THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Physiologie et Physiopathologie

Présentée par :

Guénaëlle LIZOT

****

Caractérisation moléculaire et électrophysiologique du système nerveux intracardiaque murin

****

Directeur de Thèse :

Dr. Aurélien CHATELIER

Soutenue le 14 décembre 2022

devant la Commission d'Examen

****

Membres du jury

Mohamed CHAHINE	Professeur, Université Laval, Québec (Canada)	Rapporteur
Lucile MIQUEROL	Directrice de recherche CNRS, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Patrick BOIS	Professeur, Université de Poitiers	Examinateur
Flavien CHARPENTIER	Directeur de recherche Inserm, Université de Nantes	Examinateur
Yves DE KONINCK	Professeur, Université Laval, Québec (Canada)	Examinateur
Aurélien CHATELIER	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examinateur

RESUME

Caractérisation moléculaire et électrophysiologique du système nerveux intracardiaque murin.

Le contrôle nerveux des fonctions cardiaques implique des structures nerveuses centrales et périphériques dont l'action coordonnée conduit à la modulation des paramètres cardiaques telles que la fréquence cardiaque, la force contractile ou encore la vitesse de conduction de l'influx électrique. Ces mécanismes de régulation font notamment intervenir un ensemble de neurones localisés au sein du tissu cardiaque et formant le système nerveux intracardiaque (SNIC). Initialement, ces neurones furent considérés comme de simples relais parasympathiques. Toutefois, les études menées depuis une trentaine d'années suggèrent une organisation plus complexe de ce système. Elles proposent notamment que le SNIC serait impliqué dans la mise en place de boucles de régulation locales et indépendantes grâce à la présence de neurones sensoriels, d'interneurones ainsi que de neurones moteurs. Cette organisation complexe a notamment conduit certains à proposer le concept de « petit cerveau cardiaque ». Malgré l'ensemble des études menées jusqu'ici, la nature exacte des différents neurones composant les ganglions cardiaques n'a toutefois pas encore été déterminée et cela apparait d'autant plus important au regard de l'éventuelle implication de ces neurones dans la survenue et l'entretien de certaines pathologies cardiaques telles que les arythmies. Les progrès réalisés en matière d'ingénierie génétique offrent désormais la possibilité de décrypter précisément le fonctionnement de ce réseau neuronal intracardiaque et d'étudier plus minutieusement son implication dans les mécanismes pathologiques.

Ainsi, l'objectif de cette thèse a donc été d'améliorer notre compréhension du SNIC en étudiant la complexité des cellules qui le composent.

Pour cela, nous nous sommes tout d'abord consacrés à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle globale du SNIC de la souris. En effet, bien que ce modèle offre de nombreuses possibilités techniques pour investiguer le rôle et les propriétés des différents types de neurones cardiaques, très peu d'études avaient été conduites sur ce modèle jusqu'à présent. Nos résultats ont permis de déterminer que les ganglions cardiaques de cette espèce regroupent différents profils neurochimiques. De plus, l'étude de leurs propriétés électrophysiologiques nous a également conduit à identifier différents types de neurone caractérisés par des capacités de décharge ainsi que des potentiels d'action distincts.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes appuyés sur la technologie Cre-Lox pour nous focaliser sur l'étude d'une sous-catégorie précise de neurones cardiaques, identifiée par l'expression de la calbindine. Nous avons notamment montré que cette population présentait des propriétés morphologiques et électrophysiologiques distinctes des autres neurones cardiaques.

Enfin, nous nous sommes également intéressés, au sein des ganglions cardiaques, aux cellules non neuronales exprimant le marqueur de pluripotence Sox2 et à leur capacité à initier des mécanismes de neurogenèse *in vitro*. Nos résultats suggèrent que ces cellules seraient capables de s'engager vers un phénotype neuronal en culture.

Le SNIC murin semble donc présenter une complexité moléculaire et fonctionnelle similaire à celle retrouvée dans les autres espèces. L'identification de différentes classes de neurones et l'émergence de cellules potentiellement impliquées dans une neurogenèse au sein de ce système ouvre la voie à de futures études du rôle des différentes populations de neurones cardiaques dans la physiologie et de leur remodelage dans la physiopathologie cardiaque.

Mots-clés : Système nerveux intracardiaque ; Ganglions cardiaques ; Neurones périphériques ; Phénotypes neurochimiques ; Electrophysiologie.

ABSTRACT

Molecular and electrophysiological characterization of the mouse intracardiac nervous system.

The neural control of the heart involves central and peripheral neurons that act interdependently to modulate cardiac parameters such as heart rate, contractility or conduction velocity. As part of this cardiac neuronal regulation, the intrinsic cardiac nervous system (ICNS), which refers to clusters of neurons located within the cardiac tissue, is receiving increasing attention. Indeed, whereas intracardiac neurons were initially considered as simple parasympathetic postganglionic neurons, studies conducted over the past thirty years have suggested a more complex organization, including sensory, local regulatory, and motor neurons within intracardiac ganglia, allowing the initiation of local and independent regulatory pathways. This putative complex organization has led to the concept of “little brain on the heart”. Despite the numerous studies that have been conducted, the exact role played by the different cardiac neurons is not understood yet and this is of particular importance since they have been implicated in the initiation and maintenance of cardiac diseases such as arrhythmias. Recent advances in genetic engineering have opened new opportunities to improve our understanding of this intracardiac neural network and to better apprehend its involvement in cardiac diseases.

Therefore, the objective of this thesis was to improve our knowledge about the ICNS by studying the complexity of its organization.

To this aim, we first characterized the molecular and functional properties of the mouse ICNS. In fact, despite that this model represent a powerful tool to investigate the role and the properties of the different type of cardiac neurons, very little information was known about the ICNS of this species. Our results indicate that, within this species, cardiac ganglia are composed of different neurochemical profiles. Moreover, the examination of their eletrophysiological properties have also conducted to the identification of different types of neurons displaying different firing capacities and different action potentials characteristics.

Secondly, we took advantage of the Cre-Lox system to specifically study a subtype of cardiac neuron, characterized by the expression of calbindin. Especially, we showed that this population display distinct morphological and electrophysiological properties compared to other cardiac neurons.

Finally, within these cardiac ganglia, we also identifed a population of non-neural cells that express the pluripotency marker Sox2 and we investigated their ability to initiate neurogenesis *in vitro*. Our results suggest that these cells would be able to produce new neurons in culture.

In conclusion, the mouse ICNS seem to have a molecular and functional complexity similar to other species. The identification of different groups of neurons and the presence of putative mechanism of peripheral neurogenesis within cardiac ganglia open new avenues of investigation regarding the role played by this different type of neurons and their remodeling in pathological states.

Keywords: Intracardiac nervous system ; Cardiac ganglia ; Peripheral neurons ; Neurochemical phenotypes ; Electrophysiology.

Remerciements

Ces travaux de thèse ont débuté en octobre 2018 au sein du laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM) sous la direction du DR Bruno Constantin. Je tiens donc à remercier le DR Bruno Constantin ainsi que l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil. Suite à la réorganisation du laboratoire STIM, c'est finalement au sein du laboratoire Physiopathologie et Régulation des Transports Ioniques (PRéTI UR 24184), actuellement dirigé par le Pr. Jean-François Faivre, que s'achève cette thèse.

Je remercie grandement la fondation pour la recherche médicale (FRM) pour leur soutien financier.

Je souhaite également vivement remercier le Pr. Mohamed Chahine et la DR Lucile Miquerol pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs ainsi que le DR Flavien Charpentier et le Pr. Yves de Koninck pour leur participation à mon jury en qualité d'examinateurs.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Dr. Aurélien Chatelier, sans qui rien de tout ça n'aurait été possible ! Merci pour ton encadrement, ta disponibilité permanente, la confiance que tu m'as accordée, ton écoute, tes conseils et tes encouragements. Mais aussi pour avoir supporté mes baisses de moral et mon pessimisme légendaire. Même si je ne te l'ai pas forcément montré tous les jours, sache que ça a été un réel plaisir de travailler avec toi pendant ces 4 dernières années et que je suis consciente de la chance que j'ai eu de t'avoir en tant que directeur de thèse. Ah oui, et je tiens aussi à m'excuser pour cet incroyable moment de solitude dans le taxi nous conduisant vers San Francisco « et la main, vous pensez que c'est inné ? ».

Je remercie également le Pr. Patrick Bois pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe TIRC en 2018 mais aussi pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour ses nombreux conseils quotidiens.

Je tiens sincèrement à remercier le Pr. Jean-François Faivre. Tout d'abord pour la qualité de ses enseignements qui m'ont fait me passionner pour la physiologie cardiaque et l'électrophysiologie ! Mais surtout pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son soutien. Merci pour toutes ces discussions de fin de journée à parler de tout sauf de sciences et pour avoir essayé d'améliorer ma culture cinématographique et littéraire ! Je promets de regarder le prochain film que tu me recommandes. J'espère que tu auras une pensée pour moi le soir quand viendra l'heure d'enfiler tes chaussures de moto !

Je remercie aussi le Dr. Jocelyn Bescond pour tout le temps qu'il a consacré à m'aider à mettre en place la technique de Langendorff, pour avoir supporté mon caractère, pour ses nombreux encouragements et toutes nos petites discussions du soir.

Je remercie le Pr. Valérie Coronas ainsi que le Dr. Patricia Arnault pour leur aide précieuse et leurs nombreux conseils. Ça a été un vrai plaisir de travailler avec vous.

Un énorme merci à Manue pour m'avoir écouté me plaindre pendant des heures, pour m'avoir soutenu, pour ton éternelle bonne humeur, pour les sorties vélo (enfin sauf quand tu m'amènes

dans la vallée du Miosson…) et pour tes blagues pas drôles (en fait non pour ça je ne te remercie pas non plus). Le labo est quand même beaucoup plus triste maintenant que tu n'es plus là ! Dans tous les cas, je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle et personnelle et je sais que l'on restera en contact.

Merci à Audrey également pour son soutien, ses conseils et nos interminables discussions ! Je te souhaite également ce qu'il y a de mieux pour l'après thèse et j'espère que tu trouveras un poste dans lequel tu t'épanouiras pleinement.

Une grosse pensée pour Charles, mon compagnon de bureau et de thèse pendant les 3 premières années ! Merci pour tous ces fous rires, pour les « tu préfères… » mais aussi pour nos moments d'entraides et nos discussions scientifiques ! Le bureau était bien vide après ton départ mais sache que j'ai su envahir l'espace comme il se doit…

Je tiens aussi à remercier Sandra pour sa bonne humeur, pour s'être toujours pliée en quatre pour essayer de m'aider et pour m'avoir changé les idées le midi avec ses potins et ses histoires complétement folles! Je n'ai qu'une chose à dire : vive le stade toulousain et faites entrer l'accusé !

Je remercie les autres membres du labo avec qui j'ai partagé des moments scientifiques ou non : Christophe, Cédric, Clarisse, Stéphane, Laëtitia, petit toto et grand toto, Christine, Jenny, Amandine, Linette, Jodie, Chloé, Elodie, Khilian et Arnaud.

Je remercie le Dr. Anne Cantereau pour m'avoir formé à la microscopie confocale et pour sa disponibilité. Je souhaite adresser mes remerciements au Dr. Stéphane Pagès pour m'avoir accueilli au Wyss Center à Genève et m'avoir initié au lightsheet. Je remercie également le Dr. Sébastien Brot pour sa précieuse aide lors de l'utilisation du lightsheet pour l'imagerie des cœurs transparisés à Poitiers !

Je remercie également le personnel administratif et technique, Christelle, Carole, Julie et James, pour le temps qu'ils m'ont consacré et leur réactivité.

D'un point de vue plus personnel, je souhaite remercier les membres de ma famille qui, même s'ils n'ont jamais vraiment compris ce que je faisais, m'ont tout de même soutenu pendant cette période. Alors merci papa, maman, Florian et Candice ! Merci à toi aussi Elise, tu es bien la seule de la famille à pouvoir me comprendre. Merci pour toutes nos discussions, pour tes conseils et pour avoir été là tout simplement. Merci à Jérémy aussi qui a toujours été là quand je n'avais pas le moral (fallait pas habiter juste à côté du labo aussi !).

Un merci à tous mes amis proches et notamment à Hélo, ma plus vieille copine pour sûr ! A nos vacances, nos fils du son, nos fous rires ! Je suis tellement fière de ton parcours et de la formidable médecin que tu t'apprête à devenir ! Je remercie aussi Mathieu et Marion (quand est-ce qu'on arrive à se voir d'ailleurs ??) et Félix pour nos discussions de dépressifs et son soutien en cette période compliquée.

Et pour finir une petite pensée pour toi Sam. Quelle drôle de période que la fin de thèse pour se rencontrer, mais si c'était à refaire sache que je n'hésiterais pas une seule seconde ! Merci pour tous ces moments loin du labo et de la thèse…

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations **1**

Table des illustrations **5**

Liste des figures **5**
Liste des tableaux **7**

Introduction **8**

Chapitre 1. Régulation nerveuse des fonctions cardiaques : le système nerveux cardiaque extrinsèque **8**

[1]. Description anatomique 8
(i) Les afférences cardiaques sensorielles 9
a) Les neurones sensoriels des ganglions rachidiens (DRG) 9
b) Les neurones sensoriels des ganglions inférieurs du nerf vague 10
c) Autres afférences sensorielles intra-thoraciques extra-cardiaques 10
(ii) Les efférences cardiaques 11
a) Les efférences cardiaques sympathiques 12
b) Les efférences cardiaques parasympathiques 13
(iii) Origine embryonnaire de l'innervation cardiaque 14
[2]. Régulations physiologiques des fonctions cardiaques 16
(i) La fonction cardiaque et sa régulation par les RCPG 16
(ii) Voies de signalisation associées à l'innervation sympathique 18
(iii) Voies de signalisation associées à l'innervation parasympathique 20

Chapitre 2 : Régulation nerveuse intrinsèque des fonctions cardiaques : le système nerveux intracardiaque **22**

[1]. Description anatomique 22
[2]. Les différents types cellulaires intra-ganglionnaires 26
(i) Les différents types de neurones 26
a) Nature neurochimique des neurones intracardiaques 26
Phénotype cholinergique 26
Phénotype catécholaminergique 27
Phénotype nitrergique 29
Phénotype glutamatergique 30
Neuropeptides 30
Nature neurochimique des inputs synaptiques reçus par les neurones intracardiaques 32
b) Diversité fonctionnelle 36
(ii) Les cellules non neuronales 39

a) Les cellules gliales 39
b) Les cellules SIF 41
[3]. Electrophysiologie des neurones cardiaques 41
(i) Profils électrophysiologiques 42
(ii) Canaux ioniques 44
a) Les canaux sodiques voltage-dépendants 44
b) Les canaux calciques voltage-dépendants 47
c) Les canaux HCN 50
d) Les canaux potassiques 51
(iii) Modulation des propriétés électrophysiologiques 52
a) Les récepteurs cholinergiques 53
b) Les récepteurs adrénergiques 54
c) Les récepteurs purinergiques 55
d) Modulation par la bradykinine 57
e) Modulation par les neuropeptides : PACAP, VIP, substance P 59

Chapitre 3 : Pathologies cardiaques et système nerveux intracardiaque 62

[1]. Arythmies cardiaques 62
(i) Fibrillation auriculaire 62
(ii) Arythmies ventriculaires 65
[2]. Insuffisance cardiaque 66
[3]. Ischémie myocardique 66
[4]. Canalopathies cardiaques 67

Contexte scientifique et objectifs de thèse 69

Matériels et méthodes 71

[1]. Modèles animaux 71
(i) La lignée calb-cre 71
a) Génotypage par PCR 71
Extraction et dosage de l'ADN 71
Amplification par PCR 72
Migration sur gel d'agarose et révélation 73
Résultats obtenus 73
[2]. Transduction virale *in vivo* 73
(i) La technologie Cre-Lox 74
(ii) Principe 75
(iii) Procédure expérimentale 75
[3]. Immunofluorescence indirecte 76
(i) Transparisation cardiaque par la technique iDISCO 77
a) Généralités et principe 77
b) Procédure expérimentale 80
Prélèvement cardiaque 80
Prétraitement de l'échantillon 81
Immunomarquage 81
Clarification 82

Imagerie : la microscopie de fluorescence à feuillet de lumière 82
c) Analyse de l'innervation ventriculaire catécholaminergique cardiaque 83
(ii) Immunohistochimie sur coupes de tissu cardiaque.....84
(iii) Immunocytochimie.....87
[4]. Isolement des neurones cardiaques 89
(i) Dissection 89
(ii) Digestion enzymatique et dissociation mécanique des cellules 89
(iii) Ensemencement cellulaire.....90
[5]. Étude électrophysiologique par la technique de patch-clamp.....90
(i) Généralités.....90
(ii) La technique de patch-clamp : principe 91
(iii) Matériel et dispositif expérimental.....92
(iv) Etude des propriétés membranaires passives et actives en current-clamp.....93
a) Propriétés membranaires passives.....93
b) Propriétés membranaires actives.....94
Protocole 1 : étude de l'excitabilité neuronale (rhéobase et capacités de décharge) 94
Protocole 2 : étude des caractéristiques du potentiel d'action 94
(v) Réponses pharmacologiques.....95
(vi) Etude des courants ioniques en voltage-clamp.....96
a) Courants sodiques voltage-dépendants.....96
b) Courants calciques voltage-dépendants 96
[6]. Culture des cellules intraganglionnaires non neuronales 97
(i) Conditions de culture et repiquage des sphères.....97
(ii) Etude des sphères : composition cellulaire, capacité d'auto-renouvellement et de différenciation.....98
a) Capacités d'auto-renouvellement.....99
b) Caractérisation des cellules des sphères.....100
c) Etude des capacités de différenciation.....100
[7]. Analyse des données et traitement statistique.....100

Résultats..... 101

Chapitre 1 : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système nerveux intracardiaque murin..... 102

[1]. Contexte de l'étude.....102
[2]. Résumé des travaux.....103
[3]. Article 104
[4]. Résultats complémentaires : étude des courants sodiques voltage-dépendants.....120

Chapitre 2 : Etude d'une population spécifique de neurones intracardiaques : les neurones calbindine..... 122

[1]. Validation du modèle d'étude.....124
[2]. Etude anatomique à l'échelle du cœur entier.....126
[3]. Phénotype neurochimique des neurones calbindine.....128
[4]. Caractéristiques morphologiques.....129

[5]. Propriétés électrophysiologiques 131
(i) Propriétés passives 131
(ii) Propriétés actives 131
a) Excitabilité 131
b) Propriétés du potentiel d'action 132
(iii) Etude des courants calciques en voltage-clamp 134

Chapitre 3 : Potentiel souche des acteurs ganglionnaires non neuronaux 138

[1]. Etude des acteurs ganglionnaires intracardiaques non neuronaux sur coupes de tissu cardiaque 138
[2]. Etude des cellules isolées à partir des ganglions intracardiaques : formation de sphères *in vitro* 141
[3]. Capacités de différenciation des sphères obtenues *in vitro* 146
[4]. Caractéristiques électrophysiologiques des cellules obtenues après différenciation des sphères 150

Discussion et perspectives 154

[1]. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système nerveux intracardiaque murin 154
[2]. Etude d'une population spécifique de neurones intracardiaques : les neurones calbindine 160
[3]. Potentiel souche des acteurs ganglionnaires non neuronaux 165

Conclusion générale 168

Bibliographie 170

Annexes 189

[1]. Liste des communications scientifiques 189
[2]. Article scientifique annexe 190

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAV	Adénovirus associé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHP	Phase d'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate

B

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BK	Bradykinine
BKCa	Canal potassique dépendant du calcium de grande conductance
BrdU	5-bromo-2´-désoxyuridine
BSA	Albumine bovine sérique

C

CART	Cocaine and amphetamine-regulated transcript
CCN	Cellules de la crête neurale
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
ChAT	Choline acétyltransférase
CHF	Chronic Heart Failure

D

DAPI	Diamidino-2-phénylindole
DBE	Dibenzyl ether
DBH	Dopamine beta-hydroxylase
DCM	Dichlorométhane
DCX	Doublecortine
DD	Dépolarisation diastolique
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPBS	Solution de tampon phosphate salin
DRG	Ganglion rachidien

E

EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique

F

FA	Fibrillation auriculaire
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes

G

GFAP	Glial fibrillary acidic protein

H

HBSS	Solution saline équilibrée de Hank
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated channel

I

iDISCO	Immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of Solvent-Cleared Organs
IKCa	Canal potassique dépendant du calcium de conductance intermédiaire
IP3	Inositol trisphosphate

K

K_{ATP}	Canal potassique sensible à l'ATP
KCa	Canal potassique dépendant du calcium
Kir	Canal potassique rectifiant entrant

M

MAP2	Microtubule-associated protein 2

N

nAChR	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NBA	Milieu Neurobasal
NET	Norepinephrine transporter
NGF	Nerve growth factor
NK	Récepteur des neurokinines
nNOS	Nitric oxide synthase neuronale

NO	Oxyde nitrique
NPY	Neuropeptide Y

P

P/S	Pénicilline / Streptomycine
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
PGP9.5	Protein gene product 9.5
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PKA	Protéine kinase AMPc dépendante
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PNMT	Phényléthanolamine N-méthyltransférase
Poly-HEMA	Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)

R

RCPG	Récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RyR	Récepteurs à la ryanodine

S

SEM	Erreur standard de la moyenne
SIF	Small intensely fluorescent cell
SKCa	Canal potassique dépendant du calcium de petite conductance
SNIC	Système nerveux intracardiaque
Sox2	Sex determining region Y-box 2
SVZ	Zone sous-ventriculaire

T

TH	Tyrosine hydroxylase
TRP	Transient receptor potential
TRPC	Canonical transient receptor potential
TTX	Tétrodotoxine

V

VAChT	Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
VGCC	Voltage-gated calcium channel
VGLUT	Transporteur vésiculaire du glutamate
VIP	Peptide vasoactif intestinal
VMAT2	Transporteur vésiculaire des monoamines 2
VP	Veine pulmonaire

