibition of I_f or $I_{Na(TTX)}$ did not alter the function of RyRs. Taken together, these results show that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupts late diastolic LCRs underlying the SAN *coupled clock* mechanism of pacemaking.

Discussion

Impact of the study. In this study, we show for the first time that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupts heart automaticity and suppresses late diastolic LCRs, which are an important factor of the *coupled clock* pacemaker mechanism in SAN cells. SAN-VGCCs ablation compromised SAN impulse generation, impaired atrioventricular conduction and destabilized ventricular rhythmicity. Particularly, we show that Ca$_v$3.1 channels play an important role in stabilizing atrial and ventricular rhythmicity in isolated *Ca$_v$1.3$^{-/-}$* hearts. We also report

that in both $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations, residual pacemaker activity is predominantly generated in peripheral nodal and extranodal sites by f-channels and TTX-sensitive Na^+ channels.

The physiological role of SAN-VGCCs in orchestrating heart automaticity has been long overlooked. Therefore, designs of many currently published studies and review articles on physiopathology of heart automaticity do not still properly factor SAN-VGCCs. The original formulation of the *coupled clock* model of pacemaking ascribed predominant roles for f-channels and spontaneous voltage-independent diastolic LCRs, respectively as key components of the *membrane clock* and of the Ca^{2+} *clock* in the generation of the diastolic depolarization[3,5,15]. In this model, cooperation between f-channels and NCX1 was the dominant electrogenic mechanism in the generation of diastolic depolarization. The contribution of I_{CaT} was predicted to be reduced in comparison to that of I_f and NCX1[15]. Another important factor in the *coupled clock* is high basal intracellular cAMP concentrations and elevated activity of protein kinases that contribute to mutual entrainment between diastolic RyR-dependent Ca^{2+} release underlying the Ca^{2+} *clock* and the *membrane clock*. The earlier *coupled clock* model by Maltsev and Lakatta[15] also included activation of I_{CaL} at positive voltages corresponding to the action potential threshold[15]. Thus, while I_{CaL} did not directly contribute to the generation of diastolic depolarization per se, Ca^{2+} entry via I_{CaL} during the action potential phase was necessary to restore SR Ca^{2+} load to prime a new cycle of diastolic LCRs[15]. However, this *coupled clock* model did not include evidence showing that SAN cells express both $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL}, activating at positive systolic voltages, as well as $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}, activating at diastolic voltages and supplying Ca^{2+} entry during diastolic depolarization[24]. In addition, further work from our group showed that Ca^{2+} entry via $Ca_v1.3$ channels control RyR-dependent Ca^{2+} release by triggering and synchronizing diastolic LCRs events[27]. The most recent version of the *coupled clock* model of pacemaking by Lyaskov et al.[16] includes a more negative activation threshold for activation of I_{CaL}[16] (− 40 mV, see Ref.[39]), than in the previous version of the model[15]. Numerical simulations using the Lyaskov et al. *coupled clock* model[16] predict that this negative shift of I_{CaL} activation induces functional cooperativity, between LCRs, NCX1 and I_{CaL} to generate exponential phase of diastolic depolarization (referred to as "ignition phase"). The present study is consistent with this model. However, and importantly for the current models of pacemaking, we now provide direct genetic and functional evidence showing that the mechanism of SAN dysfunction following ablation of SAN-VGCCs involves suppression of Ca^{2+} entry in the voltage range spanning the diastolic depolarization and impairment of generation of late diastolic LCRs. Thus, SAN-VGCCs provides an important regulatory mechanism in sustaining the Ca^{2+} *clock* during normal pacemaking by promoting the *coupled clock*. In addition, our study shows that coupling between $Ca_v1.2$ and random LCRs generated by RyR-dependent Ca^{2+} release cannot consistently generate viable SAN automaticity following ablation of SAN-VGCCs and inhibition of f-channels. In this context, our data indicate that future models of pacemaking should include $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ channels as additional mechanisms of coupling between the Ca^{2+} *clock* and the *membrane clock*, and distinguish between functional roles of $Ca_v1.3$ from $Ca_v1.2$ channel isoforms.