AUTRES

4-AP	4-aminopyridine
α-SMA	α-smooth muscle actin
β-tub III	β-tubuline III

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Les afférences cardiaques sensorielles 11
Figure 2 : Efférences sympathiques et parasympathiques cardiaques. 14
Figure 3 : L'innervation cardiaque se met en place à partir des cellules de la crête neurale.. ... 15
Figure 4 : Initiation et propagation de l'influx électrique cardiaque 17
Figure 5 : Voies de transduction associées à la neuro-modulation des fonctions cardiaques.. 21
Figure 6 : Schéma représentant la localisation des ganglions cardiaques chez l'homme 23
Figure 7 : Images représentant la morphologie typique des ganglions intracardiaques et de leurs interconnexions 24
Figure 8 : Schéma représentant la localisation des principales zones ganglionnaires intracardiaques chez la souris 25
Figure 9 : Les neurones cardiaques présentent majoritairement un phénotype cholinergique. 27
Figure 10 : Les neurones cardiaques humains expriment des marqueurs catécholaminergiques 28
Figure 11 : Les neurones intracardiaques reçoivent de nombreux inputs synaptiques. 33
Figure 12 : Inputs synaptiques exprimant les neuropeptides substance P et CGRP 34
Figure 13 : Nature neurochimique des inputs synaptiques chez le cobaye 35
Figure 14 : Résultats expérimentaux suggérant l'existence de neurones sensoriels au sein des ganglions cardiaques 37
Figure 15 : Classification fonctionnelle des neurones cardiaques 38
Figure 16 : Représentation schématique des interactions entre les neurones et les cellules satellites gliales 39
Figure 17 : Immunodétection des cellules SIF dans les ganglions cardiaques 41
Figure 18 : Diversité des profils électrophysiologiques rencontrés chez les neurones intracardiaques 43
Figure 19 : Canaux sodiques neuronaux 46
Figure 20 : Le canal calcique de type N joue un rôle crucial dans l'excitabilité des neurones intracardiaques 49
Figure 21 : Contribution du courant I_h à la phase d'AHP et à la fréquence de décharge en potentiel d'action. 51
Figure 22 : Neuro-modulation cholinergique des neurones intracardiaques 54
Figure 23 : Schéma représentant les voies de signalisation médiées par l'ATP au sein des neurones cardiaques. 57
Figure 24 : Actions de la bradykinine sur les neurones cardiaques 58
Figure 25 : Voies de transductions associées aux récepteurs du VIP et du PACAP. 61
Figure 26 : Activité neuronale et fibrillation auriculaire. 64

Figure 27 : Suivi post-opératoire des patients atteints de fibrillation auriculaire 65
Figure 28 : Résultats théoriques (gauche) et obtenus (droite) pour le génotypage des souris calb-cre. 73
Figure 29 : Evénements de recombinaisons génétiques induit par l'activité de la Cre-recombinase..... 74
Figure 30 : Principe des AAVs Cre-dépendants. 75
Figure 31 : Principe de l'immunofluorescence indirecte. 77
Figure 32 : Phénomènes physiques responsables de l'opacité des échantillons. 78
Figure 33 : Représentation schématique des différentes approches de transparisation 79
Figure 34 : Etapes du protocole de transparisation cardiaque. 80
Figure 35 : Le microscope à feuillet de lumière 83
Figure 36 : Analyse de l'innervation ventriculaire cardiaque sous imageJ. 84
Figure 37 : Passage de la configuration cellule attachée à la configuration cellule entière en patch-clamp..... 91
Figure 38 : Dispositif expérimental de patch-clamp 92
Figure 39 : Détermination de la résistance membranaire au repos. 94
Figure 40 : Détermination des propriétés du potentiel d'action neuronal. 95
Figure 41 : Protocole de culture et de repiquage des sphères issus des ganglions intracardiaques 98
Figure 42 : Protocole d'étude des sphères obtenues après isolement des cellules intra-ganglionnaires cardiaques. 99
Figure 43 : Etude des courants sodiques voltage-dépendants 121
Figure 44 : Observation des varicosités périsomatiques immunoréactives pour la calbindine123
Figure 45 : Validation du modèle de transduction virale : expression de la tdTomato dans les neurones calbindine..... 125
Figure 46 : Localisation des neurones calbindine 126
Figure 47 : Innervation du tissu auriculaire par les neurones calbindine 127
Figure 48 : Phénotypes neurochimiques des neurones calbindine..... 128
Figure 49 : Analyse de la taille des corps cellulaire 129
Figure 50 : Etude de la croissance des neurites in vitro 130
Figure 51 : Mesure de l'excitabilité neuronale. 132
Figure 52 : Propriétés du potentiel d'action. 133
Figure 53 : Analyse de la phase d'hyperpolarisation. 134
Figure 54 : Relation courant-potentiel du courant calcique global. 135
Figure 55 : Etude du courant calcique de type N 136
Figure 56 : Identification de phénotypes non neuronaux dans les ganglions intracardiaques murins. 140
Figure 57 : Phénotype des cellules isolées et mises en culture 142
Figure 58 : Caractérisation des sphères obtenues en culture par immunofluorescence..... 144

Figure 59 : Caractérisation des sphères secondaires et tertiaires obtenues sur support poly-HEMA par immunofluorescence 145
Figure 60 : Caractérisation des cellules obtenues après repiquage sur support standard. 146
Figure 61 : Perte d'expression du facteur de transcription Sox2 après différenciation. 147
Figure 62 : Expression de marqueurs neuronaux après différenciation des sphères 148
Figure 63 : Autres phénotypes cellulaires observés après différenciation des sphères 149
Figure 64 : Propriétés électrophysiologiques des cellules différenciées 151
Figure 65 : Expression d'un courant sortant voltage-dépendant 153
Figure 66 : Les neurones murins sont répartis en 4 classes distinctes selon leurs propriétés électrophysiologiques. 159
Figure 67 : Réponse calcique des neurones cardiaques à la dépolarisation membranaire 164
Figure 68 : Schéma bilan concernant la diversité neurochimique et électrophysiologique des neurones cardiaques murins 168
Figure 69 : Approche expérimentale pour l'étude de la fonction des différentes classes de neurones intracardiaques 169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre moyen de neurones et de ganglions cardiaques dans différentes espèces de mammifères 24
Tableau 2 : Liste des marqueurs neuronaux exprimés par les neurones cardiaques 32
Tableau 3 : Identification de différents types neuronaux en fonction des propriétés électrophysiologiques 44
Tableau 4 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris calb-cre. 72
Tableau 5 : Etapes du protocole de PCR 72
Tableau 6 : Liste des AAVs utilisés. 76
Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le protocole iDISCO 81
Tableau 8 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour le protocole iDISCO 82
Tableau 9 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunohistochimie 86
Tableau 10 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour l'immunohistochimie 87
Tableau 11 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunocytochimie 88
Tableau 12 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour l'immunocytochimie 89
Tableau 13 : Liste des substances pharmacologiques utilisées. 95
Tableau 14 : Composition des différents milieux de différenciation utilisés 100
Tableau 15 : Propriétés membranaires passives 131
Tableau 16 : Capacité à former des sphères 145

Introduction

Chapitre 1. Régulation nerveuse des fonctions cardiaques : le système nerveux cardiaque extrinsèque

Le système nerveux constitue un centre de régulation et de communication entre les différents organes de l'organisme. Il assure la perception de l'environnement extérieur ainsi que du milieu interne, le traitement et l'intégration des informations sensorielles ainsi que la mise en place de réponses adaptées aux signaux perçus. On distingue un système nerveux central, composé de l'encéphale et de la moelle épinière, et un système nerveux périphérique. Les signaux transitant de la périphérie vers le système nerveux central constituent la voie sensitive (afférente) tandis que les signaux transitant de la région centrale vers la périphérie forment la composante motrice (efférente) du système nerveux. Enfin, le système nerveux périphérique est lui-même composé du système nerveux somatique, impliqué dans la commande volontaire des muscles squelettiques, et du système nerveux autonome, impliqué dans la régulation des processus physiologiques involontaires. La régulation des fonctions cardiaques échappant à tout contrôle volontaire, seule la composante autonome du système nerveux périphérique sera abordée dans ce chapitre.

[1]. Description anatomique

Malgré le caractère autonome des battements du cœur, les fonctions cardiaques sont en permanence régulées par le système nerveux, notamment au travers des branches sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome, permettant ainsi de répondre subtilement aux besoins de l'organisme.

Le contrôle nerveux des fonctions cardiaques s'organise sur trois niveaux :

(1) Un niveau central : ce niveau regroupe notamment les corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires localisés dans la moelle épinière et le tronc cérébral, les centres cardiovasculaires du bulbe rachidien, les noyaux hypothalamiques ainsi que d'autres centres supérieurs qui participent à la modulation du système nerveux autonome.

(2) Un niveau périphérique extracardiaque : il correspond à l'ensemble des ganglions autonomes et sensitifs.

(3) Un niveau périphérique intracardiaque correspondant à l'ensemble des neurones présents au sein du tissu cardiaque et formant le système nerveux intracardiaque (SNIC).

Ce contrôle est assuré par la mise en place de boucles de régulation au sein desquelles interviennent des neurones sensoriels (afférences sensorielles), des interneurones, ainsi que des neurones moteurs (efférents).

(i) Les afférences cardiaques sensorielles

La perception de l'environnement cardiaque est assurée par les terminaisons nerveuses sensorielles innervant le cœur. Ces afférences permettent principalement de renseigner des modifications chimiques et mécaniques de l'environnement cardiaque et de conduire à la mise en place de boucles réflexes de régulation au sein du système nerveux central mais également en périphérie (Armour and Ardell, 2004). Les corps cellulaires associés à ces terminaisons sensorielles sont retrouvés dans les ganglions rachidiens (DRG), les ganglions inférieurs du nerf vague, certains ganglions extracardiaques de la chaine sympathique ainsi que dans le SNIC (Armour and Ardell, 2004).

a) Les neurones sensoriels des ganglions rachidiens (DRG)

La grande majorité des corps cellulaires des neurones sensoriels sont retrouvés dans des structures spécialisées localisées à proximité de la moelle épinière et appelées ganglions rachidiens ou DRG. Les neurones des DRG sont des cellules pseudo-unipolaires, comportant un prolongement périphérique innervant les tissus cibles et un prolongement central rejoignant, par l'intermédiaire de la racine dorsale, la corne dorsale de la moelle épinière.

Les DRG impliqués dans l'innervation cardiaque sont localisés dans les segments supérieurs de la moelle épinière, notamment entre les segments C6 et T6, et ce de manière bilatérale (Vance and Bowker, 1983; Hopkins and Armour, 1989) (**figure 1**). Ces neurones sont capables de percevoir des stimuli mécaniques et chimiques et la plupart d'entre eux sont capables de percevoir les deux types de stimuli (nature polymodale) (Armour and Ardell, 2004). Les informations sensorielles véhiculées par les neurones des DRG sont ensuite transmises à des neurones afférents de second ordre qui véhiculent l'information vers des centres intégrateurs localisés dans le tronc cérébral, notamment au niveau du noyau du tractus solitaire, premier relai central des afférences cardiovasculaires. Ce noyau est notamment connecté au noyau ambigu, où sont présents les neurones parasympathiques pré-

ganglionnaires, et à la région rostroventrolatérale du bulbe, connectée aux neurones pré-ganglionnaires sympathiques (Bestel et al., 2000).

Parmi les stimuli chimiques capables d'activer les neurites cardiaques sensoriels associés aux neurones des DRG, on retrouve l'adénosine, l'adénosine triphosphate (ATP), la substance P, la bradykinine (BK) ou encore l'acidité (Baker et al., 1980; Huang et al., 1995, 1996; Benson et al., 1999). C'est ainsi que ces neurones détectent l'ischémie myocardique et participent à la genèse des signaux douloureux associés à l'infarctus du myocarde.

b) Les neurones sensoriels des ganglions inférieurs du nerf vague

Les ganglions inférieurs du nerf vague regroupent les corps cellulaires associés aux afférences cardiaques transitant par le nerf vague (**figure 1**). On y retrouve également les corps cellulaires associés aux barorécepteurs présents dans les sinus carotidiens et la crosse aortique et impliqués dans la mise en place du baroréflexe (Hopkins and Armour, 1989). L'ensemble de ces neurones sensoriels projettent au niveau central sur différents noyaux parmi lesquels, le noyau du tractus solitaire, centre intégrateur des fonctions cardiovasculaires, qui influera en retour sur les efférences autonomes (Mifflin et al., 1988). De manière générale, il est souvent admis qu'une augmentation de l'activité des afférences cardiaques vagales est associée à une stimulation des efférences parasympathiques cardiaques (Fallen, 2005). Tout comme les neurones des DRG, ces neurites sensoriels sont capables de percevoir les manifestations mécaniques et chimiques de l'environnement cardiaque (Armour et al., 1994; Thompson et al., 2000b, 2002). Ils sont notamment capables de percevoir une multitude de stimuli chimiques parmi lesquels des composés purinergiques (adénosine), des peptides (BK, angiotensine II, calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P), des catécholamines ou encore l'acidité et le peroxyde d'hydrogène (Thompson et al., 2000b). En cas d'ischémie myocardique ventriculaire, il a été démontré que l'activité de ces neurones était augmentée et que cette sensibilité à l'ischémie était largement dépendante des récepteurs purinergiques (Thompson et al., 2002).

c) Autres afférences sensorielles intra-thoraciques extra-cardiaques

Plusieurs études suggèrent l'existence de boucles de régulation thoraciques complètement indépendantes du système nerveux central. Ces réflexes périphériques mettraient en jeu des neurones sensoriels localisés dans les ganglions cervicaux et stellaires de la chaîne sympathique. Cette hypothèse découle essentiellement du constat que la stimulation des afférences cardiaques conduit toujours à la modulation des efférences sympathiques et ce

même après décentralisation des ganglions de la chaine sympathique (Armour, 1983; Bosnjak and Kampine, 1989). Le nombre d'études suggérant l'existence de neurones sensoriels au sein des ganglions autonomes est toutefois très limité et on ne peut exclure que ces résultats découlent en réalité d'une décentralisation incomplète des ganglions autonomes.

Les principales afférences cardiaques sont représentées sur la **figure 1**.

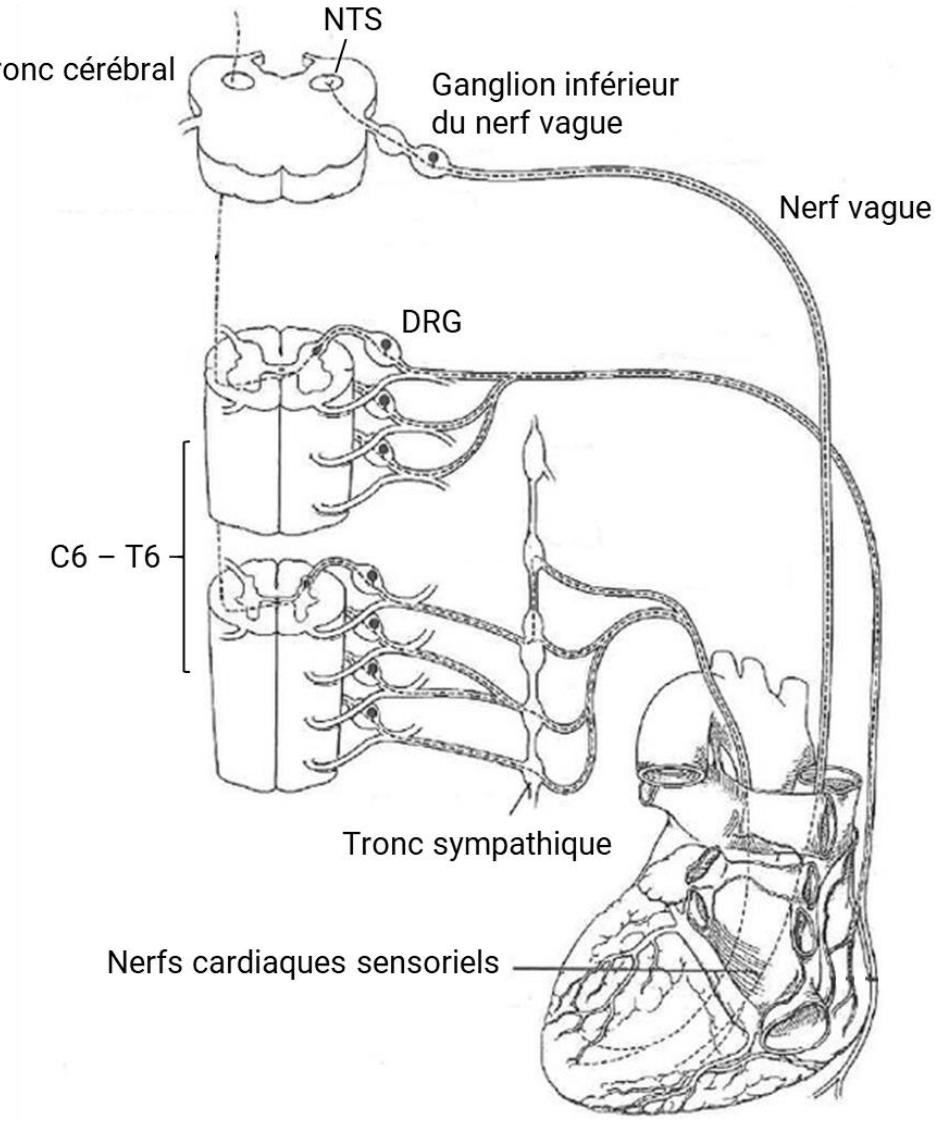


Figure 1 : Les afférences cardiaques sensorielles. Les corps cellulaires des fibres sensorielles innervant le cœur sont principalement retrouvés au sein des DRG et des ganglions inférieurs du nerf vague. NTS : noyau du tractus solitaire (modifié d'après (Sexton et al., 2007))

(ii) Les efférences cardiaques

Le contrôle nerveux des fonctions cardiaques est assuré de manière involontaire par les deux subdivisions sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome. Les efférences motrices autonomes sont composées d'un neurone pré-ganglionnaire, dont le

corps cellulaire est localisé dans le système nerveux central, et d'un neurone post-ganglionnaire, localisé en périphérie et innervant directement l'organe cible.

Au sein de ce système nerveux autonome on distingue une subdivision sympathique, principalement impliquée dans la mise en place des réactions face aux situations de dangers, de stress et de fuite, et une subdivision parasympathique essentiellement impliquée dans le contrôle des fonctions physiologiques au repos.

Au-delà de leur rôle physiologique, ces deux subdivisions se distinguent également par :

(1) La localisation du corps cellulaire des neurones pré-ganglionnaires (moelle thoraco-lombaire pour le système sympathique ; tronc cérébral et moelle sacrée pour le système parasympathique),

(2) La longueur des axones pré et post ganglionnaires : axones pré-ganglionnaires court et post-ganglionnaires long pour le système sympathique et inversement au sein du système parasympathique,

(3) La nature du neurotransmetteur libéré par le neurone post-ganglionnaire : noradrénaline pour le système sympathique et acétylcholine pour le système parasympathique.

Bien que l'ensemble du tissu cardiaque soit innervé par les fibres du système nerveux autonome, cette innervation est particulièrement dense au niveau du nœud sinusal, du nœud auriculoventriculaire ainsi que des tissus conducteurs. De même, les oreillettes présentent une innervation beaucoup plus importante que les ventricules (Zandstra et al., 2021).

a) Les efférences cardiaques sympathiques

Chez les mammifère, les fibres sympathiques innervant le cœur prennent leurs origines dans la moelle épinière, principalement entre le premier et le cinquième segment thoracique (T1 à T5), bien que certaines études suggèrent une localisation pouvant s'étendre des segments C8 à T7 (Coote and Chauhan, 2016; Wink et al., 2020). L'axone de ces neurones pré-ganglionnaires, dont le corps cellulaire est situé dans la corne latérale de la moelle épinière, transite par la racine ventrale de cette dernière et vient établir un contact synaptique avec les neurones post-ganglionnaires au sein des ganglions de la chaine sympathique. Ici, ce sont principalement les corps cellulaires situés dans les ganglions cervicaux moyens ainsi que dans les ganglions stellaires qui participent à l'innervation du cœur (Hopkins and Armour, 1984; Ardell and Armour, 2016). Dans une moindre mesure, les ganglions cervicaux supérieurs ont également été décrits comme participant à l'innervation cardiaque (Hopkins and Armour, 1984) (**figure 2**). Enfin, une partie des neurones post-ganglionnaires sympathiques seraient également présents au sein des ganglions intracardiaques (Butler et al., 1990; Ardell

and Armour, 2016). Cette innervation sympathique concerne l'ensemble des compartiments cardiaques et du réseau vasculaire coronaire.

b) Les efférences cardiaques parasympathiques

Les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques sont localisés au sein du tronc cérébral. Ils sont principalement retrouvés au sein des noyaux ambigus et des noyaux dorsaux moteurs du nerf vague ainsi que dans la zone intermédiaire entre ces deux noyaux (McAllen and Spyer, 1976; Geis and Wurster, 1980; Hopkins and Armour, 1982, 1998) (**figure 2**). L'axone de ces neurones transite par l'intermédiaire du nerf vague jusqu'au cœur, où il établit une synapse avec les neurones post-ganglionnaires présents au sein des ganglions intracardiaques. Il a longtemps été considéré que l'innervation parasympathique cardiaque était restreinte à la région auriculaire et en particulier au tissu nodal. Toutefois, les études anatomiques et fonctionnelles permettent maintenant d'admettre que les ventricules reçoivent également une innervation de la part des efférences parasympathiques (Coote, 2013).

La **figure 2** schématise l'ensemble des voies efférentes autonomes innervant le tissu cardiaque.

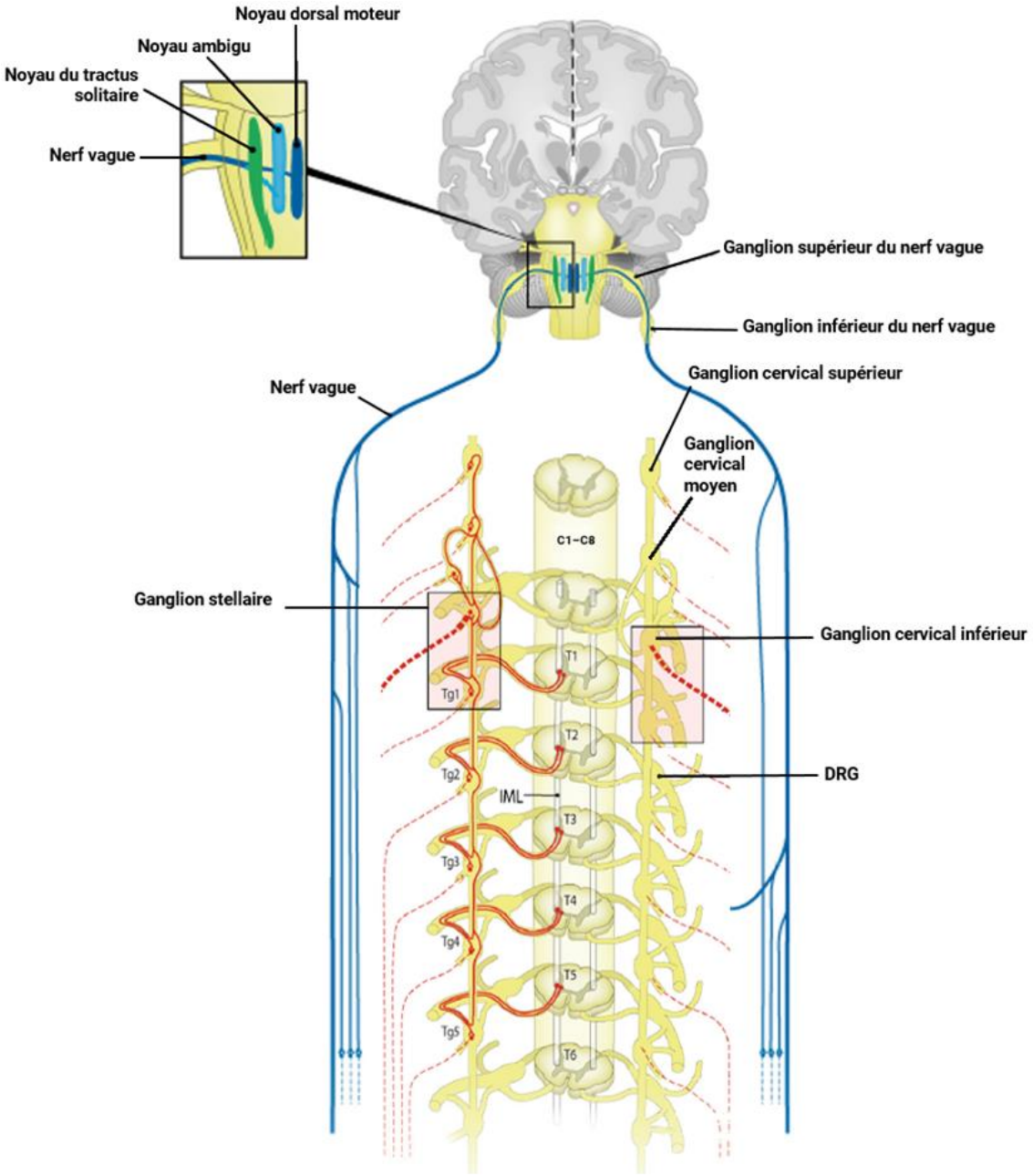


Figure 2 : Efférences sympathiques et parasympathiques cardiaques. modifié d'après (Zandstra et al., 2021).

(iii) Origine embryonnaire de l'innervation cardiaque

Au cours du développement, la mise en place de l'innervation cardiaque se fait parallèlement au développement du système cardiovasculaire. Ces deux systèmes ne possèdent pas la même origine embryonnaire, le système nerveux autonome possédant une origine neuroectodermique et le tissu cardiaque se développant à partir de structures

mésodermiques. Chez la souris, l'innervation du cœur commence à se mettre en place à partir du jour embryonnaire E10.5 ce qui correspond sensiblement à la 5ème semaine de développement chez l'humain (Fedele and Brand, 2020).

L'innervation cardiaque (extrinsèque et intrinsèque) se met en place à partir des cellules de la crête neurale (CCN). Initialement localisées à proximité du tube neural, ces cellules s'individualisent progressivement au cours du développement et migrent depuis le tube neural vers de multiples régions de l'embryon. Une fois le processus de migration entrepris, ces cellules multipotentes entament un processus de différenciation leurs permettant de former des cellules matures. Le devenir des CCN est notamment dépendant de leur localisation au sein de la crête neurale (**figure 3**). Les neurones parasympathiques sont issus de CCN vagales tandis que les ganglions sympathiques et les DRG sont issus de CCN du tronc.

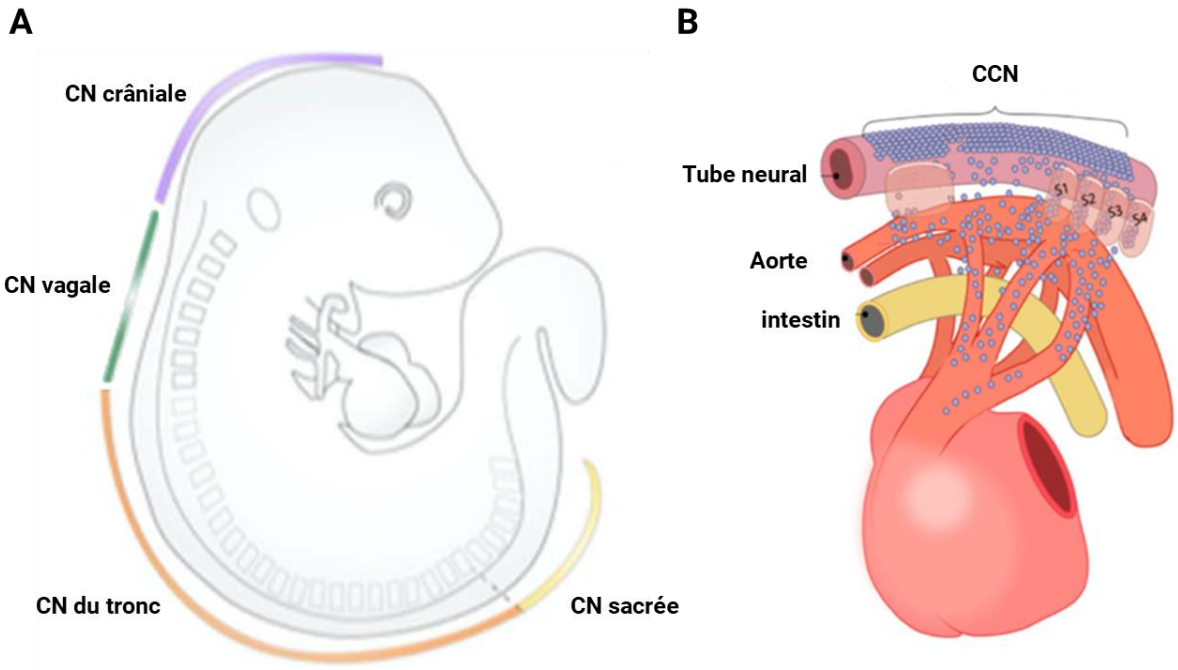


Figure 3 : L'innervation cardiaque se met en place à partir des cellules de la crête neurale. (**A**) Les différentes régions de la crête neurale (CN) (**B**) Représentation schématique de la migration des cellules de la crête neurale (CCN) depuis le tube neural vers le cœur en développement. Modifié d'après Fedele et Brand 2020.

La mise en place de l'innervation cardiaque autonome comporte quatre principales phases : (1) migration des CCN en direction de l'aorte dorsale, (2) différenciation neuronale, (3) formation des ganglions extra et intracardiaques par agrégation et migration des précurseurs neuronaux et (4) extension et différenciation des projections axonales (Hasan, 2013). Des facteurs neurotrophiques interviennent dans chacune de ces étapes, guidant la migration des CCN, engageant les cellules dans un lignage particulier, participant à la survie des neurones et de leurs progéniteurs ou encore guidant la croissance axonale. On pourra par exemple citer le NGF (Nerve Growth Factor), facteur participant à la survie et au guidage axonal des

neurones sympathiques (Végh et al., 2016). Les facteurs impliqués dans la mise en place de l'innervation cardiaque sont beaucoup plus documentés pour le système sympathique que le système parasympathique. Ces informations ne seront toutefois pas détaillées dans ce manuscrit car elles sont trop éloignées des objectifs scientifiques de notre étude.

Bien que la séquence d'évènements conduisant à la mise en place de l'innervation cardiaque autonome ne soit pas précisément connue, l'innervation parasympathique semble être la première à être mise en place. Les voies parasympathiques ainsi formées serviraient ensuite de guide pour la mise en place de l'innervation sympathique (Végh et al., 2016).

[2]. Régulations physiologiques des fonctions cardiaques

La modulation des fonctions cardiaques par le système nerveux autonome découle de l'action combinée des principaux neurotransmetteurs et neuropeptides libérés par les terminaisons nerveuses innervant le tissu cardiaque.

(i) La fonction cardiaque et sa régulation par les RCPG

Le cœur est un organe musculaire dont les battements assurent la propulsion du sang dans l'ensemble du réseau vasculaire. On peut ainsi assimiler le cœur à une « pompe » assurant l'approvisionnement des cellules en nutriments et en oxygène et acheminant les déchets métaboliques vers l'extérieur de l'organisme. D'un point de vue anatomique, le cœur est composé de quatre cavités spécialisées dans la collecte (oreillettes) et l'éjection du sang (ventricules) (**figure 4**).

Contrairement aux muscles squelettiques, le tissu cardiaque regroupe un ensemble de cellules spécialisées lui permettant de fonctionner de manière autonome, indépendamment du système nerveux. Le fonctionnement cardiaque repose ainsi sur l'existence de :

(1) cellules capables d'initier une activité électrique spontanée (cellules pacemaker ou cellules nodales),

(2) cellules spécialisées dans la propagation de l'influx électrique au sein du tissu cardiaque (cellules conductrices),

(3) cellules musculaires qui se contractent en réponse à la stimulation électrique (cellules contractiles).

L'automatisme cardiaque prend son origine au sein de l'oreillette droite, dans une structure spécialisée appelée nœud sinusal. Les cellules du nœud sinusal, présentent une activité

électrique spontanée se traduisant par des dépolarisations membranaires appelées dépolarisations diastoliques (DD). Cette DD conduit à la genèse de potentiels d'action qui, en se propageant, assurent *in fine* la contraction des cardiomyocytes. Le nœud sinusal, et plus particulièrement la vitesse de leur DD conditionne ainsi la fréquence cardiaque, une augmentation de la pente de DD se traduisant par une augmentation de la fréquence cardiaque. Une fois généré, l'influx électrique se propage à l'ensemble des oreillettes puis transite vers le nœud auriculo-ventriculaire, voie de passage unique de l'influx électrique du compartiment auriculaire vers le compartiment ventriculaire. L'influx électrique se propage ensuite à l'ensemble des ventricules par l'intermédiaire des tissus conducteurs (faisceau de His et réseau de Purkinje) qui assurent une conduction tissulaire rapide de l'influx électrique. Cet influx électrique constitue le signal déclencheur de la contraction musculaire ; sa propagation permet donc de stimuler les cardiomyocytes et de conduire à la contraction successive des différents compartiments cardiaques (**figure 4**).

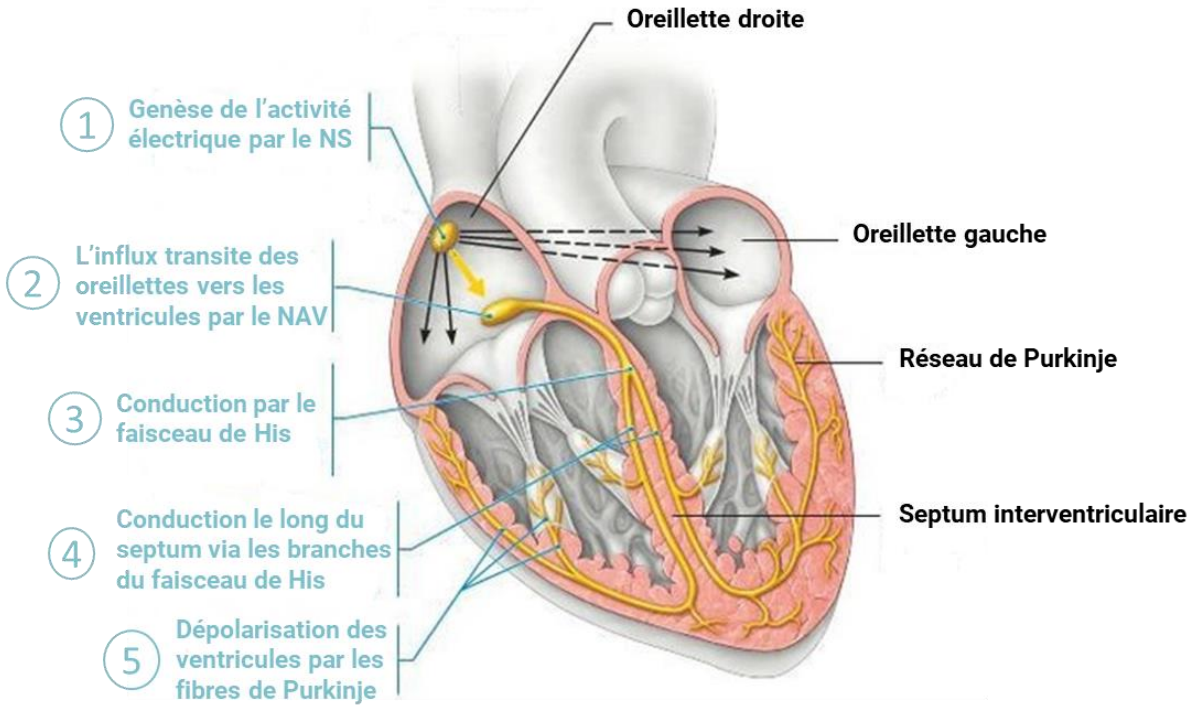


Figure 4 : Initiation et propagation de l'influx électrique cardiaque. Les contractions cardiaques sont déclenchées par une onde électrique parcourant le cœur. Cette activité électrique est générée par les cellules du nœud sinusal situé dans l'oreillette droite. Cette onde se propage ensuite à l'ensemble des oreillettes puis vers les ventricules par l'intermédiaire du nœud auriculo-ventriculaire. Au niveau ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje forment un tissu spécialisé dans la conduction de l'influx électrique. La propagation de cette onde permet de conduire à la contraction successive des oreillettes et des ventricules. NS : nœud sinusal ; NAV : nœud auriculoventriculaire. Schéma modifié d'après quizlet.com.

L'innervation autonome intervient quant à elle dans la régulation du fonctionnement cardiaque afin d'ajuster le travail cardiaque aux besoins réels de l'organisme. L'ensemble du

tissu cardiaque est concerné par ces régulations bien que celles-ci s'exercent principalement sur le nœud sinusal, le nœud auriculoventriculaire ainsi que les tissus conducteurs. Le système nerveux autonome est ainsi capable de réguler la fréquence cardiaque (effet chronotrope), la vitesse de conduction (effet dromotrope), l'excitabilité (effet bathmotrope) mais également de jouer sur la force de contraction (effet inotrope) ainsi que l'aptitude du muscle à se relaxer (effet lusitrope).

Ces paramètres sont principalement régulés par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (RCPG). Une fois activées, ces protéines G initient des voies de signalisation intracellulaire en interagissant avec des effecteurs tels que des enzymes ou des canaux ioniques. Les voies de signalisation déclenchées par ces récepteurs dépendent de la nature de la protéine G avec laquelle ils sont couplés. On distingue ainsi les protéines Gq capable d'activer la voie de la phospholipase C (PLC), les protéines Gs capable de stimuler l'activité de l'adénylate cyclase et les protéines Gi impliquées dans l'inhibition de l'adénylate cyclase. La mise en jeu de ces cascades de signalisation dans les différentes cellules spécialisées du cœur conduit à la régulation de nombreuses cibles moléculaires et ainsi à la modulation des propriétés cardiaques.

(ii) Voies de signalisation associées à l'innervation sympathique

Les actions du système nerveux sympathique sont principalement médiées par l'activation des récepteurs adrénergiques suite à la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques. Les récepteurs adrénergiques appartiennent à la famille des RCPG et se distinguent en deux grandes classes : les récepteurs α (1 et 2) et les récepteurs β (1 à 3). Les récepteurs α1 sont couplés à une protéine Gq tandis que les récepteurs α2 régulent négativement l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gi. Les récepteurs β1 et β2 sont couplés à une protéine Gs alors que les récepteurs β3 peuvent aussi bien être couplés à une protéine Gi qu'à une protéine Gs (Motiejunaite et al., 2021).

Il a longtemps été admis que les influences cardiaques sympathiques découlaient principalement de l'activation des récepteurs β1 (qui représenteraient 80 % des récepteurs β-adrénergiques cardiaques) et dans une moindre mesure des récepteurs β2. Toutefois, en 2018, les travaux de Myagmar et collaborateurs (2017) proposent les récepteurs β1 et α1 comme les principaux récepteurs exprimés par le tissu cardiaque. En effet, leurs résultats indiquent la présence des récepteurs β1 et α1B dans l'ensemble des cardiomyocytes ventriculaires et des récepteurs α1A dans près de 60 % de ces cardiomyocytes. Les récepteurs β2 et β3 seraient quant à eux principalement retrouvés dans les cellules non musculaires telles que les cellules endothéliales (Myagmar et al., 2017). Bien que certaines

études suggèrent que les récepteurs α-adrénergiques joueraient un rôle dans la modulation de la fonction contractile cardiaque (O'Connell et al., 2014), la voie β-adrénergique reste la voie principale impliquée dans la régulation sympathique des fonctions cardiaques.

L'activation de la voie β-adrénergique conduit à la stimulation de l'adénylate cyclase et à la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'ATP. Cette augmentation de la concentration cytosolique en AMPc se traduit enfin par l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) qui phosphoryle de multiples protéines cibles (canaux ioniques, phospholamban, protéines constitutives des sarcomères…). L'activation de cette cascade de signalisation dans les différentes cellules spécialisées du cœur se traduit par une augmentation de la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif), une augmentation de la vitesse de conduction de l'influx électrique (effet dromotrope positif), une augmentation de l'excitabilité cellulaire (effet bathmotrope), une augmentation de la force de contraction musculaire (effet inotrope positif) ainsi qu'une augmentation des capacités de relaxation musculaire (effet lusitrope positif) (Motiejunaite et al., 2021) (**figure 5**). L'ensemble de ces effets conduit à une augmentation du débit cardiaque par augmentation du volume d'éjection systolique et de la fréquence cardiaque. De cette manière, l'activation du système nerveux sympathique permet de répondre aux besoins accrus de l'organisme dans les réactions de stress et de fuite.

Mis à part la noradrénaline, les terminaisons sympathiques sont également capables de libérer des co-transmetteurs tels que l'ATP, le neuropeptide Y (NPY) et la galanine (Tan et al., 2018). La libération de ces co-transmetteurs est dépendante du niveau de stimulation neuronale et intervient généralement dans des conditions de forte stimulation sympathique, le plus souvent retrouvée en situation pathologique. Dans le contexte cardiaque, la libération de NPY et de galanine conduirait principalement à des actions pré-synaptiques inhibitrices sur les terminaisons parasympathiques se traduisant par une diminution des libérations d'acétylcholine, via l'activation des récepteurs Y2 et GalR1, respectivement (Herring et al., 2008, 2012) (**figure 5**). Le NPY pourrait également intervenir au niveau post-synaptique, où il modulerait l'activité de certains canaux ioniques exprimés par les cardiomyocytes (Bryant and Hart, 1996; Heredia et al., 2002). Les effets médiés par l'activation de ces récepteurs découlent principalement de l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase mais impliqueraient aussi des mécanismes PKC-dépendants, ce qui suggère que ces RCPG pourraient à la fois être couplés à une protéine Gi et à une protéine Gq (Heredia et al., 2002; Herring et al., 2012) (**figure 5**).

(iii) Voies de signalisation associées à l'innervation parasympathique

Au repos, le cœur est principalement sous influence parasympathique, on parle ainsi de tonus vagal. La neuro-modulation vagale des fonctions cardiaques découle de l'activation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine libérée par les terminaisons nerveuses parasympathiques. Parmi les 5 sous-types de récepteurs muscariniques identifiés (M1 à M5), les influences parasympathiques cardiaques sont principalement médiées par l'activation des récepteurs M2 (Harvey and Belevych, 2003). Contrairement à la voie β-adrénergique, l'activation des récepteurs M2 se traduit par une inhibition de la voie de l'adénylate cyclase et par conséquent une diminution des concentrations en AMPc et des phosphorylations PKA-dépendantes. Ainsi, la voie parasympathique est associée à des effets chronotropes, dromotropes, bathmotropes, inotropes et lusitropes négatifs (Ten Eick et al., 1976; Martin, 1977; Irisawa et al., 1993) (**figure 5**). Bien que les influences parasympathiques concernent l'ensemble du tissu cardiaque, le nœud sinusal et le nœud auriculoventriculaire constituent les deux principales régions modulées par ce système. Ceci s'explique notamment par l'importante densité de l'innervation parasympathique ainsi que la forte expression des récepteurs muscariniques dans ces deux régions cardiaques (Löffelholz and Pappano, 1985; Zandstra et al., 2021).

De manière indirecte, l'acétylcholine peut également agir en inhibant la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques. Ces effets présynaptiques passeraient également par l'activation des récepteurs M2 (Haunstetter et al., 1994; Harvey, 2012) (**figure 5**).

En plus de l'acétylcholine, les terminaisons parasympathiques sont également capables de libérer le peptide vasoactif intestinal (VIP). Les fibres cholinergiques co-exprimant ce neuropeptide seraient particulièrement présentes au niveau du nœud sinusal, du nœud auriculoventriculaire ainsi que des fibres de Purkinje (Forssmann et al., 1988). Plusieurs études ont démontré que les cardiomyocytes étaient capables d'exprimer les récepteurs du VIP et que leur activation conduisait à des effets chronotropes et inotropes positifs médiés par l'activation de la voie de l'adénylate cyclase (Rigel et al., 1989; Chang et al., 1994; Tiaho and Nerbonne, 1996; Xi et al., 2013).

La figure 5 ci-dessous récapitule les différentes voies de transduction associées à la modulation des fonctions cardiaques.