Role of SAN-VGCCs in Ca^{2+} entry in SAN diastolic depolarization. Concomitant ablation of SAN-VGCCs abolished I_{Ca} at voltages spanning the range between ~ − 60 mV and ~ − 35 mV corresponding to diastolic depolarization in wild-type cells (Fig. 1, Supplementary Table 1). Previous work showed that $Ca_v3.1$ channels activate at more negative voltages than $Ca_v1.3$ channels[7,24]. However, their limited steady-state availability at the maximum diastolic potential (~ 90% steady-state inactivation at − 60 mV)[24] predicts smaller $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} than $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}[23]. This suggests more limited contribution of $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} to SAN diastolic depolarization than of $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}. Furthermore, beside the higher steady-state availability of $Ca_v1.3$ than $Ca_v3.1$ at diastolic voltages, $Ca_v1.3$ channels are also an essential molecular component of the sustained inward Na^+ current (I_{st})[40], which constitute an additional contributor to diastolic depolarization[41]. It is thus possible that, while $Ca_v1.3$ channels contribute to the pacemaker mechanisms via I_{CaL}/I_{st} inward currents[24,40] and generation of LCRs (Ref.[35] and this study), the predominant contribution of $Ca_v3.1$ channels to SAN pacemaking is regulation of LCRs connected to the *coupled clock* mechanism. In line with this hypothesis, we did not observe additivity between individual ablation of $Ca_v1.3$ and concomitant ablation of SAN-VGCCs on atrial rate in *vivo* (Fig. 2), as well as in Langendorff-perfused intact hearts (Fig. 3). Thus, another important factor determining similar HRs in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice is the convergence of SAN-VGCCs to a common downstream intracellular effector: the generation of diastolic LCRs (Fig. 9). This hypothesis is also consistent with previous evidence on the role of $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} in generating diastolic LCRs in atrial subsidiary pacemaker myocytes[37]. However, isolated SAN/atria from $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts showed significantly slower intrinsic automaticity than that of $Ca_v1.3^{-/-}$ counterparts (Fig. 4). The discrepancy between the additivity of the effect of SAN-VGCCs in isolated $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts and SAN/atria preparations and the observations in vivo could be explained by the action of the autonomic nervous system and by physiological mechanoelectrical feedback stimulating pacemaking in working hearts in vivo.

Role of SAN-VGCCs in SAN automaticity. The observation that $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts ex vivo present with junctional atrial and ventricular rhythmicity rather than SAN rhythm led us to investigate automaticity using isolated SAN/atria preparations. Both and $Ca_v3.1^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ presented with shift of the leading pacemaker sites from central to peripheral SAN areas (Fig. 4). Pacemaker shift is a well-known phenomenon in which groups of automatic cells eventually become dominant following manoeuvres that reduce intrinsic spontaneous activity of previously dominant leading sites (see Ref.[42], for review). Shift is due to heterogeneity of expression of ion channels[42] and proteins regulating the Ca^{2+} *clock* in the SAN[43,44]. Recent work has shown that normal SAN impulse is initiated in the leading site by HCN4-expressing cells showing heterogeneous Ca^{2+} signals[45]. Indeed, these cells present with spontaneous LCRs, or LCRs followed by cell-wide Ca^{2+} transients. These cells can entrain the activity of neighbouring cells or cluster of cells. Different clusters can synchronize their activity

to promote the emergence of the SAN impulse[45]. It is thus tempting to speculate that deletion of SAN-VGCCs disrupts LCRs in these clusters shifting the pacemaker leading site towards peripheral or extranodal regions that are less sensitive to $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ deletion and LCRs suppression. These secondary pacemaker regions, such as the peripheral SAN or the posterior nodal extension close to the inferior *vena cava*[31] express high levels of the f-channel protein HCN4, which would constitute an effective backup pacemaker mechanism. This hypothesis is consistent with our observation that, in comparison with $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN-atria preparations more frequently showed alternating impulse initiation in the SAN and in extranodal sites (Fig. 4), and with our previous observations that pacemaker cells of the mouse peripheral SAN show strong HCN4 positive immunostaining[34]. In addition, both cardiac $Na_v1.5$ and TTX-sensitive Na_v isoforms have been shown to participate to pacemaking in the peripheral SAN and to intranodal conduction in mice[8] and humans[10]. It is thus possible that peripheral leading sites express elevated densities of I_{Na} necessary for impulse conduction within the SAN or from the SAN to the atria[10]. Consistent with this hypothesis, ablation of SAN-VGCCs did not affect the SAN-to-atria conduction time (Supplementary Fig. 3). Shift of pacemaker site to peripheral SAN could explain why concomitant inhibition of I_f and TTX-sensitive I_{Na} arrests automaticity in the majority of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN-atria preparations (Fig. 6).