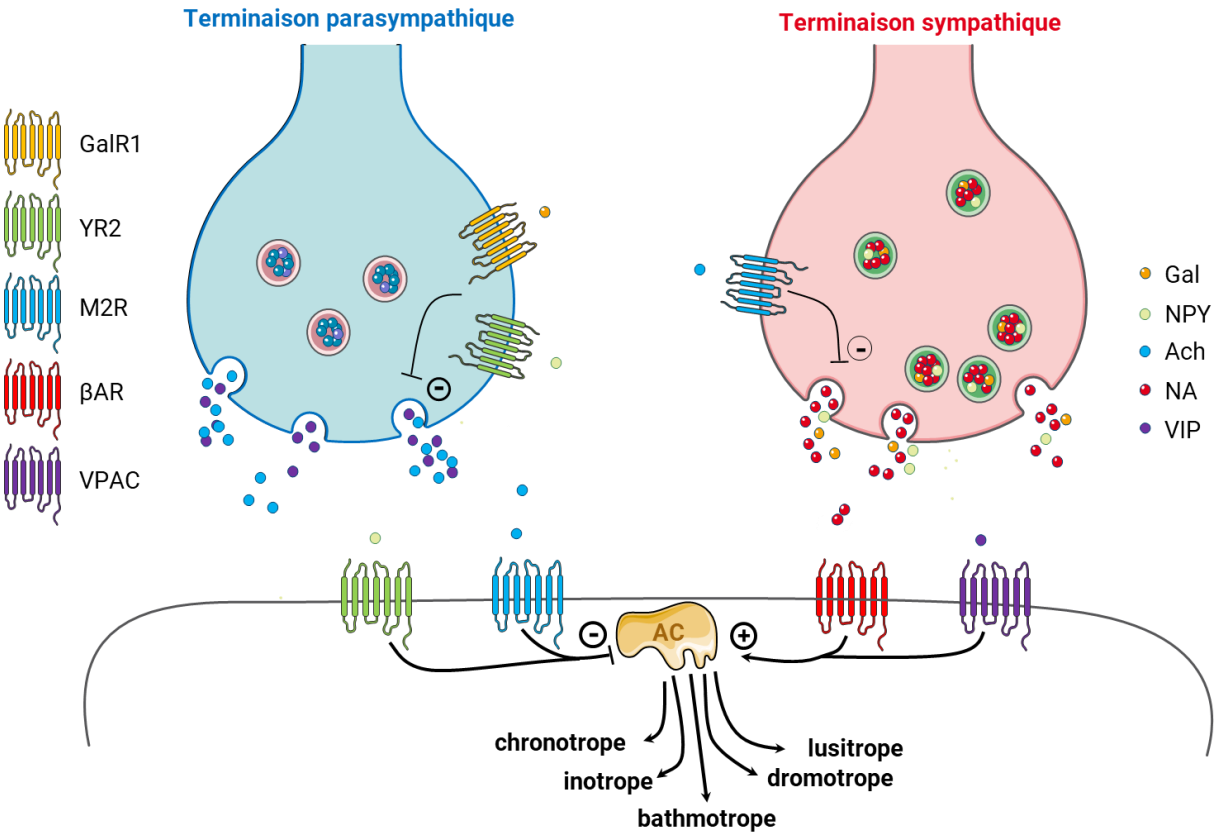


Figure 5 : Voies de transduction associées à la neuro-modulation des fonctions cardiaques. Les terminaisons nerveuses parasympathiques sont capables de libérer de l'acétylcholine et du VIP tandis que les terminaisons sympathiques libèrent de la noradrénaline du NPY et de la galanine. Au niveau cardiaque, ces substances agissent par l'intermédiaire de RCPG principalement impliqués dans la régulation de l'activité de l'adénylate cyclase. Au-delà de leurs actions post-synaptiques, les substances libérées peuvent également agir au niveau présynaptique. Ainsi le système parasympathique est capable d'inhiber les libérations sympathiques via l'activation de récepteurs muscariniques tandis que le système sympathique inhibe les libérations parasympathiques via l'activation des récepteurs de la galanine et du NPY. Gal : galanine ; NPY : neuropeptide Y ; Ach : acétylcholine ; NA : noradrénaline ; VIP : peptide vasoactif intestinal ; GalR1 : récepteur 1 de la galanine ; YR2 : récepteur 2 du NPY ; M2R : récepteur muscarinique de type 2 ; βAR : récepteur β-adrénergique ; VPAC : récepteur du VIP.

La régulation physiologique des fonctions cardiaques repose sur un juste équilibre entre les systèmes sympathique et parasympathique. Toutefois, ces influences autonomes extrinsèques sont ultimement conditionnées par les réseaux neuronaux intracardiaques qui constituent la voie finale régissant la modulation des fonctions cardiaques. Le **chapitre 2** est ainsi dédié à la description de ce SNIC.

Chapitre 2 : Régulation nerveuse intrinsèque des fonctions cardiaques : le système nerveux intracardiaque

Le SNIC correspond à l'ensemble des neurones localisés au sein du tissu cardiaque. De manière similaire à ce qui est retrouvé au niveau entérique, ces neurones sont regroupés sous la forme d'agrégats appelés ganglions. Ces ganglions sont eux-mêmes concentrés dans certaines régions définissant des zones appelées plexus ganglionnaires.

Initialement, ces neurones cardiaques étaient considérés comme n'étant que les relais parasympathiques du système nerveux autonome. Toutefois, les études menées depuis une trentaine d'années dans le domaine de la neuro-cardiologie suggèrent une organisation beaucoup plus complexe de ces structures ganglionnaires intracardiaques. Ainsi, ces ganglions seraient composés de neurones sensoriels, d'interneurones ainsi que de neurones moteurs constituant un véritable centre d'intégration participant à la modulation des influences autonomes extrinsèques mais également à la mise en place de boucles de régulation intracardiaques indépendantes des centres nerveux extrinsèques (Armour et al., 1998; Armour, 2008).

[1]. Description anatomique

L'étude anatomique du SNIC a été largement réalisée depuis la fin des années 1990 chez de nombreuses espèces de mammifères parmi lesquelles l'homme, le porc, le mouton, le lapin, le chat, le chien ainsi que les rongeurs (Wake et Brack 2016).

Chez l'humain, le SNIC serait composé de plusieurs dizaines de milliers de neurones (43 000 à 94 000) organisés en plusieurs centaines de ganglions (700 à 1500) répartis sur 7 principales zones ganglionnaires (plexus ganglionnaires). La majorité de ces ganglions sont localisés au niveau auriculaire bien que certains soient également retrouvés sur la partie supérieure des ventricules. Enfin la grande majorité de ces ganglions (75 %) présentent une localisation dorsale (Pauza et al., 2000) (**figure 6**). Le volume de ces ganglions varie considérablement en fonction du ganglion étudié, chacun pouvant contenir quelques dizaines à plusieurs centaines de neurones.

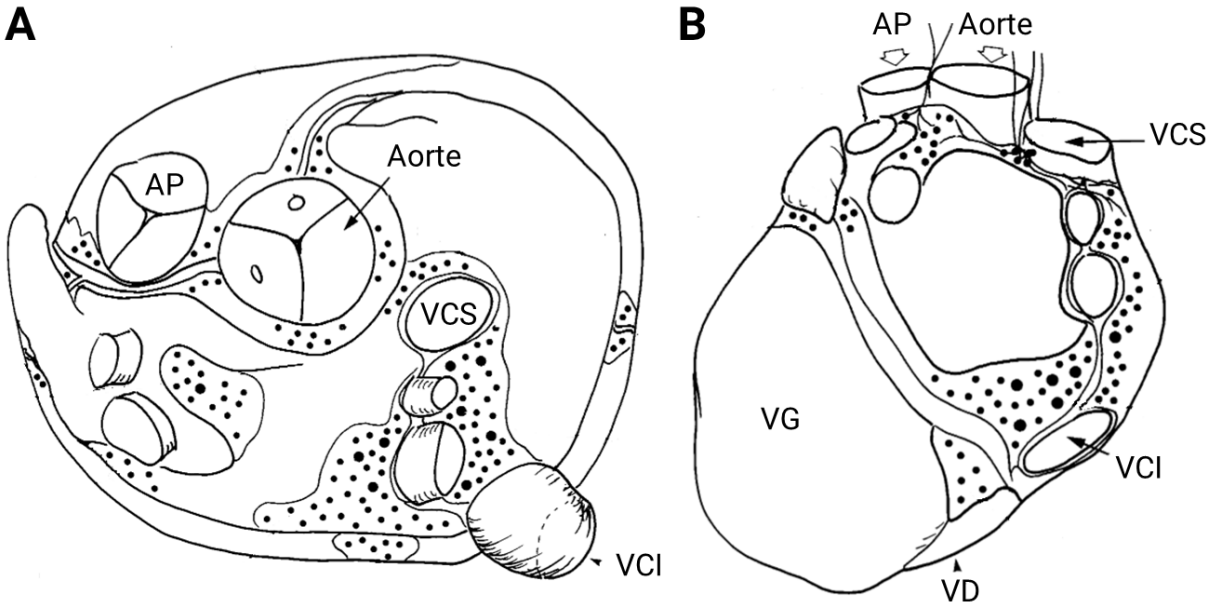


Figure 6 : Schéma représentant la localisation des ganglions cardiaques chez l'homme. Observation de la localisation des ganglions sur le cœur humain en vue supérieure (**A**) et postérieure (**B**). Les ganglions sont schématiquement représentés par les points noirs. AP : artère pulmonaire ; VCS : veine cave supérieure ; VCI : veine cave inférieure ; VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit (modifié d'après **(Armour et al., 1997)**)

Bien qu'il existe une importante variabilité inter-espèces (**tableau 1**), ces neurones cardiaques sont toujours retrouvés au niveau épicardique et semblent principalement localisés à la base du cœur, notamment à proximité de certains vaisseaux cardiaques parmi lesquels l'aorte, les veines caves et les veines pulmonaires (VP). La présence de ganglions dans les régions ventriculaires semble en revanche beaucoup moins systématique et concerne principalement les gros mammifères (humain, chien, chat, mouton…). Lorsqu'ils sont présents, ces ganglions sont toujours localisés dans les régions supérieures des ventricules, l'apex étant dénué de toute zone ganglionnaire (Wake et Brack 2016). Indépendamment de l'espèce étudiée, ces ganglions apparaissent toujours largement interconnectés par des réseaux denses de fibres nerveuses (**figure 7**).

Espèce	Nombre moyen de neurones cardiaques	Nombre moyen de ganglions cardiaques
Souris	1082 ± 160	19 ± 3
Rat	6576 ± 317	-
Cobaye	2321 ± 215	262 ± 28
Lapin	2200 ± 262	-
Chien	~80 000	~2 000
Mouton	~17 000	769 ± 52
Porc	~12 000	362 ± 52
Humain	43 000 à 94 000	836 ± 76

Tableau 1 : Nombre moyen de neurones et de ganglions cardiaques dans différentes espèces de mammifères (modifié d'après Wake et Brack 2016).

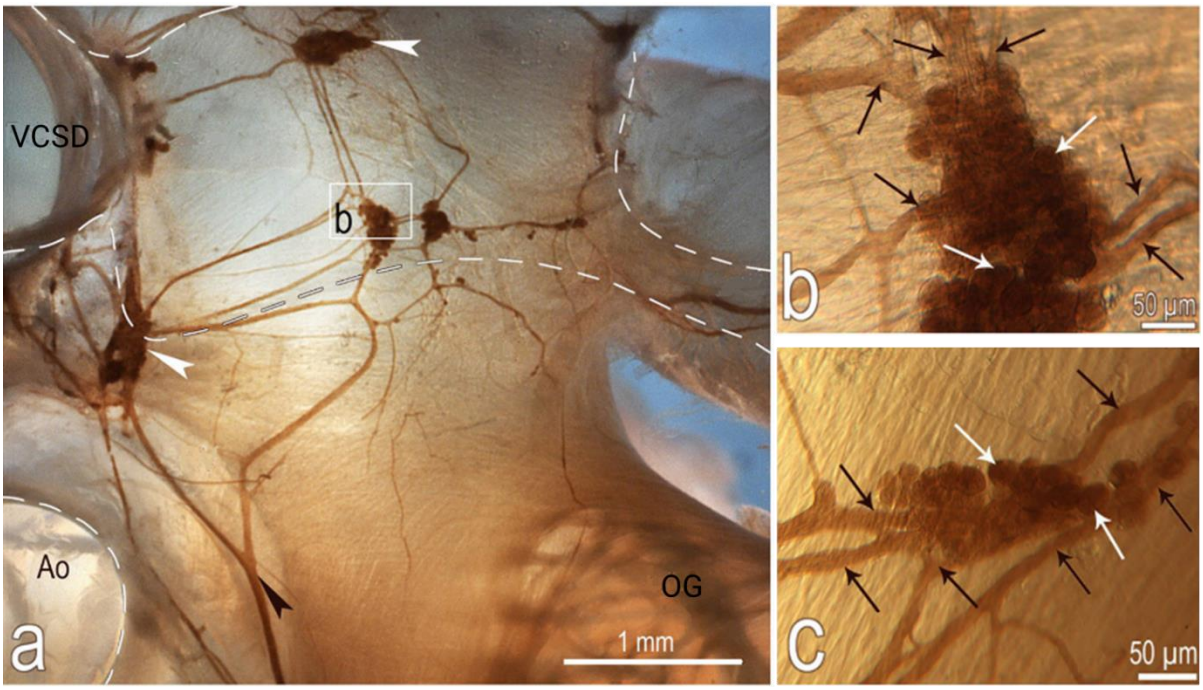


Figure 7 : Images représentant la morphologie typique des ganglions intracardiaques et de leurs interconnexions. Les neurones ainsi que les fibres nerveuses associées sont visualisés grâce à un protocole d'histochimie marquant l'acétylcholinesterase. (a) un exemple typique de nerf cardiaque est indiqué par la pointe de flèche noir. Les deux pointes de flèches blanches montrent deux ganglions. (b et c) les flèches blanches pointent des neurones cardiaques tandis que les flèches noires indiquent des fibres interganglionnaires. Les pointillés délimitent le hile cardiaque. VCSD : veine cave supérieure droite ; OG : oreillette gauche ; Ao : aorte (modifié d'après Rysevaite et al. 2011a).

Parmi les espèces étudiées, la souris semble présenter l'innervation intrinsèque la moins dense avec, en moyenne, environ 1000 neurones intracardiaques répartis sur une vingtaine de ganglions (Rysevaite et al., 2011a, 2011b). Dans cette espèce, les ganglions apparaissent principalement localisés au niveau des VP et aux abords de la veine cave supérieure (**figure 8**).

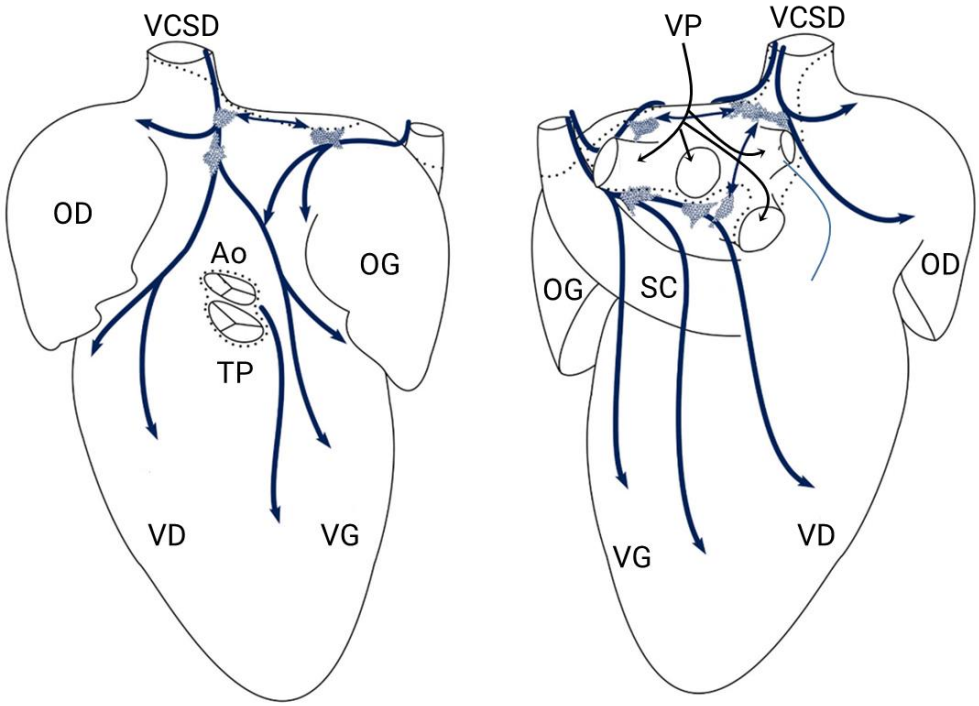


Figure 8 : Schéma représentant la localisation des principales zones ganglionnaires intracardiaques chez la souris. VCSD : veine cave supérieure droite ; OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; Ao : aorte ; TP : tronc pulmonaire ; VD : ventricule droite ; VG : ventricule gauche ; VP : veine pulmonaire ; SC : sinus coronaire. Les flèches bleues représentent le trajet des projections nerveuses issues des ganglions (modifié d'après Rysevaite et al. 2011a).

De manière intéressante, les travaux menés sur les cœurs humains suggèrent que le nombre de neurones intracardiaques pourrait considérablement varier en fonction de l'âge, les cœurs provenant de personnes adultes renfermant considérablement moins de neurones que les cœurs provenant de stades plus précoces (embryonnaire à jeunes enfants) (Pauza et al., 2000). Chez le chien et le cobaye, le nombre total de neurones cardiaques ne semblent en revanche pas varier en fonction de l'âge (Pauza et al., 2002; Batulevicius et al., 2005).

Enfin, indépendamment de l'espèce, l'ensemble de ces travaux stipulent qu'il existe une importante variabilité interindividuelle se traduisant par une densité de neurones cardiaques variable d'un cœur à l'autre (Armour et al., 1997; Pauza et al., 2002). Chez le chien par exemple, le nombre total de ganglions peut considérablement varier d'un individu à l'autre allant de 400 à 1500 (Pauza et al., 2002).

[2]. Les différents types cellulaires intra-ganglionnaires

(i) Les différents types de neurones

a) Nature neurochimique des neurones intracardiaques

Les études immunohistochimiques ont révélé l'expression de nombreux marqueurs neuronaux différents (neurotransmetteurs, neuromédiateurs, neuropeptides…) de la part des neurones intracardiaques démontrant que ces neurones ne formaient pas une population homogène et qu'ils ne pouvaient donc pas seulement correspondre aux relais parasympathiques du système nerveux autonome. La mise en évidence de la diversité neurochimique des neurones cardiaques découle principalement d'études menées chez le rat et le cobaye bien que quelques travaux aient été menés dans d'autres espèces y compris l'homme, le lapin et la souris.

En dehors du contexte cardiaque, plusieurs études ont montré que les neurones appartenant à une même catégorie fonctionnelle étaient aussi caractérisés par l'expression des mêmes substances neuro-actives (neurotransmetteurs et neuropeptides). En d'autres termes, au-delà d'être identifiable par le tissu cible qu'ils innervent, les neurones exerçant une même fonction exprimeraient également les mêmes combinaisons de substances neuro-actives. Cette observation a été regroupée sous le terme de « chemical coding » et suggère que la présence de différents phénotypes neuronaux pourraient aussi refléter la présence de différentes catégories fonctionnelles de neurones (Furness et al., 1989).

Phénotype cholinergique

Quelle que soit l'espèce considérée, toutes les études s'accordent et indiquent que le phénotype cholinergique est le phénotype prédominant au sein des ganglions cardiaques (Mawe et al., 1996; Horackova et al., 1999; Richardson et al., 2003; Hoover et al., 2009; Rysevaite et al., 2011b; Pauziene et al., 2016). Les neurones cholinergiques sont notamment identifiés par la détection de la choline acétyltransférase (ChAT), enzyme de synthèse de l'acétylcholine (**figure 9**), ou encore par l'expression du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VAChT). Parmi les études ayant réalisé une quantification, les résultats indiquent la présence de marqueurs cholinergiques dans 97 à 100 % des neurones, plaçant l'acétylcholine comme le principal neurotransmetteur des ganglions cardiaques (Mawe et al., 1996; Richardson et al., 2003; Rysevaite et al., 2011b). Les travaux de Horackova ont montré que la prédominance du phénotype cholinergique s'instaurait au cours des premières semaines post-natales. Ainsi, alors que les neurones cholinergiques ne représentent que 60 à 70 % des neurones cardiaques à J14, le phénotype cholinergique augmente

progressivement entre J14 et J21 jusqu'à représenter 90 % de l'ensemble des neurones (Horackova et al., 2000) .

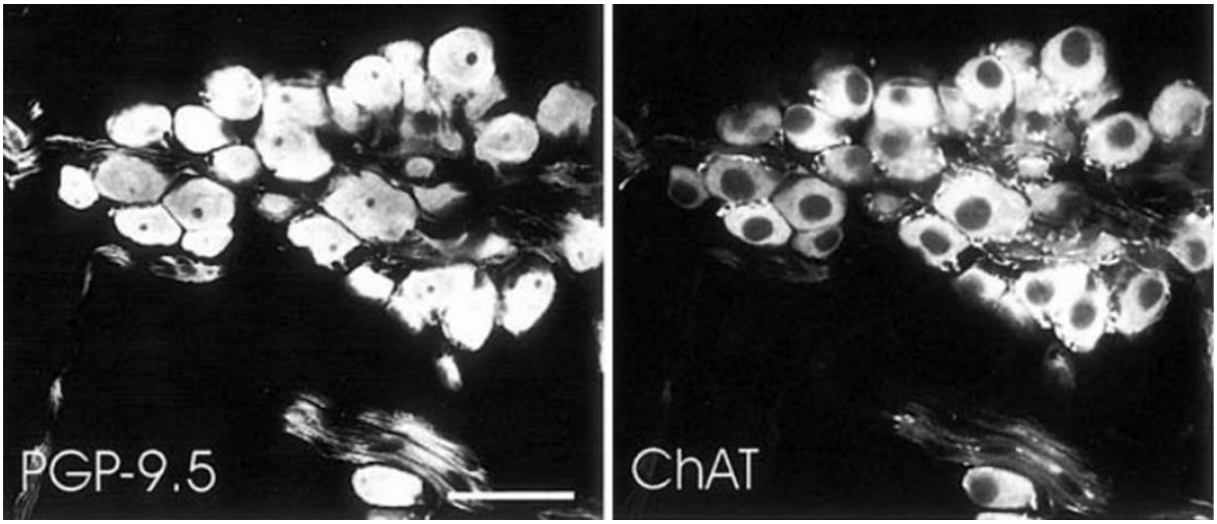


Figure 9 : Les neurones cardiaques présentent majoritairement un phénotype cholinergique. Image permettant d'observer que la grande majorité des neurones expriment la ChAT. Le marqueur PGP9.5 est un marqueur neuronal large utilisé pour marquer l'ensemble des neurones formant les ganglions cardiaques. Résultats issus de Richardson et al. 2003.

Phénotype catécholaminergique

L'expression de marqueurs catécholaminergiques au sein des neurones cardiaques a été rapportée chez l'homme, le lapin, la souris, le singe et le cobaye (Horackova et al., 1999; Weihe et al., 2005; Hoard et al., 2008; Hoover et al., 2009; Pauziene et al., 2016). Ces études démontrent que ces neurones sont notamment capables d'exprimer la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme catalysant la première étape de synthèse des catécholamines à partir de la tyrosine. A l'exception de la souris, où ce phénotype est davantage retrouvé, ces neurones représentent généralement une petite fraction des neurones cardiaques et co-expriment également la ChAT. Chez le rat, les résultats sont un peu plus contradictoires. En effet, alors que les travaux menés par Richardson suggèrent l'absence de soma exprimant la TH, les résultats obtenus par les équipes de Moravec et Slavikova suggèrent la présence de neurones immunoréactifs pour cette même enzyme (Moravec et al., 1990; Richardson et al., 2003; Slavíková et al., 2003).

Ces études rapportent également l'expression d'autres marqueurs catécholaminergiques (**figure 10**) tels que l'expression des enzymes dopamine beta-hydroxylase (DBH) et phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT), impliquées dans la synthèse de noradrénaline et d'adrénaline respectivement, ainsi que du transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2 impliqué dans le stockage vésiculaire des catécholamines (Slavíková et al., 2003; Weihe et al., 2005; Hoard et al., 2008).