In conclusion, our data show for the first time that SAN-VGCCs are necessary to maintain atrial automaticity in the central SAN region. Concomitant ablation of SAN-VGCCs reduced the HR in vivo by ~ 200 bpm, which corresponds to ~ 30% of the HR measured in wild-type mice under control conditions (Fig. 2). This value is similar to that recorded in wild-type mice under I_f inhibition by ivabradine (~ 200 bpm). However, the HR in some $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under I_f inhibition was lower than 100 bpm, which corresponds to a reduction of more than 85%, in comparison to the initial HR measured in wild-type mice under control condition. Nevertheless, this residual pacemaking was sufficient to sustain heart function in mice. These data underscore the importance of SAN-VGCCs in the generation of SAN automaticity.

Role of SAN-VGCCs in impulse conduction and ventricular rhythmicity. We found a clearly additive impact on AV conduction between individual $Ca_v1.3$ and concomitant SAN-VGCCs ablation (Figs. 2, 3). More hyperpolarized diastolic voltages in some AVN cells and in myocytes of His'–Purkinje system than in the SAN could explain this additive effect. This would increase the steady-state availability of $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} in the conduction system. Consequently, dissociated rhythms observed in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice can be explained also by loss of depolarization reserve provided by I_{CaT} in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. The high incidence of complete heart block with dissociated atrial and ventricular rhythms in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts underscores the importance of $Ca_v3.1$ channels in atrioventricular conduction (Fig. 3). Shifting of leading pacemaker sites from primary sites to extranodal locations can explain atrial ectopic and atrial rhythmicity observed in Langendorff-perfused $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts (Supplementary Fig. 2). This impairment of primary SAN automaticity by ablation of SAN-VGCCs could promote ventricular arrhythmia by unmasking the activity of automatic junctional proarrhythmic sites. In particular, complete heart block in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts may favor ventricular arrhythmia by unmasking junctional or ventricular ectopic sites. Indeed, we showed previously that episodes of SAN pauses or AV block precede spontaneous initiation of ventricular tachycardia in mice carrying heart specific expression of non-conductive f-channels (HCN4-AYA mice)[34]. A compensatory effect by autonomic tone may explain the absence of ventricular arrhythmia in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo. In this respect, we showed that atropine suppressed ventricular tachycardia in HCN4-AYA mice[34]. Thus, blockade of I_{KACh} activation by atropine could be an additional factor suppressing ventricular arrhythmia in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo under inhibition of the autonomic nervous system (Fig. 1). In conclusion, our data show that expression of $Ca_v3.1$ channels is essential to maintain normal atrial and ventricular rhythmicity in hearts lacking $Ca_v1.3$.

Role of SAN-VGCCs in the pacemaker mechanism. Beside SAN-VGCCs and I_f, other plasmalemmal ion channels, as well as RyR-dependent Ca^{2+} release can contribute to the generation of diastolic depolarization and pacemaker activity. We thus hypothesized that the residual pacemaker activity observed in vivo in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice or in ex vivo mutant hearts and SAN/atrial preparations under ivabradine was sustained by TTX-sensitive Na_v1 channels and RyR-dependent Ca^{2+} release.

Previous work has showed that I_f inhibition by ivabradine reduces diastolic LCRs, by slowing the *coupled clock* in a rate-dependent way[46]. In particular, the *coupled clock* model of pacemaking predicts that I_f inhibition will slow pacemaker activity, which in turn, will reduce LCRs via the *coupled clock* mechanism[16,46]. In relation to the present study, it is possible that slowing of diastolic depolarization by I_f inhibition delays activation of SAN-VGCCs contributing to reduction in diastolic LCRs in wild-type SAN cells. However, our data show that deletion of SAN-VGCCs leads already to strong reduction in late diastolic LCRs with consequent disruption of the *coupled clock* mechanism (Fig. 9). The evidence that inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ does not reduce the total LCRs number in mutant cells despite further slowing of pacemaking is consistent with our hypothesis that ablation of SAN-VGCCs disrupts the normal functioning of the *coupled clock*. Consequently, it is possible that the role of I_f in residual pacemaker activity observed following concomitant ablation of SAN-VGCCs differs from that observed in wild-type cells, in which the *coupled clock* mechanism is intact before I_f blockade. This hypothesis is in line with our observation that the relative heart rate slowing induced by I_f inhibition is higher in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ than in wild-type mice (Fig. 5). This differential contribution of I_f to pacemaking in wild-type and mutant hearts underscores the importance of the depolarization reserve in the intact SAN, in which I_f, beside contributing to cellular automaticity, prevents tissue hyperpolarization imposed by atrial electrotonic load[6,47].

Our data show that inhibition of $I_{Na(TTX)}$ arrests automaticity in 50% of isolated SAN/atria preparations and in 40% individual $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. This observation indicates that TTX-sensitive Na_v1 channels are the predominant mechanisms sustaining pacemaker activity after ablation of SAN-VGCCs

and pharmacologic inhibition of I_f (Figs. 6, 7). We may expect that spontaneous RyR-dependent Ca^{2+} release could remain viable under these conditions, as predicted by the *coupled clock* model[3]. Indeed, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts express functional $Ca_v1.2$ channels and could ensure proper SR Ca^{2+} load to activate spontaneous Ca^{2+} *clock* mechanism[3]. This hypothesis would be in line with our observation that deletion of $Ca_v1.3$ channels does not reduce the SR Ca^{2+} load[27]. However, our data show that SAN-VGCCs are a key factor to generate and control diastolic LCRs underlying the *coupled clock* mechanism of pacemaking. Several combined factors may explain the poor efficiency of $Ca_v1.2$ channels in maintaining proper pacemaking, when functionally associated with I_f and spontaneous RyR-dependent Ca^{2+} release. Beside the more positive threshold for activation of $Ca_v1.2$ in comparison to $Ca_v1.3$ channels, $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} activation kinetics is faster and inactivation is lower than that of $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} in SAN cells[24]. Differences in channels' kinetics probably render $Ca_v1.3$ more adaptable to generation of rhythmic activity in SAN cells than $Ca_v1.2$ channels. Moreover, the membrane distribution of $Ca_v1.2$ channels differs from that of $Ca_v1.3$ in mouse SAN cells. Indeed, we showed previously that while $Ca_v1.2$ immunoreactivity is evenly distributed along the plasma membrane, $Ca_v1.3$ immunoreactivity shows well-defined co-staining with RyR2[48]. This differential subcellular distribution of $Ca_v1.3$ channels may facilitate control of LCRs in the diastolic phase in comparison to $Ca_v1.2$ channels that reside in a less-favorable spatial position to generate LCRs. In line with this hypothesis, we previously showed that ablation of $Ca_v1.3$ channels abolishes synchronous recruitment of diastolic RyR-dependent Ca^{2+} releasing sites under adrenergic activation of pacemaker activity[27]. Loss of synchronous recruitment intervenes despite the significant negative shift in the threshold for activation of $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} induced by adrenergic activation (~ 5 mV)[27].

It is possible that residual RyR-dependent Ca^{2+} release was effective in the fraction of SAN/atria preparations still generating automaticity at very low rates, probably in cooperation with TRPC[14] and TRPM4[12] channels. Nevertheless, our results show that expression of SAN-VGCCs is necessary to ensure pacemaking, via Ca^{2+} entry and efficient generation of diastolic LCRs in diastolic depolarization; two functions that sole expression of $Ca_v1.2$ channels could not facilitate.

Conclusions

Our study demonstrates that co-expression of functional $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ SAN-VGCCs is essential for generating normal heart automaticity and atrioventricular conduction, as well as to stabilize atrial and ventricular rhythmicity and generating SAN pacemaker activity. We show that normal heart automaticity is reliant on expression of SAN-VGCCs to generate diastolic inward current and Ca^{2+} entry to activate the Ca^{2+} *clock* pacemaker mechanism during normal pacemaking. As a corollary, our study indicates that functional association of L-type $Ca_v1.2$ channels and f-channels is not sufficient to maintain normal SAN pacemaking and heart automaticity. Finally, our study provides new mechanistic insight into congenital and autoimmune SAN dysfunction and atrioventricular block based on SAN-VGCC loss-of-function[29,30,49].

Methods

Mutant mice harboring genetic ablation of VGCCs ($Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) were generated in the IGF animal facility from C57B/6J genetic background. $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice were obtained by crossing C57B/6J $Ca_v1.3^{-/-}$ [27] with C57B/6J $Ca_v3.1^{-/-}$[25] mice. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US national Institute of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and European directives (2010/63/EU). The experimental procedure was approved by the Ethical committee of the University of Montpellier and the French Ministry of agriculture (protocol no: 2017010310594939). Animals were housed in individual cages with free access to food and water and were exposed to 12-h light/dark reverse cycles (light, 20:00 h to 8:00 h) in a thermostatically controlled room.