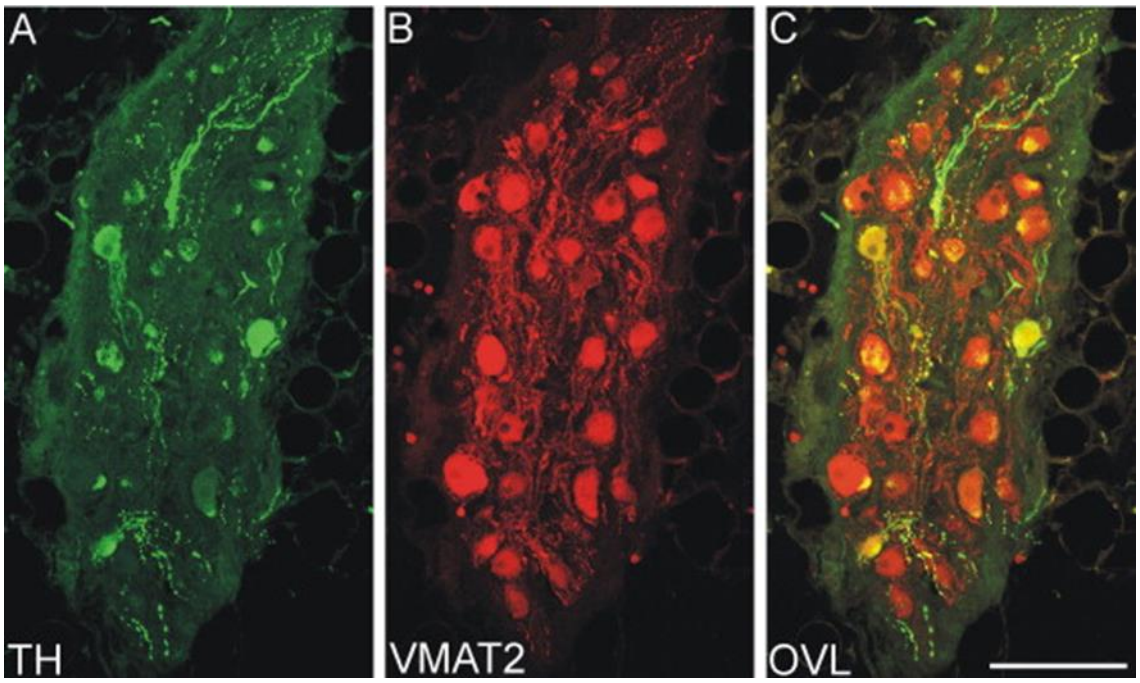


Figure 10 : Les neurones cardiaques humains expriment des marqueurs catécholaminergiques. Images permettant d'observer l'expression de l'enzyme TH et du transporteur vésiculaire VMAT2 au sein des neurones cardiaques de l'homme, suggérant l'aptitude de ces neurones à synthétiser et libérer des catécholamines. Résultats issus de Hoover et al. 2009.

L'expression des marqueurs catécholaminergiques dans le SNIC murin a été largement investiguée par le groupe de Hoard. Leurs résultats indiquent que 30 % des neurones cardiaques expriment les enzymes TH et DBH suggérant leur capacité à synthétiser la noradrénaline, mais que cette expression n'est pas associée à la présence de VMAT2, transporteur pourtant essentiel au stockage vésiculaire et à la libération synaptique de ce neurotransmetteur (Hoard et al., 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Weihe en 2005, qui suggéraient que contrairement à ce qui était retrouvé chez l'homme et le singe, les neurones murins ne semblaient pas exprimer VMAT2 (Weihe et al., 2005). La libération de noradrénaline par ces neurones pourrait possiblement être médiée par le transporteur de noradrénaline NET (norepinephrine transporter) qui a été détecté dans l'ensemble des neurones cardiaques murins. D'ordinaire, ce transporteur assure la recapture de la noradrénaline du compartiment extracellulaire vers le cytosol. Toutefois, certaines conditions telles qu'une déplétion des concentrations intracellulaires en ATP ou une accumulation intracellulaire de sodium, peuvent conduire à une inversion du transporteur qui conduit à la libération de noradrénaline vers le compartiment extracellulaire. Plusieurs travaux ont démontré que ce phénomène de libération non exocytotique de la noradrénaline pouvait avoir lieu lors d'ischémie myocardique et que cela contribuait à amplifier la lésion ischémique (Hatta et al., 1997; Smith and Levi, 1999; Richardt et al., 2006). Richardt et collaborateurs ont notamment montré que l'inhibition du transporteur NET dans un modèle d'ischémie

myocardique permettait de limiter l'accumulation de noradrénaline déclenchée par l'ischémie et de réduire la taille de l'infarctus.

Phénotype nitrergique

La plupart des études réalisées ont permis d'identifier la présence de neurones nitrergiques parmi les neurones intracardiaques (Klimaschewski et al., 1992; Mawe et al., 1996; Richardson et al., 2003; Maifrino et al., 2006; Hoover et al., 2009; Pauziene et al., 2016; Allen et al., 2018). Ces neurones sont caractérisés par l'expression de la nitric oxide synthase neuronale (nNOS), enzyme responsable de la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de L-arginine. Mis à part chez l'homme où la nNOS semble retrouvée dans la grande majorité des neurones, cette enzyme ne semble exprimée que par une petite proportion de neurones cardiaques dans les autres espèces (4 à 10 %). Contrairement à la plupart des neurotransmetteurs, les actions du NO n'impliquent aucun mécanisme de stockage vésiculaire et d'exocytose. Une fois synthétisé, le NO diffuse librement au travers des membranes plasmiques conduisant à des effets pré- et post-synaptiques. Des travaux ont notamment montré que le NO participe à la modulation du système parasympathique via une action présynaptique stimulant la libération d'acétylcholine (Herring et al., 2000). Dans le contexte où l'acétylcholine représente le principal neurotransmetteur associé à l'innervation cardiaque intrinsèque, la présence de neurones capables de synthétiser du NO apparait donc particulièrement intéressante. Cette population de neurones nitrergiques pourrait également agir au niveau post synaptique sur les cardiomyocytes comme le suggère les travaux de Pauziene et collaborateurs qui ont observé de nombreuses fibres exprimant nNOS au sein de la paroi ventriculaire. Curieusement, alors que la densité de fibres cholinergiques et nitrergiques apparait équivalente dans l'endocarde et l'épicarde, leurs résultats indiquent que les fibres nitrergiques apparaissent particulièrement abondantes dans la région myocardique, représentant une densité 8 fois supérieure à celle des fibres cholinergiques. Dans ce modèle, les neurones nitrergiques semblent ainsi spécialisés dans l'innervation d'une zone tissulaire cardiaque précise (Pauziene et al., 2016).

D'un point de vue pathologique, cette population neuronale pourrait aussi apparaitre importante dans le contexte où des propriétés antiarythmiques ont été attribuées au NO (Brack et al., 2007). Le groupe de Ng avance même l'hypothèse selon laquelle les neurones nitrergiques constitueraient une sous-catégorie fonctionnelle de neurones possédant des propriétés antiarythmiques (Ng, 2014).

Phénotype glutamatergique

La présence d'un phénotype glutamatergique au sein des neurones intracardiaques a été rapportée par une seule étude menée chez le SNIC du rat. Dans cette étude, une proportion non négligeable de neurones exprime la glutaminase, enzyme catalysant l'hydrolyse de la glutamine en glutamate, ainsi que les transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1 et VGLUT2. Grâce à une approche de marquage rétrograde, ces auteurs ont également montré qu'une partie de ces neurones glutamatergiques était impliquée dans l'innervation de certaines régions ventriculaires (Wang et Miller 2016). Chez le rat, l'expression de plusieurs récepteurs au glutamate a été détectée dans les régions ganglionnaires ainsi que dans certaines régions cardiaques tels que les éléments du système de conduction, suggérant que le glutamate pourrait être impliqué dans la régulation physiologique des fonctions cardiaques de manière directe, par action sur le tissu cardiaque, ou indirecte, en agissant sur les neurones impliqués dans la modulation des paramètres cardiaques (Gill et al., 1998, 1999). Les travaux menés par le groupe de Huang puis par celui de Thompson ont par ailleurs montré que l'application localisée de glutamate dans les régions ganglionnaires intracardiaques se traduisait par la modulation de l'activité de certains neurones ainsi que de certains paramètres cardiaques (fréquence cardiaque et pression intraventriculaire gauche), et ce même après élimination de toute innervation extrinsèque (Huang et al., 1993; Thompson et al., 2000a). Dans leur étude, l'administration de β-bloquant et d'antagonistes muscariniques est associée à une perte totale de réponse cardiaque au glutamate, démontrant que les effets cardiaques du glutamate découle, en partie du moins, de la modulation des neurones intracardiaques (Huang et al., 1993).

Au sein du système nerveux périphérique, le glutamate a été décrit comme le principal neurotransmetteur excitateur des neurones sensoriels présents au sein des DRG (Malet and Brumovsky, 2015). La nature neurochimique des neurones sensoriels intracardiaques étant encore inconnue, il apparait intéressant d'investiguer le rôle d'une telle population de neurones au sein du cœur.

Neuropeptides

L'expression de plusieurs neuropeptides a également été rapportée au sein des neurones intracardiaques. Parmi les neuropeptides retrouvés, le NPY est le neuropeptide le plus fréquemment décrit. Chez le rat, Richardson et collaborateurs observent sa présence dans l'ensemble des neurones intracardiaques (Richardson et al., 2003). Chez le cobaye, les données sont un peu plus contradictoires, Steele et collaborateurs l'observant dans environ 15 % des neurones tandis que le groupe de Horackova rapporte sa présence dans la majorité

des corps cellulaires (Steele et al., 1994; Horackova et al., 1999). La présence du peptide VIP a aussi été décrite chez ces deux espèces mais ne semble concerner qu'une petite proportion de neurones. Les seuls travaux ayant réalisé une quantification indiquent en effet sa présence dans seulement 3 % des neurones intracardiaques (Steele et al., 1994; Horackova et al., 1999; Kuncová et al., 2003; Parsons et al., 2006).

Chez le rat, le deuxième neuropeptide le plus fréquemment exprimé par les neurones est le peptide CART (cocaine and amphetamine-regulated transcript), celui-ci étant en effet retrouvé dans près de la moitié des neurones intracardiaques (Richardson et al., 2006). L'expression de ce peptide a également été retrouvée chez le cobaye mais ne concerne qu'une très faible proportion de neurones chez cette espèce (Calupca et al., 2001). A notre connaissance, la présence de ce peptide dans les neurones cardiaques n'a pas été investiguée chez d'autres espèces. Bien que retrouvé dans une multitude de neurones au niveau central et périphérique, le rôle joué par CART reste encore largement incompris. De plus en plus de travaux suggèrent que ce peptide pourrait agir en tant que neurotransmetteur, régulant de nombreuses fonctions physiologiques (Ahmadian-Moghadam et al., 2018). Au niveau périphérique, ce neuropeptide est largement exprimé au sein du système nerveux entérique mais sa fonction biologique n'a pas encore été identifiée (Ekblad, 2006). De même, le rôle joué par ce peptide dans le contexte cardiaque reste encore à déterminer.

Le cobaye semble de loin l'espèce présentant l'expression cardiaque en neuropeptides la plus riche et la plus diversifiée. En effet, la littérature fait état de l'expression de 7 neuropeptides différents (NPY, VIP, CART, substance P, somatostatine, dynorphine B et PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) au sein de cette espèce (Steele et al., 1994; Braas et al., 1998; Horackova et al., 1999; Calupca et al., 2001; Parsons et al., 2006). Parmi l'ensemble de ces peptides, la somatostatine et la dynorphine B semble être les deux principaux neuropeptides retrouvés dans les corps cellulaires intracardiaques (Steele et al., 1994).

Très peu d'études se sont focalisées sur l'étude des neuropeptides exprimés par les neurones cardiaques humains. A notre connaissance, seule l'équipe de Hoover a rapidement examiné cette expression et ils n'ont pas été en mesure de détecter la présence de CGRP, de substance P ou encore de VIP (Hoover et al., 2009). Toutefois, leurs travaux ne s'étant focalisés que sur une zone ganglionnaire précise et n'ayant pas interrogé la présence d'autres peptides, on ne peut exclure la présence de certains neuropeptides chez l'homme.

Le **tableau 2** ci-dessous récapitule l'ensemble des marqueurs neuronaux ayant été observés au sein des neurones intracardiaques.

Phénotype	Marqueur	Espèce
Cholinergique		
	ChAT	(Toutes les espèces)
	VAChT	
Catécholaminergique		
	TH	(homme ; lapin ; rat ; souris ; cobaye ; singe)
	DBH	(rat ; souris)
	PNMT	(rat)
	VMAT2	(homme, singe)
Nitrergique		
	nNOS	(homme ; porc ; lapin ; rat ; cobaye)
	NADPH-Diaphorase	(souris)
Glutamatergique		
	Glutaminase	(rat)
	VGLUT1	(rat)
	VGLUT2	(rat)
Neuropeptides		
	NPY	(rat ; cobaye)
	VIP	(rat ; cobaye)
	CART	(rat ; cobaye)
	Substance P	(cobaye)
	Somatostatine	(cobaye)
	Dynorphine B	(cobaye)
	PACAP	(cobaye)

Tableau 2 : Liste des marqueurs neuronaux exprimés par les neurones cardiaques.

Nature neurochimique des inputs synaptiques reçus par les neurones intracardiaques

Ces études immunohistochimiques ont également permis de mettre en évidence que ces neurones intracardiaques reçoivent de nombreux inputs synaptiques, soit de la part d'autres neurones cardiaques mais également de la part de neurones localisés à distance de cet organe. Au-delà des inputs médiés par les neurones parasympathiques préganglionnaires, ces neurones cardiaques recevraient notamment des inputs synaptiques de la part des neurones sympathiques et des neurones sensoriels extracardiaques. La **figure 11** ci-dessous permet d'observer la densité importante de ces inputs entourant les neurones intracardiaques.

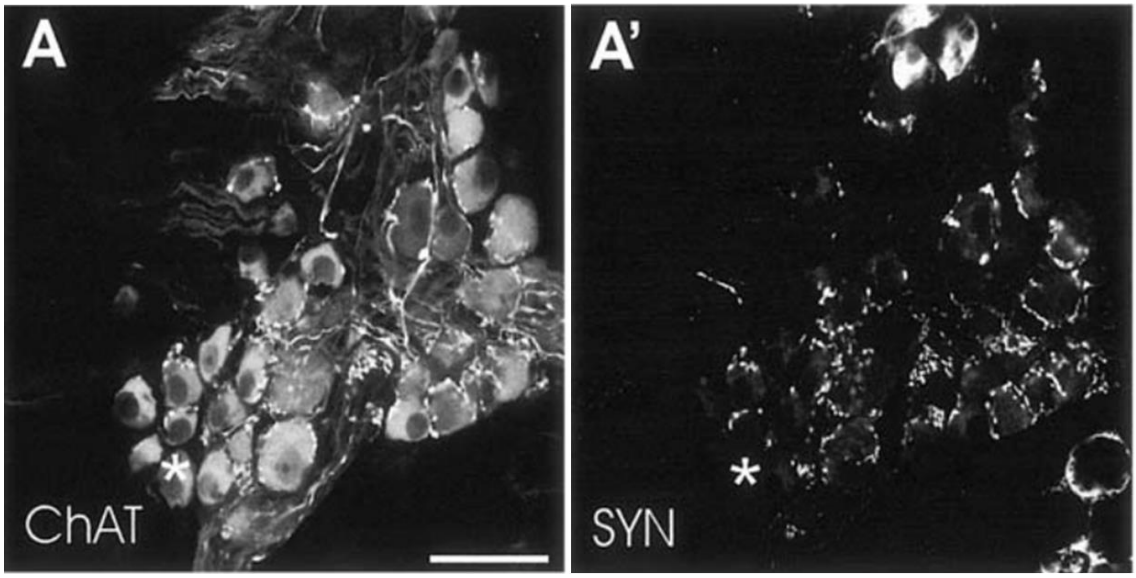


Figure 11 : Les neurones intracardiaques reçoivent de nombreux inputs synaptiques. La synaptophysine (SYN) est un marqueur de vésicules synaptiques et permet d'identifier les terminaisons nerveuses connectées aux neurones cardiaques identifiés par la ChAT. Bien que la grande majorité des neurones reçoivent des inputs synaptiques, il semble que certains corps cellulaires en soient dépourvus. Un exemple de corps cellulaire dénué de varicosités immunoréactives pour la SYN est montré par l'astérisque. Modifié d'après Richardson et al. 2003.

Les neurones cardiaques reçoivent de nombreux inputs nitrergiques identifiables par la présence de varicosités périsomatiques immunoréactives pour la nNOS (Klimaschewski et al., 1992; Tanaka and Chiba, 1998; Calupca et al., 2000a). Les groupes de Tanaka et Calupca ont démontré par l'intermédiaire de deux approches différentes que ces inputs nitrergiques possédaient une origine extracardiaque vagale. En revanche, alors que Tanaka et collaborateurs proposent que ces fibres proviennent des neurones parasympathiques préganglionnaires, le groupe de Calupca suggère que ces fibres correspondent aux afférences sensorielles issues des ganglions inférieurs du nerf vague (Tanaka and Chiba, 1998; Calupca et al., 2000a).

Plusieurs études ont également rapporté la présence d'inputs synaptiques immunoréactifs pour la substance P et le CGRP au niveau du corps cellulaire des neurones intracardiaques (**figure 12**) (Hoover et al., 2009; Rysevaite et al., 2011b; Li et al., 2014)**.** La substance P et le CGRP constituent généralement des marqueurs d'afférences sensorielles, tant au niveau spinal que vagal (Lundberg et al., 1985; Dalsgaard et al., 1986; Corbett et al., 2005). Dans le cœur, la substance P a par exemple été localisée dans des fibres sensorielles provenant des ganglions inférieurs du nerf vague (Tay and Wong, 1997) ainsi que des DRG (Papka and Urban, 1987; Hoover et al., 2008). Les inputs immunoréactifs pour la substance P et le CGRP n'exprimant pas de marqueur cholinergique (Hoover et al., 2008) et la plupart des études ayant démontré l'absence de ces deux peptides dans les neurones intracardiaques (Richardson et

al., 2003; Hoover et al., 2009; Rysevaite et al., 2011b), il est donc très probable que ces inputs peptidergiques proviennent des afférences sensorielles extracardiaques localisées au niveau des DRG et des ganglions inférieurs du nerf vague.

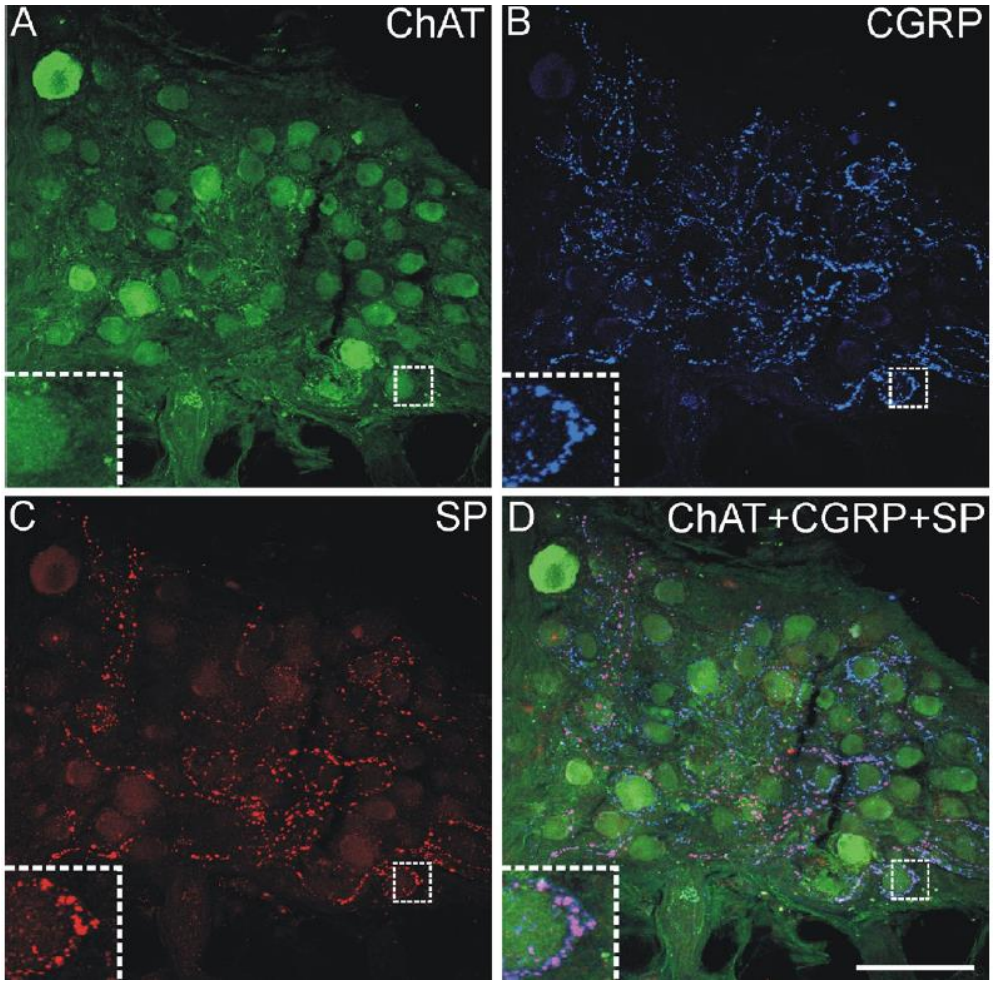


Figure 12 : Inputs synaptiques exprimant les neuropeptides substance P et CGRP. Les peptides substance P (SP) et CGRP sont co-localisés dans des varicosités entourant certains neurones intracardiaques de l'homme. Modifié d'après Hoover et al. 2009.

Les inputs synaptiques entourant les neurones cardiaques sont également caractérisés par l'expression d'autres neuropeptides tels que le PACAP, le VIP et la somatostatine. Chez le rat et le cobaye, la grande majorité des neurones apparaissent entourés de varicosités immunoréactives pour PACAP et ChAT (Calupca et al., 2000b; Richardson et al., 2003; Parsons et al., 2006). Au vu de l'abondance et de la nature cholinergique de ces terminaisons nerveuses, ces auteurs suggèrent que ces fibres pourraient provenir des neurones parasympathiques préganglionnaires et ce malgré leur incapacité à détecter PACAP dans les noyaux du tronc cérébral regroupant les corps cellulaires des neurones parasympathiques (Richardson et al., 2003). Calupca et collaborateurs ont en revanche détecté l'ARNm du précurseur du PACAP dans ces mêmes noyaux.

Il est fortement probable que les inputs synaptiques exprimant le VIP possèdent également une origine parasympathique. Le VIP est en effet connu pour être co-libéré avec l'acétylcholine au sein du système nerveux autonome (Forssmann et al., 1988). De plus il a été montré que cette innervation VIP n'était ni impactée par la sympathectomie ni par l'injection de capsaïcine, connue pour conduire à la dégénérescence des afférences sensorielles (Kuncová et al., 2003). On ne peut en revanche pas exclure que ces fibres possèdent aussi une origine intracardiaque puisque certaines études ont rapporté sa présence dans les neurones cardiaques de certaines espèces (Kuncová et al., 2003; Parsons et al., 2006). Bien que certains travaux suggèrent l'origine parasympathique des fibres VIP, ce peptide semble provenir de fibres anatomiquement différentes de celles du PACAP puisque les approches de co-marquage ne montrent pas de co-localisation VIP/PACAP (**figure 13**). Parsons et collaborateurs ont par ailleurs observé l'expression de nNOS dans les fibres VIP et proposent donc que ces inputs VIP correspondent à des afférences vagales (**figure 13**) (Parsons et al., 2006).

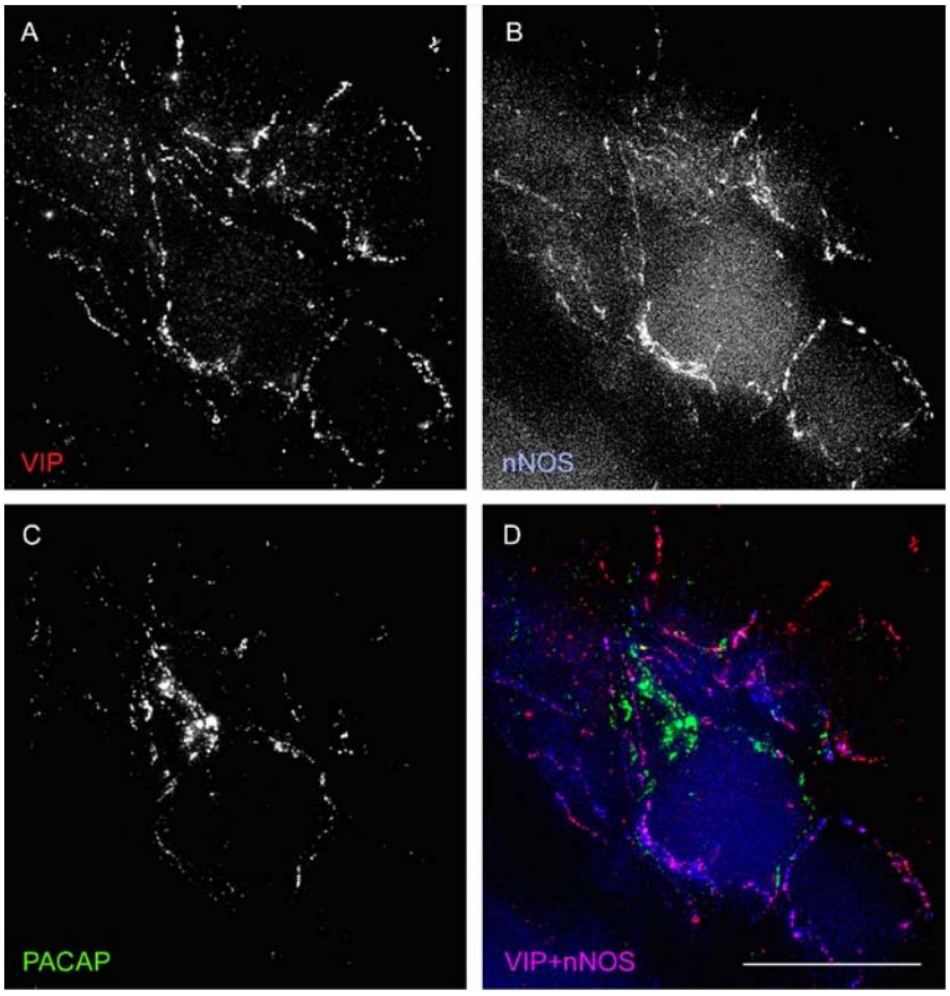


Figure 13 : Nature neurochimique des inputs synaptiques chez le cobaye. Les inputs VIP co-expriment nNOS tandis que les inputs PACAP semblent provenir de fibres différentes. D'après Parsons et al. 2006.

Chez le rat, le groupe de Richardson a montré que 10 % des neurones intracardiaques sont entourés d'inputs synaptiques immunoréactifs pour la somatostatine (Richardson et al., 2006). Contrairement aux autres marqueurs précédemment décrits, ces inputs ne sont jamais retrouvés en dehors des zones ganglionnaires (muscles et vaisseaux cardiaques) ce qui suggère que ces fibres nerveuses sont exclusivement impliquées dans la modulation des neurones intracardiaques. L'absence d'expression de la somatostatine par les neurones intracardiaques implique que ces inputs possèdent une origine extracardiaque. En revanche, cette origine n'a pour le moment pas encore été expérimentalement déterminée.

Enfin, plusieurs travaux suggèrent que les neurones intracardiaques recevraient également des inputs de la part des fibres sympathiques. Le groupe de Steele rapporte notamment la présence de nombreuses varicosités synaptiques immunoréactives pour TH. Dans leur étude, les neurones intracardiaques ne semblent pas exprimer cette enzyme et la mise en culture d'explants tissulaires renfermant les ganglions cardiaques est associée à une perte de cette innervation TH, suggérant l'origine extracardiaque de ces fibres catécholaminergiques. De plus, les travaux menés par Smith et Gagliardi chez le porc et le chien respectivement, ont montré que la stimulation des nerfs sympathiques était associée à une modification de l'activité de certains neurones intracardiaques, démontrant d'autant plus que les terminaisons nerveuses sympathiques projettent sur ces neurones (Gagliardi et al., 1988; Smith, 1999).

Pour conclure, en plus des connexions intra- et inter-ganglionnaires, les neurones intracardiaques semblent donc recevoir de multiples inputs synaptiques provenant d'afférences et d'efférences extracardiaques. La mise en évidence de ces différents inputs démontrent d'autant plus que le SNIC constitue un véritable centre d'intégration local, traitant de multiples informations avec pour finalité, la modulation précise des paramètres cardiaques (Parsons, 2004).

b) Diversité fonctionnelle

Bien que très peu d'études fonctionnelles aient été menées sur les ganglions cardiaques, plusieurs travaux ont permis de démontrer que le SNIC n'est pas uniquement formé par les neurones parasympathiques post-ganglionnaires mais qu'il comporte bien différentes populations fonctionnelles de neurones.

Chez le rat, il a par exemple été démontré que seuls 41 % des neurones cardiaques reçoivent des inputs synaptiques de la part des nerfs vagues, ce qui démontre bien que le SNIC ne constitue pas seulement le relai parasympathique du système nerveux autonome (McAllen et al., 2011).

Plusieurs éléments permettent de suggérer la présence de neurones sensoriels au sein des ganglions cardiaques. Chez le chien, plusieurs travaux, initiés à la fin des années 1980, ont permis d'observer qu'un grand nombre de neurones cardiaques possédaient une activité électrique corrélée aux différentes phases du cycle cardiaque (**figure 14A**) et que cette corrélation était maintenue après élimination de toute innervation cardiaque extrinsèque (on parle alors de décentralisation cardiaque) (Gagliardi et al., 1988; Armour and Hopkins, 1990a, 1990b; Ardell et al., 1991). De plus, ces auteurs ont montré qu'après décentralisation, l'application d'une légère pression sur certaines zones du tissu cardiaque conduisait à la modulation de l'activité de certains neurones (**figure 14B**). Ceci suggère donc la présence de neurones sensoriels capables de percevoir des stimuli mécaniques. Il est fort probable que ces neurones perçoivent les différentes contraintes mécaniques du tissu cardiaque au cours des différentes phases du cycle cardiaque, ce qui expliquerait que l'activité neuronale puisse être corrélée au cycle cardiaque.

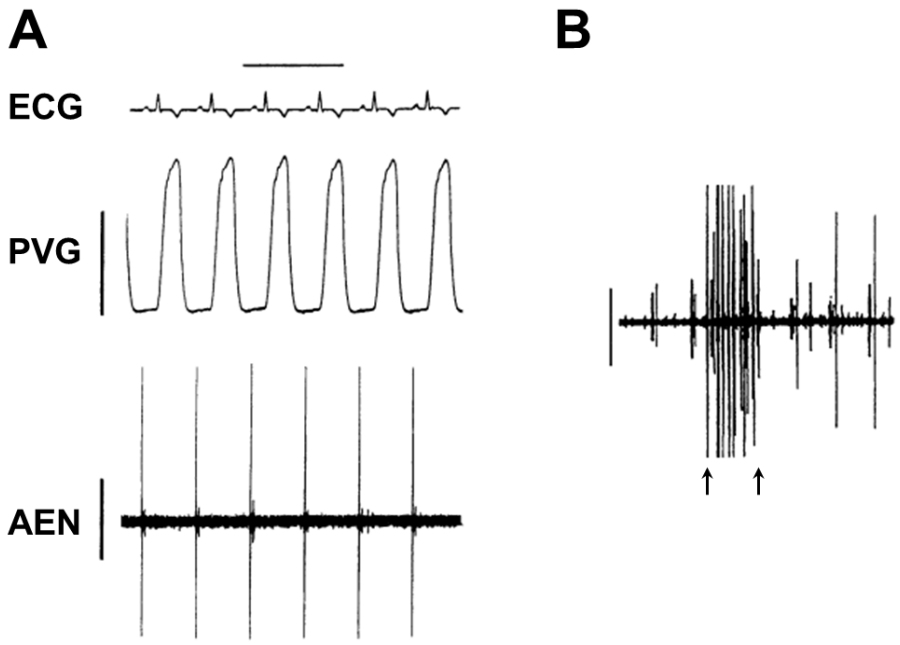


Figure 14 : Résultats expérimentaux suggérant l'existence de neurones sensoriels au sein des ganglions cardiaques. Après décentralisation cardiaque, les neurones cardiaques sont toujours capables de présenter une activité électrique corrélée au cycle cardiaque (**A**) et d'être activés par un stimuli mécanique (**B**). (**A**) Exemple d'activité neuronale corrélée au cycle cardiaque. Dans cet exemple, on peut observer que le potentiel d'action neuronal est toujours obtenu au cours de la diastole. ECG : électrocardiogramme ; PVG : pression ventriculaire gauche ; AEN : activité électrique neuronale. (**B**) L'application d'une légère pression sur le ventricule gauche (délimitée par les flèches) engendre une augmentation d'activité électrique au niveau neuronal. Résultats issus de Ardell et al. 1991.

Plus récemment, les équipes d'Armour et Ardell ont classés les neurones cardiaques en trois catégories fonctionnelles distinctes en étudiant la réactivité de ces neurones à différents stimuli cardiovasculaires. Leur approche expérimentale a consisté à enregistrer l'activité

neuronale intracardiaque basale grâce à l'utilisation de microélectrodes (MEA) et à étudier les modulations de cette activité en réponse à des stimuli sensoriels (application d'une légère pression sur certaines régions cardiaques ou occlusion des gros vaisseaux) ou à la stimulation des voies autonomes efférentes (stimulation des nerfs vagues ou des ganglions stellaires). Dans leurs travaux publiés en 2013 et en 2015 ils identifient ainsi (1) des neurones afférents, ne répondant qu'à des stimuli sensoriels (2) des neurones efférents, ne répondant qu'à la stimulation des nerfs autonomes ainsi que (3) des neurones « convergents » capables de répondre aux deux types de stimuli (**figure 15**). Cette dernière catégorie constituerait la classe fonctionnelle prédominante au sein des ganglions cardiaques. Ce sont ces neurones qui joueraient un véritable rôle intégrateur grâce au traitement de multiples informations de nature sensorielle ou motrice et qui assureraient la communication intra- et inter-ganglionnaire (Beaumont et al., 2013; Rajendran et al., 2016).

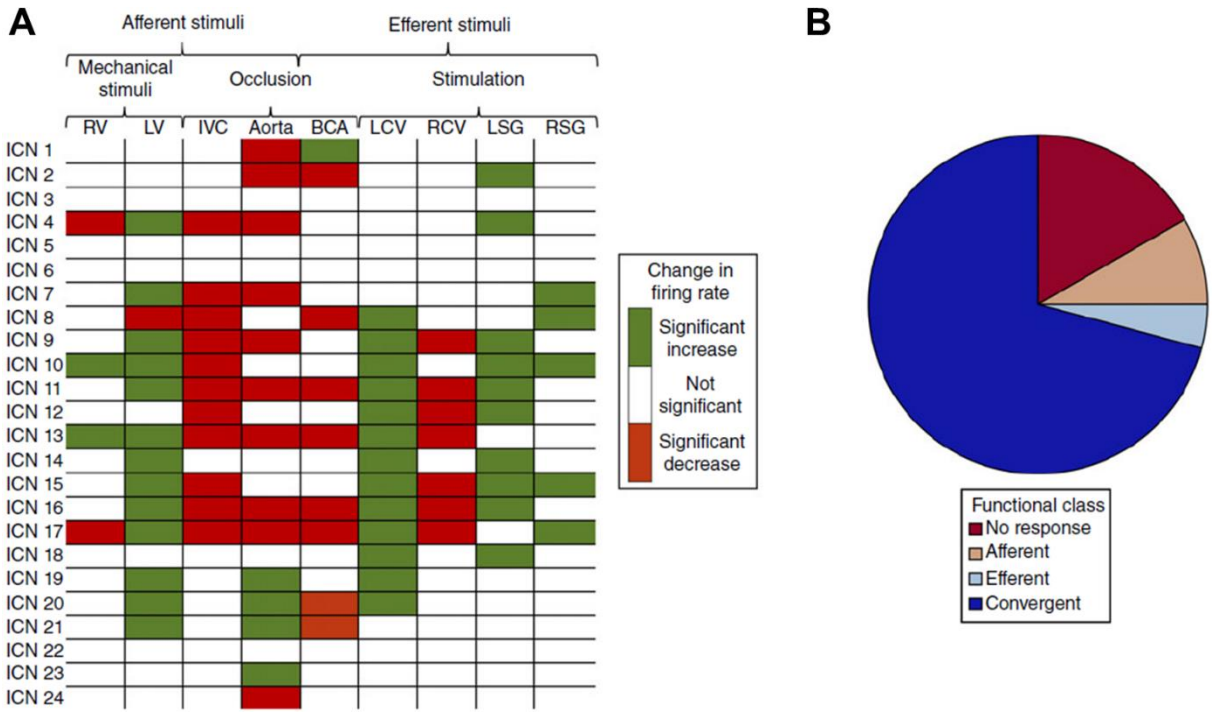


Figure 15 : Classification fonctionnelle des neurones cardiaques. (**A**) Etude de la modulation de l'activité basale des neurones cardiaques par différents stimuli cardiovasculaires. Chaque ligne représente la réponse d'un neurone à différents types de stimuli (afférents ou efférents). Une case blanche indique une absence de réponse, une case rouge indique que le stimulus se traduit par une réduction de l'activité neuronale et une case verte indique que le stimulus augmente l'activité neuronale. (**B**) Classification fonctionnelle des neurones en fonction des résultats obtenus en **A**. Les neurones ne répondant qu'aux stimuli sensoriels sont qualifiés d'afférents, ceux répondant exclusivement à la stimulation des nerfs vagues ou des ganglions stellaires sont qualifiés d'efférents et ceux capables de répondre aux deux types de stimuli sont dénommés convergents. ICN : intracardiac neuron ; RV : right ventricle ; LV : left ventricle ; IVC : inferior vena cava ; BCA : bilateral carotid arteries ; LCV : left cervical vagus ; RCV : right cervical vagus ; LSG : left stellate ganglia ; RSG : right stellate ganglia. Résultats issus de Rajendran et al. 2016.

Bien que les données fonctionnelles soient relativement restreintes, ces ganglions semblent donc bien renfermer différentes catégories de neurones que ce soit d'un point de vue phénotypique ou fonctionnel.

(ii) Les cellules non neuronales

Les structures ganglionnaires intracardiaques renferment également des cellules non neuronales parmi lesquelles les cellules satellites gliales et les cellules SIF (small intensely fluorescent). Bien que ces cellules participent probablement à la fonctionnalité des ganglions intracardiaques, leurs rôles restent encore à déterminer.

a) Les cellules gliales

Les cellules de Schwann (myélinisantes et non myélinisantes) et les cellules satellites gliales constituent les deux types de cellules gliales du système nerveux périphérique. Au sein des structures ganglionnaires, la composante gliale est principalement représentée par les cellules satellites gliales, les cellules de Schwann migrant en dehors des ganglions pour s'associer aux axones (Fregoso and Hoover, 2012; Wegner, 2017). Les cellules satellites gliales sont des cellules qui s'associent de manière très étroite avec les neurones périphériques, entourant l'ensemble de leur corps cellulaire (**figure 16**). L'étroit accolement entre les cellules satellites gliales et les neurones (un espace de 20 nm sépare la membrane neuronale de la membrane gliale) suggère que ces cellules pourraient participer à la modulation de la fonction synaptique et au contrôle de la composition du microenvironnement neuronal (Hanani, 2010; Hanani and Spray, 2020). Ces cellules ont principalement été étudiées au sein des ganglions sympathiques et des ganglions sensoriels, mais leur fonctionnalité reste encore largement incomprise.

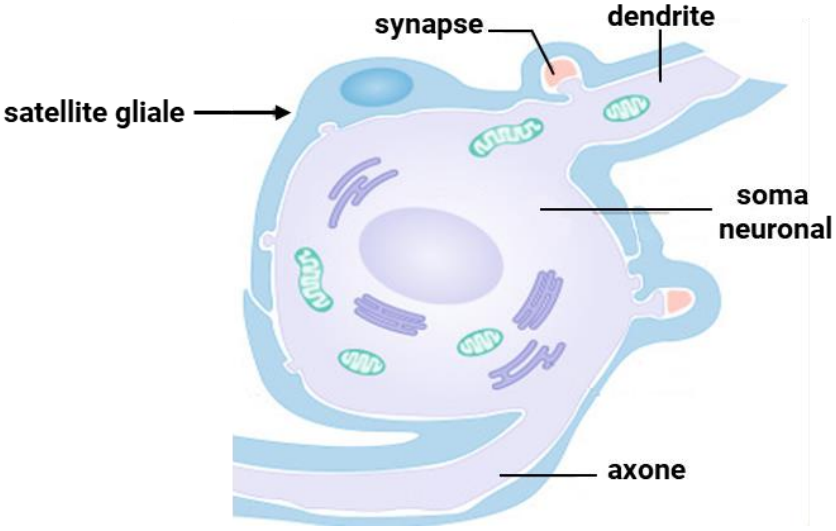


Figure 16 : Représentation schématique des interactions entre les neurones et les cellules satellites gliales. La cellule satellite gliale (bleue) entoure étroitement le corps cellulaire du neurone (violet). Modifié d'après Hanani et Spray 2020.

L'identification de ces cellules au sein des ganglions intracardiaques provient essentiellement d'études structurelles réalisées en microscopie électronique (Tay et al., 1984; Pauziene and Pauza, 2003). Tout comme les autres structures ganglionnaires périphériques, les ganglions cardiaques semblent renfermer un grand nombre de cellules satellites gliales enveloppant les corps cellulaires neuronaux. Fregoso et Hoover ont également montré que ces cellules étaient caractérisées par l'expression des marqueurs gliaux S100 et B-FABP. Chez la souris, ces cellules seraient présentes dès la naissance mais sous une forme immature n'exprimant pas S100. Elles atteindraient un stade plus mature au cours des trois premières semaines de vie, parallèlement à la maturation de l'innervation cardiaque intrinsèque (Fregoso and Hoover, 2012).

Tay et collaborateurs ont montré que la section du nerf vague était associée à une modification morphologique des cellules satellites gliales cardiaques caractérisée par une hypertrophie cellulaire associée à une augmentation du nombre de lysosomes. Ces cellules pourraient donc être activées en réponse à des lésions nerveuses et possiblement médier des évènements de phagocytose comme il l'a déjà été décrit pour les cellules de Schwann (Tay et al., 1984). Dans les ganglions sensoriels, il a notamment été montré que la lésion des nerfs s'accompagnait de l'activation des cellules satellites gliales et de la libération de facteurs agissant sur l'excitabilité neuronale (Hanani and Spray, 2020).

Au sein des ganglions sympathiques, les cellules satellites gliales expriment des récepteurs fonctionnels à l'acétylcholine, et ce neurotransmetteur participerait à la communication glie-neurone (Feldman-Goriachnik et al., 2018). L'activation du récepteur muscarinique M3 dans ces cellules est notamment associée à une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle, suggérant la participation des cellules gliales à la modulation des fonctions cardiaques (Agulhon et al., 2013; Xie et al., 2017). Ces résultats apparaissent d'autant plus intéressants dans le contexte du SNIC, dont l'acétylcholine est le neurotransmetteur prédominant.

Ces cellules seraient également capables de répondre à l'ATP libérée par les terminaisons nerveuses, participeraient aux mécanismes de recapture des neurotransmetteurs et pourraient en retour influencer les neurones via la libération de différentes substances telles que des cytokines, des neurotransmetteurs ou de l'ATP (Hanani, 2010). Ces cellules influenceraient notamment la morphologie neuronale en modulant la croissance neuritique (Koninck et al., 1993) et la taille des corps cellulaires neuronaux (Gabella et al., 1988). Enfin, au sein des DRG, de récentes études suggèrent que les cellules satellites gliales exprimeraient des marqueurs souches et pourraient conduire à la néoformation de neurones en condition pathologique (Zhang et al., 2019a). Le rôle physiologique et physiopathologique de ces

cellules gliales dans le contexte cardiaque n'a toutefois pas encore été investigué et reste entièrement à établir.

b) Les cellules SIF

Les ganglions intracardiaques renferment également de petites cellules caractérisées par une forte expression de l'enzyme TH ce qui leur a valu le nom de SIF. L'ensemble des études ayant recherché la présence de TH dans les ganglions cardiaques rapportent la présence de ces SIF (Richardson et al., 2003; Slavíková et al., 2003; Rysevaite et al., 2011b; Pauziene et al., 2016). Outre leur marquage TH très intense, ces cellules sont aussi identifiées par leur petite taille (5-10 µm) et l'absence d'expression des marqueurs neuronaux tels que la microtubule-associated protein 2 (MAP2), PGP9.5 et ChAT (**figure 17**). L'absence d'expression de la DBH suggère que ces cellules synthétiseraient la dopamine. Le groupe de Slavikova rapporte également l'expression de l'enzyme tryptophane hydroxylase, et donc leur éventuelle capacité à synthétiser la sérotonine (Slavíková et al., 2003). Bien qu'aucune quantification n'ait été réalisée, ces cellules semblent présentes en très faible nombre dans le cœur. Certains proposent que les SIF pourraient être des interneurones mais le rôle joué par ces cellules est encore largement incompris (Matthews, 1989).