ECG recordings in mice. Telemetric ECG recordings in freely-moving mice were performed as previously described[23,34,35]. Briefly, mice were anesthetized using gas anesthesia with 2% isoflurane (Forene, Abbott, UK). An ETA-F10 telemetric transmitter (Data Sciences International) was placed subcutaneously along the animal's back. Transmitter's wire electrodes were placed in DII derivation against the heart axis. Advil (ibuprofen, 7 mL/L) was added to the drinking water for 4 days after implantation to prevent post-operative pain. Mice were left to recover for 10 days before experiments. ECG signals were recorded by employing a telemetric receiver connected to an analog-to-digital conversion acquisition system. Analysis was performed off-line using the Dataquest A.R.T. software (Data Sciences International). Heart rates (HR) were determined from RR intervals and atrial rates from PP intervals, under control conditions or following recording of 4-h baseline to evaluate drugs effects. All drugs were administered by intraperitoneal (IP) injection. Mean HR values were calculated by analyzing periods of 5 min at different time points corresponding to the peak effect of the drug. ECG parameters were measured by employing ECG Auto 1.5.7 software (EMKA Technologies).

Langendorff-perfused hearts. ECG recordings in Langendorff perfused mouse hearts were performed as previously described[35]. Mice were deeply anesthetized by IP injection of 0.3 mL of solution constituting Ketamine (0.1 mg/g, Imalgène) and Xylazine (0.01 mg/g, Rompun 2%, Bayer), followed by a second injection of Pentobarbital (150 µL Euthasol Vet in 10 mL NaCl physiological solution). To avoid blood clots in the heart, we injected 0.5 mL of NaCl solution containing Heparin (25,000 U.I). Hearts were removed via thoracotomy when the tail sensitivity test become negatives. Excised hearts with aortic cannula were quickly mounted on a Langendorff apparatus (Isolated heart system; EMKA Technologies) at a pressure of 70–80 mm Hg imposed by the working heart with normal Tyrode's solution containing (mM): NaCl, 140; KCl, 5.4; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 1.8; Hepes, 5 and glucose, 5.5 (pH adjusted to 7.4 with NaOH). Perfused hearts were immersed in the water-jacked bath and maintained at 36 °C. The ECG was continuously recorded by two Ag–AgCl electrodes; the first was placed on

the epicardial side of the right atrium close to the SAN area and the second near the ventricular apex. The heart rate was allowed to stabilize for at least 30 min before perfusion of drugs. ECG parameters were measured with ECG Auto 3.3.3.8 software (EMKA Technologies).

Intact SAN/atria preparations. We obtained SAN-atria preparations from excised hearts as previously described[50]. Briefly, we placed the entire SAN/atrial preparation in pre-warmed (36 °C) Tyrode's solution containing heparin (10 U/mL). We used a stereomicroscope (SZX16; Olympus) with low magnification (7×) to transilluminate and visualize directly the isolated SAN/atria preparation. We identified the SAN region using the superior and inferior vena cava, the *crista terminalis*, and the interatrial septum as landmarks. The SAN/atrial preparation including right and left atria (RA and LA) was pinned to the bottom of an optical chamber (Fluorodish, FD35PDL-100; WPI) coated with ~2 mm of clear Sylgard (Sylgard 184 Silicone elastomer kit; Dow Corning). To maintain the SAN in a flat plane, we pinned the right and left atrium using entomology needles.

Optical mapping of membrane voltage in SAN/atria preparations. Optical mapping of SAN impulse was performed as described previously[51]. SAN/atria preparation was loaded with the voltage-sensitive dye indicator Di-4-ANEPPS in Tyrode's solution with 10 μM Biotium for at least 30 min at room temperature (20–22 °C). The preparation was placed on an agitated plate to maintain proper oxygenation of the tissue and load it uniformly. The tissue was then washed 3 times in dye-free Tyrode's solution. The SAN/atria preparation was continously perfused at 34–36 °C. A MICAM Ultima-L complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera (100 × 100-pixel CMOS sensor, 10 × 10 mm, SciMedia) was used to achieve high speed optical mapping of membrane voltage (2 ms/frame). The camera was mounted on a THT microscope, with two objectives (2 × and 1.6 ×) to generate a field view of 12.5 × 12.5 mm. The excitation light source consisted in a 150-W halogen light system with built-in shutter (SciMedia). The filter set included a 531/50-nm excitation filter, 580-nm dichroic mirror, and 580 long-pass emission filter. Blebbistatin (1.5–5 μM; Tocris Bioscience) was used to prevent imaging artifacts due to tissue contraction. We usually limited our recording times to 32.768 s (16,384 frames at 2 ms per frame) to preserve the tissue from dye phototoxicity. Data were analyzed using the BrainVision Analyzer software (BrainVision).