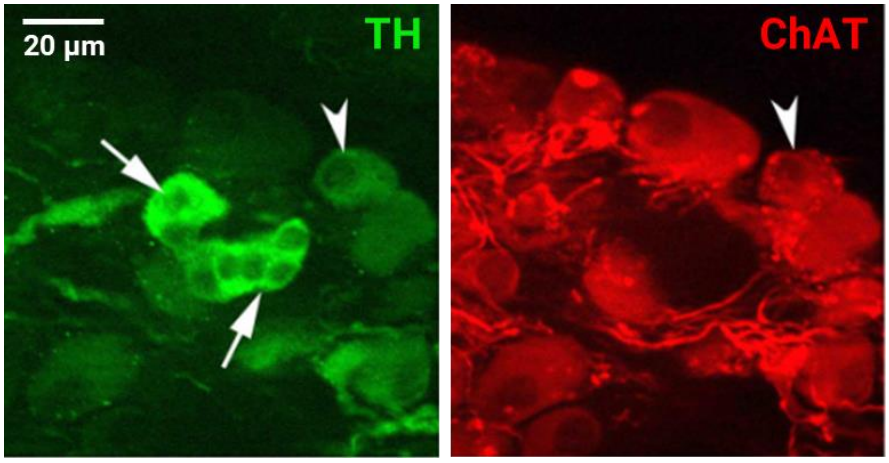


Figure 17 : Immunodétection des cellules SIF dans les ganglions cardiaques. Les cellules SIF (pointées par les flèches) sont caractérisées par un intense marquage TH et une absence d'immunoréactivité pour ChAT. A contrario, les neurones (pointe de flèche) présentent un marquage TH moins fort et sont systématiquement immunoréactifs pour ChAT. Résultats issus de Rysevaite et al. 2011.

[3]. Electrophysiologie des neurones cardiaques

Les neurones cardiaques forment également une population hétérogène en terme de comportement électrique. Les études électrophysiologiques, aussi bien menées *in vitro* qu'*in vivo,* ont ainsi révélé la présence de différentes populations neuronales présentant des potentiels d'actions ou des profils de décharge bien distincts. Cette hétérogénéité

électrophysiologique pourrait également refléter la présence de différentes populations fonctionnelles de neurones.

(i) Profils électrophysiologiques

Les neurones intracardiaques présentent des propriétés passives relativement homogènes. Selon les études, ils sont généralement caractérisés par un potentiel membranaire de repos situé entre -48 et -55 mV et au sein d'une même espèce, ce potentiel ne permet pas de discriminer différentes populations neuronales (Selyanko, 1992; Xu and Adams, 1992a; Edwards et al., 1995; Cuevas et al., 1997; Harper and Adams, 2021). Ce potentiel de repos est principalement lié à une conductance potassique, bien que les travaux de Xu et Adams (1992) rapportent la présence d'une petite conductance sodique au repos. Le chlore ne semble en revanche pas impliqué dans la détermination du potentiel de repos (Xu and Adams, 1992a). En dehors de toute stimulation, ces neurones présentent majoritairement un profil quiescent. La présence d'une activité électrique spontanée a été observée dans quelques études, se traduisant soit par de petites dépolarisations soit par des potentiels d'action mais ces comportements semblent toutefois relativement rares (Selyanko, 1992; Edwards et al., 1995; Harper and Adams, 2021).

L'hétérogénéité des neurones intracardiaques s'observent exclusivement lors de l'étude de leurs propriétés actives, et plus précisément par (1) leur capacité de décharge en potentiels d'action et (2) les caractéristiques de la phase d'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action (AHP) (**figure 18**).

Lors d'une dépolarisation membranaire prolongée, ces neurones présentent en effet deux principaux types de réponses membranaires : un profil phasique, caractérisé par l'émission d'un seul potentiel d'action en début de stimulation et un profil tonique correspondant à une activité électrique soutenue et régulière en potentiels d'action. Le profil phasique est toujours le profil prédominant au sein de la population neuronale intracardiaque. Chez le rat par exemple, il correspond à 85 % des neurones cardiaques (Xu and Adams, 1992a). Certains travaux rapportent parfois l'existence d'un troisième profil dénommé « accommodant » et correspondant à l'émission de plusieurs potentiels d'action avec une fréquence de décharge qui diminue au cours du temps (Smith, 1999; Hoard et al., 2007). Chez le porc, 40 % des neurones présentent un profil phasique, 33 % un profil accommodant et 27 % un profil tonique. Il est probable que ces différents profils de décharge soient associés à différentes catégories fonctionnelles de neurones. Le groupe de McAllen a par exemple observé que l'ensemble des neurones recevant un input vagal (neurones parasympathiques) présentaient un profil tonique tandis que les autres possédaient un profil accommodant ou phasique (McAllen et al., 2011).

Le deuxième critère de classification des neurones concerne la durée de l'AHP, les études rapportant l'existence de neurones présentant une AHP de courte ou de longue durée (Allen and Burnstock, 1987; Selyanko, 1992; Edwards et al., 1995).

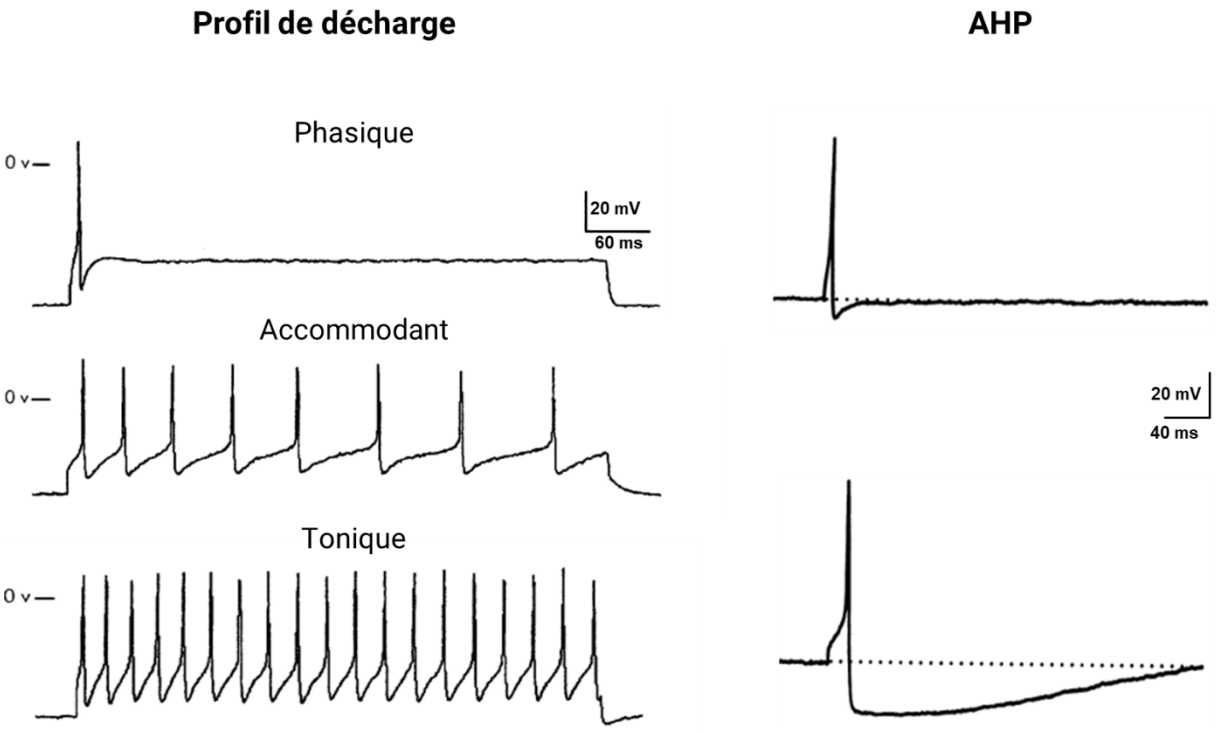


Figure 18 : Diversité des profils électrophysiologiques rencontrés chez les neurones intracardiaques. Une dépolarisation membranaire prolongée permet d'observer des neurones capables de décharger un seul potentiel d'action (phasique) ainsi que des neurones plus excitables qui déchargent de multiples potentiels d'action avec une fréquence qui diminue (accommodant) ou qui reste élevée pendant la totalité de la stimulation (tonique). Les neurones peuvent aussi se distinguer par la durée de l'AHP. Ces différents comportements électriques sous-tendent une expression différentielle de canaux ioniques de la part de ces différentes catégories de neurones. Modifié d'après Edwards et al., 1995 et Cuevas et al., 1997.

L'étude des capacités de décharge et de la durée de l'AHP a conduit à l'identification de plusieurs catégories de neurones (Ib, Im et II chez le rat ; S, R et N chez le chien, AHs, AHm et M, ou S, SAH et P chez le cobaye) (**tableau 3**).

Espèce	Type neuronal	Propriétés électrophysiologiques	Référence
Rat	Ib	AHP courte et bref burst de potentiel d'action	(Selyanko, 1992)
	Im	AHP courte et profil accomodant	
	II	AHP longue	
Chien	S	Profil phasique	(Xi et al., 1994)
	R	Profil tonique	
	N	Incapable d'initier un potentiel d'action	
Cobaye	AH_s	AHP longue et profil phasique	(Allen and Burnstock, 1987)
	AH_m	AHP longue et profil accommodant	
	M	Pas d'AHP et profil tonique	
	S	AHP courte ; profil phasique	(Edwards et al., 1995)
	SAH	AHP longue	
	P	AHP longue et présence d'I_H	

Tableau 3 : Identification de différents types neuronaux en fonction des propriétés électrophysiologiques.

Les observations d'Edwards (1995) suggèrent un lien entre les différents comportements électrophysiologiques et la fonctionnalité de ces neurones. Ils ont par exemple montré que les cellules S, caractérisées par une AHP de courte durée et un profil phasique, sont aussi remarquables par leur morphologie unipolaire, l'absence d'inputs vagaux et leur connexion avec les autres neurones cardiaques environnants. Les cellules SAH, caractérisées par une AHP de longue durée présenteraient une morphologie multipolaire et une réponse systématique à la stimulation des nerfs vagues et des nerfs intracardiaques. Enfin, les cellules P, notamment caractérisées par leur AHP de longue durée et l'expression d'Ih, présenteraient quant à elle majoritairement une morphologie pseudo-unipolaire associée à une absence totale d'input synaptique, suggérant la nature sensorielle de cette population (Edwards et al., 1995).

(ii) Canaux ioniques

Cette partie vise à décrire les différents courants ioniques responsables du comportement électrique des neurones cardiaques. Ces informations proviennent d'un nombre restreint d'études essentiellement menées dans les années 1990 et qui, de façon empirique, ont tenté de décrire les canaux ioniques en présence, principalement par des approches pharmacologiques. Très peu d'études moléculaires ont donc été conduites et la nature exacte des différents acteurs ioniques neuronaux intracardiaques reste entièrement à déterminer.

a) Les canaux sodiques voltage-dépendants

Les canaux sodiques voltage-dépendants jouent un rôle crucial pour l'activité neuronale puisqu'ils sont les principaux acteurs de la phase de dépolarisation du potentiel d'action. La

famille des canaux sodiques voltage-dépendants comprend 9 sous-unités α différentes nommées $Na_v1.1$ à $Na_v1.9$. Ces sous-unités se distinguent notamment par leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX), déterminant des canaux TTX résistants ($Na_v1.5$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$), bloqués par des concentrations élevées en TTX de l'ordre de la micromolaire et des canaux TTX sensibles, bloqués par des concentrations de l'ordre de la nanomolaire. Ces isoformes présentent également une distribution tissulaire spécifique. De manière générale et simplifiée, les isoformes $Na_v1.1$ à $Na_v1.3$ sont principalement retrouvées dans le système nerveux central ; $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont associés au système nerveux périphérique tandis que $Na_v1.6$ est autant retrouvé en central qu'en périphérie. Les isoformes $Na_v1.4$ et $Na_v1.5$ sont quant à elles abondamment exprimées par le tissu musculaire squelettique et cardiaque respectivement (de Lera Ruiz and Kraus, 2015).

Les travaux menés sur les ganglions cardiaques rapportent des résultats quelque peu contradictoires, certains n'observant que des courants TTX-sensibles (Xu and Adams, 1992b) tandis que d'autres rapportent l'existence de canaux sodiques TTX-sensibles et TTX-résistants (Xi et al., 1994; Scornik et al., 2006), ces différences pouvant s'expliquer par des variabilités inter-espèces. Les travaux de Xi et collaborateurs ont montré que les neurones phasiques et toniques ne présentaient pas la même sensibilité à la TTX, suggérant que ces deux populations neuronales n'exprimaient pas les mêmes canaux sodiques ou du moins pas dans les mêmes proportions. En effet, pour des concentrations calciques extracellulaires réduites, une concentration de 300 nM de TTX suffit à bloquer la genèse des potentiels d'actions des neurones toniques alors qu'une concentration de 1 µM est requise pour bloquer les potentiels d'action des neurones phasiques.

Chez le chien, le courant sodique voltage-dépendant est composé à 91 % d'une composante TTX-sensible et à 9 % par une composante TTX-résistante (**figure 19A**). A elle seule, cette composante résistante est capable d'initier des potentiels d'actions neuronaux puisque la perfusion d'une solution sans calcium et comprenant 300 nM de TTX se traduit par la persistance des potentiels d'action. Les travaux menés par Scornik et collaborateurs suggèrent fortement que la composante TTX-résistante serait portée par le canal $Na_v1.5$. Dans leur étude, le courant TTX-résistant présente en effet des propriétés pharmacologiques et biophysiques proches de celles décrites pour l'isoforme sodique cardiaque. Ils rapportent par exemple un IC_{50} de 1.2 µM pour la TTX, valeur très proche de celle décrite pour $Na_v1.5$ (~2 µM) et très éloignée de celles décrites pour les deux autres isoformes TTX-résistants $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ (~45 µM) (Renganathan et al., 2002). Ces résultats ont été confortés à l'échelle moléculaire par la détection de l'expression de $Na_v1.5$ par reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) et séquençage, alors que par immunohistochimie cette équipe n'a pas été capable de détecter la présence des isoformes $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$. L'expression de

$Na_v1.5$ dans les neurones intracardiaques pourrait apporter une dimension nouvelle dans la compréhension et la prise en charge des nombreuses pathologies cardiaques associées à la mutation de ce canal (e.g. syndrome du long QT, syndrome de Brugada).

Le groupe de Verkerk propose quant à lui la présence de l'isoforme $Na_v1.8$ dans les neurones intracardiaques murins. Dans ces neurones, la perfusion de l'inhibiteur A-803467, connu pour inhiber préférentiellement $Na_v1.8$, s'accompagne d'une réduction de 20 % de l'amplitude du courant sodique et d'une nette réduction des capacités de décharge en potentiel d'action (**figure 19B**) (Verkerk Arie O. et al., 2012). Toutefois, les concentrations élevées d'A-803467 utilisées dans cette étude ne peuvent exclure la participation d'autres isoformes sodiques. En effet, à 1 µM (concentration utilisée par l'équipe de Verkerk), l'A-803467 est également capable d'inhiber les isoformes $Na_v1.3$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.7$ (Jarvis et al., 2007). D'autres approches, notamment moléculaires, seraient donc nécessaire pour confirmer la présence de $Na_v1.8$ dans les neurones cardiaques.

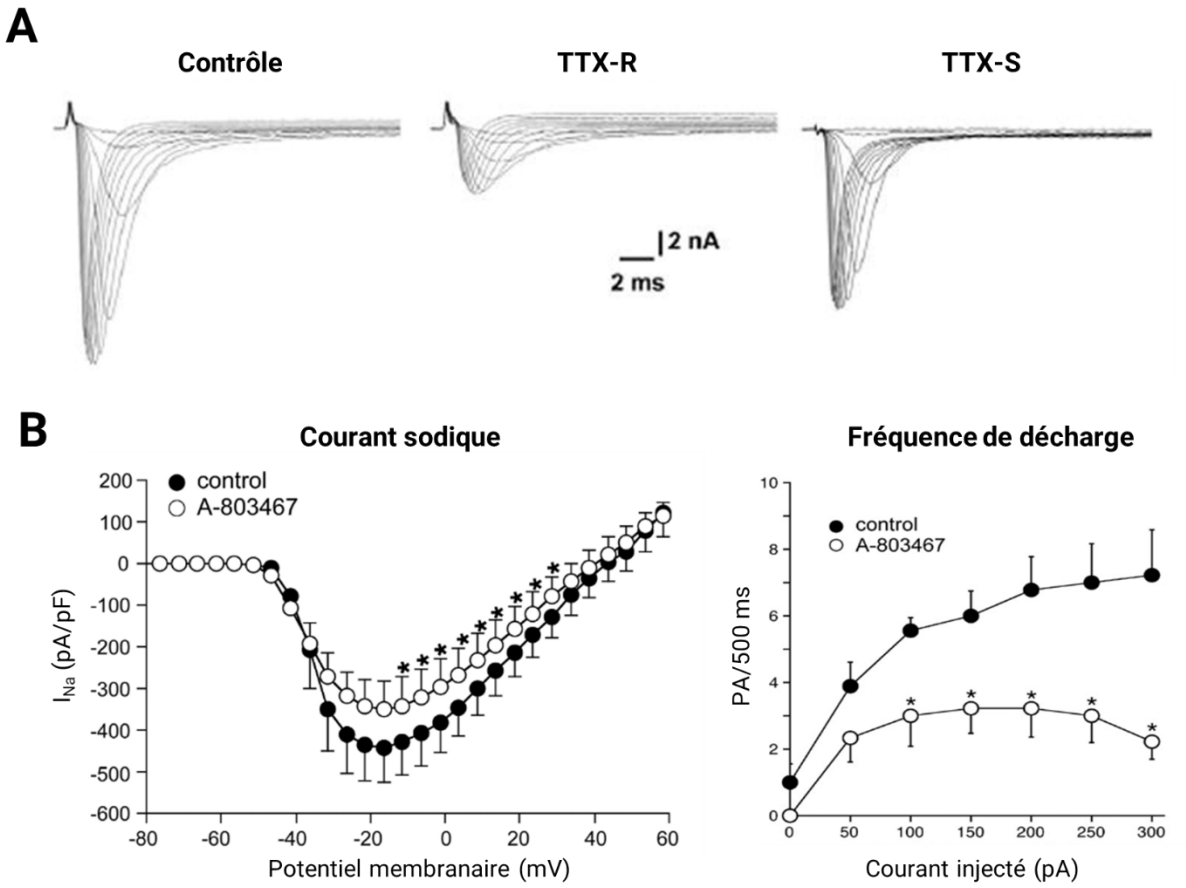


Figure 19 : Canaux sodiques neuronaux. (**A**) **:** observation de courant TTX-sensibles (TTX-S) et TTX-résistants (TTX-R) dans les neurones cardiaques du chien. (**B**) : Chez la souris, la perfusion d'A-803467 est associée à une réduction de l'amplitude du courant sodique et à une réduction des capacités de décharge suggérant la présence de l'isoforme $Na_v1.8$. Résultats issus de Scornik et al. 2006 et Verkerk et al. 2012.

Plus récemment, les transcrits codant pour les isoformes $Na_v1.3$ et $Na_v1.7$ ont été observés dans les neurones cardiaques par PCR. Ces mêmes travaux indiquent également l'absence de $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$. $Na_v1.7$ serait notamment impliqué dans la réponse excitatrice médiée par le PACAP puisque son inhibition par le PF-04856264 est associée à une réduction des effets du PACAP (Tompkins et al., 2016).

L'identité moléculaire des canaux sodiques exprimés par les neurones intracardiaques ainsi que leurs contributions relatives au comportement électrique de ces cellules restent donc encore largement à approfondir.

b) Les canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltages-dépendants (voltage-gated calcium channels, VGCC) exercent également un rôle crucial dans le contexte neuronal, participant à la phase ascendante du potentiel d'action, régulant l'excitabilité neuronale ou encore la libération des neurotransmetteurs. La famille des VGCC est composée de 5 sous-familles de canaux (type L, P/Q, R, N et T) regroupant un total de dix sous-unités alpha (Cav1.1 à Cav3.3) caractérisées par des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes. On distingue notamment des canaux calciques à haut seuil (L, P/Q, N et R) activés pour des potentiels membranaires relativement dépolarisés (~-30 mV) et des canaux calciques à bas seuil (type T) activés pour des potentiels polarisés, proche du potentiel de repos neuronal (Simms and Zamponi, 2014).

Les premiers travaux ayant étudié la nature des VGCC exprimés par les neurones cardiaques ont été conduits chez le rat et rapportent l'existence d'au moins trois courants calciques différents, tous appartenant à la catégorie des canaux à haut seuil d'activation. Xu et Adams rapportent ainsi la présence de canaux calciques de type L, identifiés par leur sensibilité à la nifédipine ainsi que de canaux calciques de type N, bloqués par l'oméga-conotoxine GVIA. La combinaison de ces deux molécules pharmacologiques n'étant pas associée à une perte totale du courant calcique, ce groupe a alors suggéré la présence, *a minima,* d'un canal calcique supplémentaire (Xu and Adams, 1992b). Ces travaux ont par la suite été complétés par le groupe de Jeong, qui par la combinaison de plusieurs molécules pharmacologiques, rapporte la présence de canaux de type L, N, Q et R respectivement responsables de 11, 63, 19 et 7 % du courant calcique global (Jeong and Wurster, 1997). En complément de cette approche pharmacologique, l'expression de ces différents canaux a par la suite été confirmée par la détection des transcrits correspondant aux sous-unités Cav1.2, Cav1.3 (type L), Cav2.1 (type Q), Cav2.2 (type N) et Cav2.3 (type R) par RT-PCR (Liu et al., 2012; Tu et al., 2014). Seul le groupe de Tompkins suggère la présence de canaux calciques à bas seuil. Par RT-PCR, ces auteurs ont en effet détecté les transcrits codant pour les sous-unités Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3. De plus, la perfusion de deux inhibiteurs spécifiques des

canaux calciques de type T, le nickel et le mibefradil, est associée à une légère polarisation membranaire suggérant que ces canaux sont fonctionnellement exprimés dans les neurones cardiaques (Tompkins et al., 2015).