Isolation of SAN cells. SAN pacemaker cells were isolated as previously described[52]. Briefly, SAN tissue was immersed into solution containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 50 mM taurine, 5.5 mM D-glucose, 1 mg/mL BSA, and 5 mM Hepes–NaOH (adjusted to pH 6.9 with NaOH) for 4 min. The tissue was then transferred into the low-Ca^{2+} solution containing purified collagenase and protease (Liberase medium Thermolysin concentration; 229 U/mL; Roche). 1.9 U/mL elastase (Boehringer Mannheim). Digestion was carried out for 15–20 min at 36 °C. To stop the digestion process, the SAN was washed in a medium containing 70 mM L-glutamic acid, 20 mM KCl, 80 mM KOH, 10 mM KH_2PO_4, 10 mM taurine, 1 mg/mL BSA, and 10 mM Hepes–KOH (adjusted to pH 7.4 with KOH). Single cells were isolated from the SAN tissue by manual agitation using a flame-forged Pasteur's pipette in KB solution at 36 °C. To recover the automaticity of the SAN cells, Ca^{2+} was gradually reintroduced in the cells' storage solution to a final concentration of 1.8 mM[52].

Patch-clamp recordings of SAN cells. Patch-clamp recordings of SAN cells was carried out as previously described[52]. Cells were harvested in custom-made chambers with glass bottoms for cell attachment. Cells were then superfused with Tyrode's solution warmed at 36 °C before recording. Voltage-gated Ca^{2+} currents (I_{Ca}) were recorded using standard whole cell patch-clamp configuration as previously described[23,24]. Extracellular recording solution contained (mM): 135 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 10 4-aminopyridine (4-AP), 1 $MgCl_2$, 0.03 tetrodotoxin (TTX), 1 g/L Glucose, 2 $CaCl_2$, 10 Hepes, (adjusted to pH = 7.2 with TEAOH). Electrodes had a resistance of 3 MΩ and were filled with a solution containing (in mM): 125 Cs^+-aspartate, 20 TEA-Cl, 1.2 $CaCl_2$, 5 Mg-ATP, 0.1 Li_2-GTP, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH)[23,24]. Seal resistances were in the range of 2–5 GΩ. Pacemaker activity of SAN cells was recorded under perforated patch conditions by adding 50 μM β-Escin to the pipette intracellular solution[23,35]. Patch-clamp electrodes had a resistance of 3–5 MΩ when filled with an intracellular solution containing (in mM): 130 K^+-aspartate, 10.0 NaCl; 2 ATP-Na^+ salt, 6.6 creatine phosphate, 0.1 GTP-Mg^{2+}, 0.04 $CaCl_2$ (pCa = 7.0), and 10.0 HEPES–KOH (adjusted to pH 7.2 with KOH). Perfusion of pre-warmed (36 °C) experimental solutions was performed by using a multi-MPRE8 heating pen (Cell Micro Controls,). Data acquisition was performed using a Multiclamp 700A patch-clamp amplifier connected to Digidata 1550B interface (Molecular Devices).

Ca^{2+} imaging in isolated SAN cells. Confocal Ca^{2+} imaging of SAN cells was performed as previously described[27]. SAN cells were harvested in a glass Fluorodish (FD3510-100, WPI), coated overnight with laminin (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) for 1 h before recordings. SAN cells loading was performed by removing the bath solution and replacing it by Tyrode's solution containing the Ca^{2+} indicator CAL-520 (1 μM, from a stock solution containing DMSO/Pluronic F-127 0.13%; Invitrogen) during 25 min at room temperature. Images were obtained with confocal microscopy (Zeiss LSM 780), by scanning SAN cells with an Argon laser in line-scan configuration. To avoid phototoxicity we generally recorded the SAN cells at a line rate of 1.53 or 3.78 ms to obtain 10,000 lines. Fluorescence was excited at 488 nm and emissions were collected at >505 nm. A 63 × oil immersion objective was used to record $[Ca^{2+}]_i$ in isolated SAN myocytes. We suppressed the background noise and analyzed the time-courses of Ca^{2+} fluorescence by pClamp software (ver.10.6.2.2, Molecular Devices). $[Ca^{2+}]_i$ transients and LCRs were analyzed using ImageJ software 8. To identify the ramp phase of the $[Ca^{2+}]_i$

transient, we integrated the F/F_0 signal 150 ms before the peak of the cell-wide transient and calculated the slope of this phase using Clampfit (ver. 10.7).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Prism 8.0 (GraphPad Software). Data are represented as mean ± the standard error of the mean (SEM) or the standard error (SD) as indicated. Statistical tests used in each experiment are specified throughout the figure legends. Statistical significance was defined as: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.05$, $p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ and $^{****}p < 0.0001$.

Received: 29 July 2020; Accepted: 15 October 2020
Published online: 03 November 2020

References

1. Mangoni, M. E. & Nargeot, J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol. Rev.* **88**, 919–982 (2008).
2. DiFrancesco, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455–472 (1993).
3. Lakatta, E. G., Maltsev, V. A. & Vinogradova, T. M. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ. Res.* **106**, 659–673. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206078 (2010).
4. Monfredi, O., Maltsev, V. A. & Lakatta, E. G. Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda)* **28**, 74–92. https://doi.org/10.1152/physiol.00054.2012 (2013).
5. Yaniv, Y., Lakatta, E. G. & Maltsev, V. A. From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. *Front. Physiol.* **6**, 28. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00028 (2015).
6. DiFrancesco, D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* **106**, 434–446. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.208041 (2010).
7. Mangoni, M. E. *et al.* Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **90**, 38–63 (2006).
8. Lei, M. *et al.* Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J. Physiol.* **559**, 835–848 (2004).
9. Maier, S. K. *et al.* An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3507–3512 (2003).
10. Li, N. *et al.* Impaired neuronal sodium channels cause intranodal conduction failure and reentrant arrhythmias in human sinoatrial node. *Nat. Commun.* **11**, 512. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14039-8 (2020).
11. Baruscotti, M., Westenbroek, R., Catterall, W. A., DiFrancesco, D. & Robinson, R. B. The newborn rabbit sino-atrial node expresses a neuronal type I-like Na^{+} channel. *J. Physiol.* **498**(Pt 3), 641–648 (1997).
12. Demion, M., Bois, P., Launay, P. & Guinamard, R. TRPM4, a Ca(2+)-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. *Cardiovasc. Res.* **73**, 531–538 (2007).
13. Sah, R. *et al.* Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3037–E3046. https://doi.org/10.1073/pnas.1311865110 (2013).
14. Ju, Y. K. *et al.* Store-operated Ca^{2+} influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. *Circ. Res.* **100**, 1605–1614 (2007).
15. Maltsev, V. A. & Lakatta, E. G. Synergism of coupled subsarcolemmal Ca^{2+} clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H594–H615. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01118.2008 (2009).
16. Lyashkov, A. E., Behar, J., Lakatta, E. G., Yaniv, Y. & Maltsev, V. A. Positive feedback mechanisms among local Ca releases, NCX, and ICaL ignite pacemaker action potentials. *Biophys. J.* **114**, 2024. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.024 (2018).
17. Vinogradova, T. M. *et al.* Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+} releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ. Res.* **94**, 802–809 (2004).
18. Maltsev, V. A. & Lakatta, E. G. Dynamic interactions of an intracellular Ca^{2+} clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* **77**, 274–284. https://doi.org/10.1093/cvr/cvm058 (2008).
19. Bogdanov, K. Y., Vinogradova, T. M. & Lakatta, E. G. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)–Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ. Res.* **88**, 1254–1258 (2001).
20. Marionneau, C. *et al.* Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.* **562**, 223–234 (2005).
21. Bers, D. M. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ. Res.* **90**, 14–17 (2002).
22. Zhang, Z. *et al.* Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation* **112**, 1936–1944 (2005).
23. Mangoni, M. E. *et al.* Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ. Res.* **98**, 1422–1430 (2006).
24. Mangoni, M. E. *et al.* Functional role of L-type Cav1.3 Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5543–5548 (2003).
25. Marger, L. *et al.* Functional roles of Ca(v)1.3, Ca(v)3.1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels (Austin)* **5**, 251–261 (2011).
26. Zhang, Q. *et al.* Expression and roles of Cav1.3 (alpha1D) L-type Ca(2)+ channel in atrioventricular node automaticity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 194–202. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.002 (2011).
27. Torrente, A. G. *et al.* L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca^{2+} release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovasc. Res.* **109**, 451–461. https://doi.org/10.1093/cvr/cvw006 (2016).
28. Li, Y. *et al.* Increasing T-type calcium channel activity by beta-adrenergic stimulation contributes to beta-adrenergic regulation of heart rates. *J. Physiol.* **596**, 1137–1151. https://doi.org/10.1113/JP274756 (2018).
29. Baig, S. M. *et al.* Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat. Neurosci.* **14**, 77–84. https://doi.org/10.1038/nn.2694 (2011).
30. Lazzerini, P. E., Capecchi, P. L., Laghi-Pasini, F. & Boutjdir, M. Autoimmune channelopathies as a novel mechanism in cardiac arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 521–535. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.61 (2017).
31. Dobrzynski, H. *et al.* Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ. Res.* **93**, 1102–1110 (2003).
32. DiFrancesco, D. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* **324**, 470–473 (1986).

33. DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M. & Tromba, C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* **377**, 61–88 (1986).
34. Mesirca, P. *et al.* Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of "funny" (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. *Nat. Commun.* **5**, 4664. https://doi.org/10.1038/ncomms5664 (2014).
35. Mesirca, P. *et al.* G protein-gated IKACh channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E932-941. https://doi.org/10.1073/pnas.1517181113 (2016).
36. Sinnegger-Brauns, M. J. *et al.* Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca^{2+} channels. *J. Clin. Investig.* **113**, 1430–1439 (2004).
37. Huser, J., Blatter, L. A. & Lipsius, S. L. Intracellular Ca^{2+} release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J. Physiol.* **524**(Pt 2), 415–422 (2000).
38. Bogdanov, K. Y. *et al.* Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca^{2+} releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state. *Circ. Res.* **99**, 979–987 (2006).
39. Vinogradova, T. M. *et al.* Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circ. Res.* **87**, 760–767 (2000).
40. Toyoda, F. *et al.* CaV1.3 L-type Ca^{2+} channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na^{+} current. *Sci. Rep.* **7**, 7869. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08191-8 (2017).
41. Mitsuiye, T., Shinagawa, Y. & Noma, A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ. Res.* **87**, 88–91 (2000).
42. Boyett, M. R., Honjo, H. & Kodama, I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* **47**, 658–687 (2000).
43. Musa, H. *et al.* Heterogeneous expression of Ca(2+) handling proteins in rabbit sinoatrial node. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 311–324 (2002).
44. Lyashkov, A. E. *et al.* Calcium cycling protein density and functional importance to automaticity of isolated sinoatrial nodal cells are independent of cell size. *Circ. Res.* **100**, 1723–1731 (2007).
45. Bychkov, R. *et al.* Synchronized cardiac impulses emerge from heterogeneous local calcium signals within and among cells of pacemaker tissue. *JACC Clin. Electrophysiol.* **6**, 907–931. https://doi.org/10.1016/j.jacep.2020.06.022 (2020).
46. Yaniv, Y. *et al.* New evidence for coupled clock regulation of the normal automaticity of sinoatrial nodal pacemaker cells: bradycardic effects of ivabradine are linked to suppression of intracellular Ca(2)(+) cycling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**, 80–89. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.04.026 (2013).
47. Yanagihara, K. & Irisawa, H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch.* **385**, 11–19. https://doi.org/10.1007/BF00583909 (1980).
48. Christel, C. J. *et al.* Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca^{2+} channels in mouse sinoatrial node. *J. Physiol.* **590**, 6327–6342. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.239954 (2012).
49. Liaqat, K. *et al.* Identification of CACNA1D variants associated with sinoatrial node dysfunction and deafness in additional Pakistani families reveals a clinical significance. *J. Hum. Genet.* **64**, 153–160. https://doi.org/10.1038/s10038-018-0542-8 (2019).
50. Neco, P. *et al.* Paradoxical effect of increased diastolic Ca^{2+} release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* **126**, 392–401. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075382 (2012).
51. Torrente, A. G. *et al.* Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 9769–9774. https://doi.org/10.1073/pnas.1505670112 (2015).
52. Mangoni, M. E. & Nargeot, J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I(f)) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.* **52**, 51–64 (2001).

Acknowledgements

We thank Ira Cohen (University of New York, Stony Brook NY), Alicia D'Souza (University of Manchester, UK) and Jean-Yves Le Guennec (University of Montpellier) for critical reading of the manuscript. We thank Jörg Striessnig (University of Innsbruck, Austria) for support and Hee-Sup Shin (Institute for Basic Science, South Korea), for sharing the original $Ca_v3.1^{-/-}$ genotype. We also thank the staff of the iExplore BioCampus Facility of Montpellier for breeding the mouse lines.

Author contributions

M.B., P.M., E.T., I.B., J.L., A.G.T., L. F., L.T., performed experiments. J.N. and S.B.L. provided intellectual contribution. P.M. and M.E.M. designed the study and wrote the manuscript. All the authors provided critical reading of the manuscript.

Funding

The IGF group is a member of the Laboratory of Excellence *Ion Channel Science and Therapeutics* supported by a grant from ANR (ANR-11-LABX-0015). Research supported by the *Fondation pour la Recherche Medicale* "Physiopathologie Cardiovasculaire" (DPC20171138970 to M.E.M.), by the *Agence Nationale de Recherche* (ANR-15-CE14-0004-01 to M.E.M.) and the *Fondation Leducq* (TNE FANTASY 19CVD03 to Matteo E. Mangoni and Peter J. Mohler).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-76049-7.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. or M.E.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020