Le canal calcique de type N, porté par la sous-unité Cav2.2, constitue le canal calcique prédominant au sein des neurones cardiaques. L'inhibition pharmacologique de ce courant se traduit par (1) une importante augmentation de la rhéobase (amplitude minimale de courant nécessaire pour l'initiation d'un potentiel d'action) ainsi (2) qu'une diminution de la fréquence de décharge en potentiel d'action (**figure 20**) (Liu et al., 2012). De manière similaire, la diminution de l'expression de ce canal par shRNA se traduit aussi par une réduction de l'excitabilité neuronale intracardiaque (Zhang et al., 2018). Ainsi, ce canal semble être l'un des acteurs clé déterminant l'excitabilité des neurones intracardiaques.

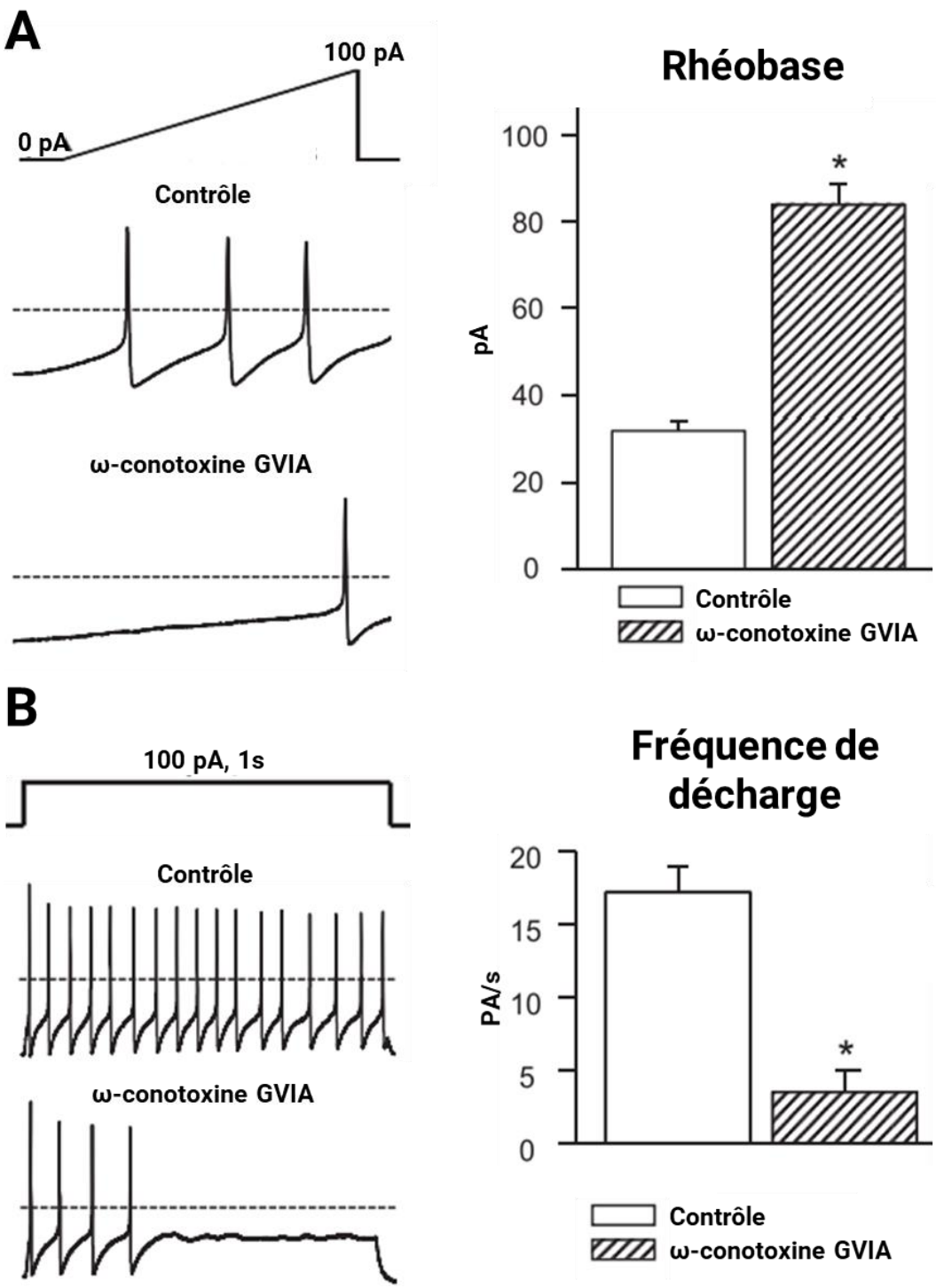


Figure 20 : Le canal calcique de type N joue un rôle crucial dans l'excitabilité des neurones intracardiaques. L'inhibition du canal calcique de type N induit une augmentation de la rhéobase **(A)** et une diminution de la fréquence de décharge en potentiels d'action **(B)**. Ces deux effets traduisent une réduction d'excitabilité neuronale. Résultats issus de Liu et al. 2012.

c) Les canaux HCN

Les canaux HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated channels) sont des canaux voltage-dépendants activés par l'hyperpolarisation membranaire et les nucléotides cycliques. Cette famille de canaux comprend quatre isoformes (HCN1-4) dont l'expression est principalement retrouvée dans le système nerveux (central et périphérique) ainsi que dans le tissu cardiaque. Ces canaux sont essentiellement perméables au sodium et au potassium et leur ouverture, qui peut survenir pour des potentiels membranaires proche du potentiel de repos neuronal, conduit ainsi à la genèse d'un courant entrant (nommé I_h chez les neurones et I_f dans les cardiomyocytes) principalement médié par les ions sodiques.

Les neurones cardiaques présentent un courant dépolarisant activé par l'hyperpolarisation et inhibé par le césium et le ZD 7288, des éléments qui ne peuvent que suggérer la présence de canaux HCN au sein de ces neurones (Edwards et al., 1995; Cuevas et al., 1997; Hogg et al., 2001; Harper and Adams, 2021). Plus récemment, les ARNm codant les sous-unités HCN2 et HCN4 ont été détectés par hybridation in situ et par PCR dans les ganglions intracardiaques de la souris (Scherschel et al., 2021). Dans les neurones cardiaques, l'inhibition du courant I_h augmente l'amplitude et la durée de l'AHP et conduit à une diminution de la fréquence de décharge en potentiel d'action (**figure 21**). Le canal HCN pourrait donc être un acteur favorisant l'excitabilité neuronale en limitant la phase d'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action. Ce canal pourrait également participer à la genèse d'une activité électrique spontanée, comme il l'a été observé chez certains neurones cardiaques du cobaye.

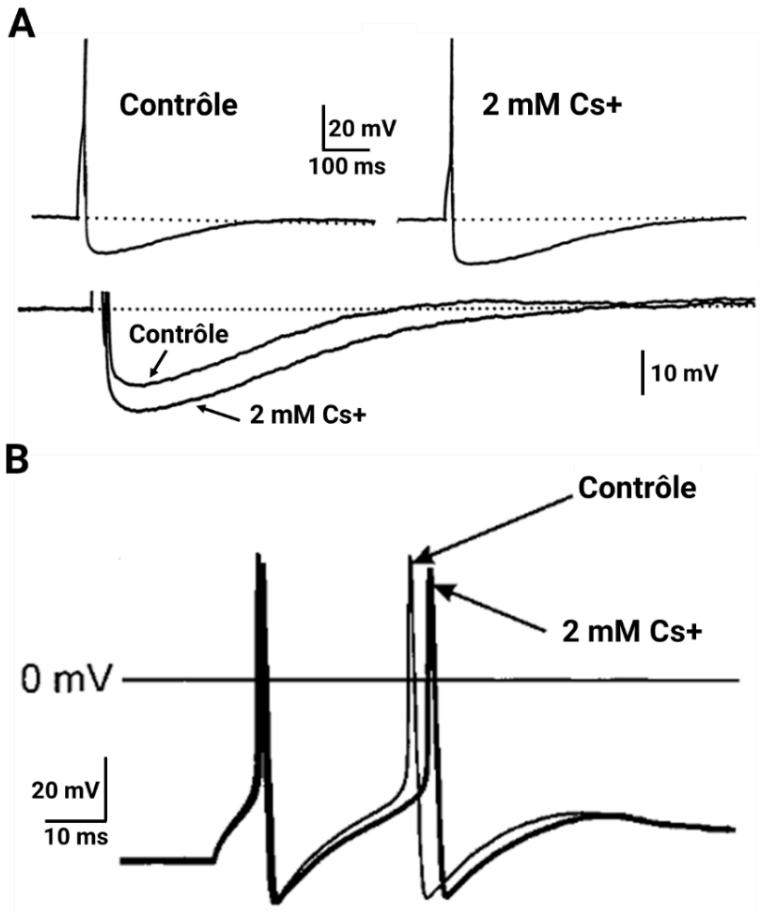


Figure 21 : Contribution du courant I_h à la phase d'AHP et à la fréquence de décharge en potentiel d'action. La perfusion de césium, inhibiteur du courant I_h, s'accompagne d'une augmentation de l'amplitude et de la durée de l'AHP (**A**) ainsi que d'un allongement de la durée séparant deux potentiels d'action (**B**). D'après Edwards et al., 1995 et Hogg et al., 2001.

d) Les canaux potassiques

Les canaux potassiques constituent de loin la famille de canaux ioniques la plus importante et la plus diversifiée. Ces canaux sont regroupés en quatre principales classes correspondant aux canaux voltage-dépendants (Kv), aux canaux activés par le calcium (KCa), aux canaux à deux domaines pore (K_{2P}) ainsi qu'aux canaux rectifiants entrants (Kir) (Humphries and Dart, 2015). Dans le contexte neuronal, ces canaux participent au potentiel de repos, à la repolarisation du potentiel d'action ainsi qu'à la phase d'AHP. Tout comme les canaux sodiques et calciques, ces canaux sont des acteurs clés définissant la durée et la fréquence de décharge des potentiels d'action et sont donc déterminants pour l'excitabilité neuronale.

Très peu d'études se sont focalisées sur l'étude des canaux potassiques exprimés par les neurones cardiaques. Xi-Moy et Dun rapportent la présence d'au moins quatre courants potassiques différents : (1) un courant potassique transitoire sortant générant un courant de type A, (2) un courant de type M, (3) un courant potassique retardé et (4) un courant dépendant du calcium (Xi-Moy and Dun, 1995). La présence de ces courants a par la suite été confirmée

par d'autres équipes (Xu and Adams, 1992a; Cuevas et al., 1997; Tompkins et al., 2016). La liste des canaux potassiques a été complétée par la suite notamment par des études démontrant l'existence de Kir et de canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP}) (Hogg and Adams, 2001; Adams et al., 2002). Ces derniers contribueraient au potentiel de repos, leur inhibition se traduisant par une dépolarisation membranaire de 3 à 5 mV.

L'existence d'une conductance potassique dépendante du calcium (KCa) a été rapportée par plusieurs études et représenterait près de 30 % du courant potassique total dans ces neurones (Selyanko, 1992; Xu and Adams, 1992a; Edwards et al., 1995). Ces canaux participent notamment à la phase d'AHP, puisque la réduction des concentrations calciques extracellulaires s'accompagne d'une diminution de l'amplitude ou de la durée de l'AHP sans modification du potentiel d'action (Xi et al., 1994; Franciolini et al., 2001). La famille des KCa est formée des canaux à petite conductance (SKCa), des canaux à conductance intermédiaire (IKCa) ainsi que des canaux de grande conductance (BKCa). Les canaux SKCa et IKCa sont uniquement activés par une augmentation des concentrations calciques intracellulaires tandis que les BKCa présentent à la fois une dépendance vis-à-vis du calcium et du potentiel membranaire. Les approches pharmacologiques et biomoléculaires ont notamment permis d'observer la présence du canal BKCa mais celui-ci semble jouer des rôles différents selon l'espèce considérée (Franciolini et al., 2001; Pérez et al., 2013; Selga et al., 2013). En effet, chez le rat l'inhibition de ce canal se traduit par une réduction de la durée de l'AHP alors que chez le chien ceci se traduit par une réduction de la fréquence de décharge en potentiel d'action sans affecter la phase d'AHP. Chez le rat, le canal SKCa a aussi été identifié et semble quant à lui à la fois impliqué dans la phase d'AHP et dans la régulation des capacités de décharge en potentiel d'action. En effet, les travaux menés par Rimmer et Harper montrent que la perfusion d'apamine, inhibiteur spécifique des SKCa, se traduit par une importante réduction de la durée de l'AHP et par une modification du profil de décharge, les neurones passant d'un profil phasique à un profil tonique (Rimmer and Harper, 2006). La contribution des KCa au comportement électrophysiologique des neurones intracardiaques semble donc faire intervenir de nombreux mécanismes différents.

(iii) Modulation des propriétés électrophysiologiques

Cette partie vise à décrire les principales voies régulant l'excitabilité des neurones intracardiaques. Ces neurones expriment en effet de nombreux récepteurs leur permettant de répondre aux substances neuroactives libérées par les inputs synaptiques qu'ils recoivent (neurotransmetteurs, neuropeptides…) mais également aux substances présentes dans l'environnement cardiaque en condition physiologique et physiopathologique.

a) Les récepteurs cholinergiques

L'acétylcholine module l'activité des neurones cardiaques tant par son action sur les récepteurs nicotiniques (nAChR), responsables d'une réponse membranaire rapide, que sur les récepteurs muscariniques, entrainant des réponses plus lentes (Hassall et al., 1987; Fieber and Adams, 1991a).

Les nAChR sont des canaux cationiques non sélectifs principalement perméables au sodium, potassium et calcium. L'activation de ces récepteurs par l'acétylcholine se traduit par l'apparition d'un courant entrant qui dépolarise les neurones cardiaques. Au sein du système nerveux autonome, ces récepteurs permettent la transmission rapide du signal nerveux entre le neurone pré- et le neurone post-ganglionnaire. Les neurones intracardiaques expriment différentes combinaisons de nAChR comprenant les sous-unités α2, α3, α7, β2 et β4 (Poth et al., 1997; Cuevas and Berg, 1998). Ces différentes combinaisons confèrent des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes aux nAChR. Par exemple, la présence de la sous-unité α7 est associée à une perméabilité beaucoup plus importante pour le calcium.

En plus des nAChR, les neurones cardiaques expriment plusieurs sous-types de récepteurs muscariniques à l'acétylcholine. Les ARNm codant pour les récepteurs muscariniques M1 à M4 ont notamment été détectés par hybridation *in situ* chez le rat et le cobaye (Hassall et al., 1993; Hoover et al., 1994). L'activation des récepteurs muscariniques conduit à de multiples voies de signalisation et à la régulation de l'activité de plusieurs canaux ioniques exprimés par les neurones cardiaques. Selon le récepteur activé et le canal cible régulé, les agonistes muscariniques peuvent donc aussi bien médier des réponses excitatrices que des réponses inhibitrices (**figure 22**). Chez le cobaye par exemple, la stimulation des récepteurs M1 conduit à l'inhibition du courant potassique de type M et donc à une dépolarisation membranaire. En revanche, dans ces mêmes cellules, l'activation des récepteurs muscariniques négativement couplés à l'adénylate cyclase (M2 ou M4) se traduirait par l'augmentation d'une conductance potassique à l'origine d'une hyperpolarisation membranaire (Allen and Burnstock, 1990a). Chez le rat, l'inhibition du courant de type M médiée par l'activation des récepteurs M1 est associée à une forte augmentation des capacités de décharge en potentiel d'action (Cuevas et al., 1997), tandis que l'activation des récepteurs M4 est quant à elle associée à une inhibition des VGCC. La perfusion de 100 µM d'acétylcholine se traduit en effet par une réduction de près de 75 % du courant calcique voltage-dépendant. Cette inhibition passerait par des mécanismes voltage-dépendants (décalage de la courbe d'activation) et indépendants (Cuevas and Adams, 1997). En considérant les fonctions clés assurées par ces canaux (**voir chapitre 2, section [3]b**), cette voie de signalisation pourrait donc possiblement impacter l'excitabilité neuronale et/ou la libération des neurotransmetteurs.

Plus récemment, le groupe de Hirayama a mis en évidence une autre voie de signalisation pouvant expliquer les effets excitateurs médiés par les récepteurs muscariniques. Leurs travaux suggèrent en effet que la stimulation de la voie de la PLC par les récepteurs M1 et M3 conduirait à l'activation d'un canal cationique non sélectif pouvant appartenir à la famille des TRPC (canonical transient receptor potential). Cette activation serait dépendante des libérations calciques médiées par les récepteurs à l'inositol trisphosphate (IP3) et de la calmoduline (Hirayama et al., 2015).

La figure 22 récapitule les différentes voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'excitabilité des neurones intracardiaques par l'acétylcholine.

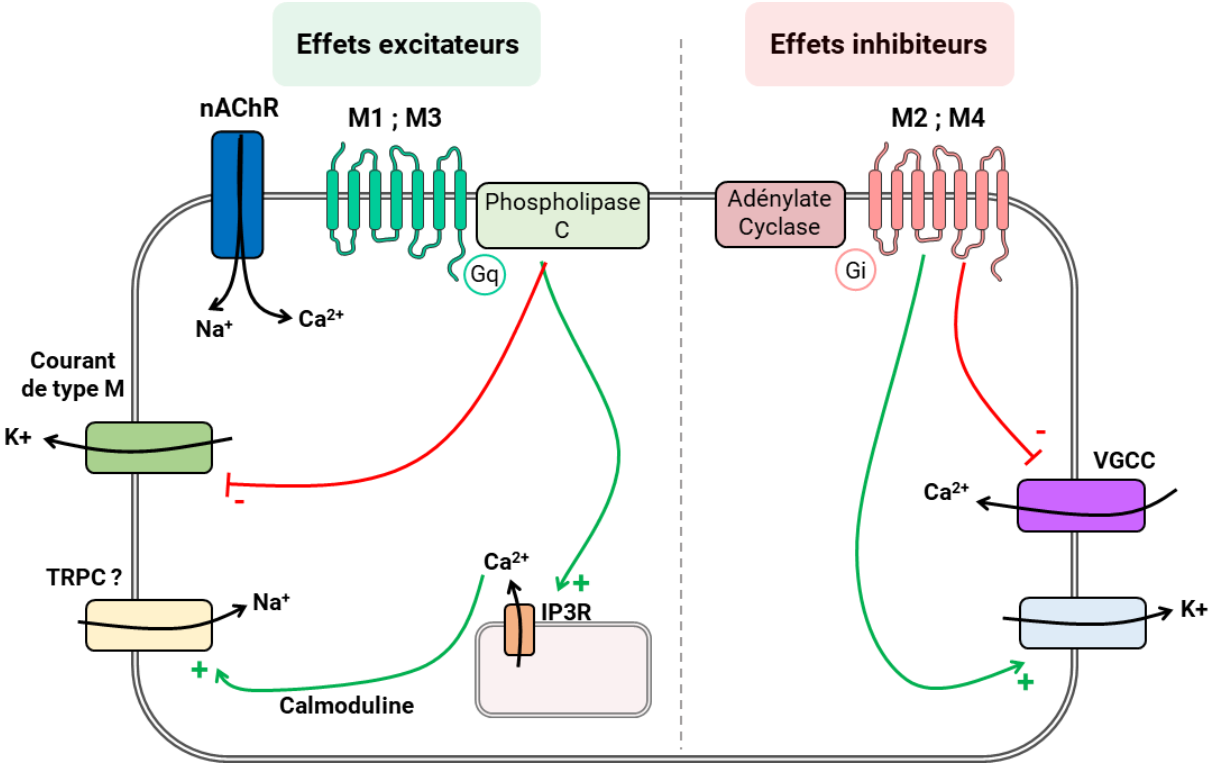


Figure 22 : Neuro-modulation cholinergique des neurones intracardiaques. L'activation des récepteurs à l'acétylcholine peut conduire à des effets excitateurs ou inhibiteurs. L'activation des nAChR se traduit par une entrée de sodium et de calcium dépolarisant le neurone. L'activation des récepteurs muscariniques M1 et M3 et de la voie de la phospholipase C est associée à des effets excitateurs médiés par l'inhibition du courant potassique de type M et l'activation d'un canal cationique. A contrario, l'activation des récepteurs M2 et M4 est associée à des effets inhibiteurs découlant de l'inhibition des VGCC et de l'activation d'une conductance potassique.

b) Les récepteurs adrénergiques

Tout comme l'acétylcholine, la noradrénaline est capable de médier des actions excitatrices ou inhibitrices envers les neurones cardiaques, reflétant la mise en jeu de différentes voies de signalisation. Chez le cobaye, la perfusion de noradrénaline induit une réponse membranaire dans 70 % des neurones se caractérisant soit par une hyperpolarisation (60 %) soit par une

dépolarisation de la membrane (40 %). De même, lors d'une dépolarisation membranaire prolongée, la perfusion de noradrénaline est associée à une augmentation des capacités de décharge en potentiel d'action (Girasole et al., 2011).

Les premiers travaux ayant observé l'impact de la noradrénaline sur l'excitabilité des neurones cardiaques ont été réalisés par l'équipe de Xu et Adams en 1993. Dans leurs conditions, l'activation des récepteurs α-adrénergiques conduit à l'inhibition des VGCC. Pour une concentration en noradrénaline de 100 µM, cette inhibition parait maximale et se traduit par une réduction de 60 % du pic du courant calcique. Cette inhibition concernerait principalement les canaux calciques de type N et serait sous la dépendance d'une protéine Gi, suggérant l'implication des récepteurs α2 (Xu and Adams, 1993). Ces résultats ont également été observés par l'équipe de Jeong quelques années plus tard (Jeong et al., 1999).

L'activation des récepteurs α1 serait quant à elle associée à des effets excitateurs. De manière similaire à ce qui a été observé pour les récepteurs muscariniques, l'activation de ces récepteurs et donc de la voie de la PLC se traduirait par l'activation d'un courant cationique non sélectif pouvant appartenir à la famille des TRPC. Cette activation serait également dépendante des libérations calciques réticulaires médiées par les récepteurs à l'IP3 ainsi que de la calmoduline (Ishibashi et al., 2003).

Chez le cobaye, des expériences d'immunohistochimie ont suggéré la présence des récepteurs β2 au sein des ganglions intracardiaques (Haberberger and Kummer, 1996). Les travaux menés par les équipes d'Armour puis par Girasole mentionnent en effet que la perfusion d'agonistes β-adrénergiques (β1 ou β2) s'accompagne de la modulation de l'activité de certains neurones intracardiaques (Armour, 1997; Girasole et al., 2011). En revanche, à notre connaissance, les cibles moléculaires des voies β-adrénergiques restent encore à déterminer.

c) Les récepteurs purinergiques

Les neurones cardiaques peuvent être modulés par l'ATP puisqu'ils expriment les récepteurs purinergiques de type P2X et P2Y. Cette sensibilité à l'ATP n'est pas retrouvée dans l'ensemble de la population neuronale intracardiaque mais concernerait tout de même entre 64 % et 75 % des neurones (Allen and Burnstock, 1990b; Fieber and Adams, 1991b; Ma et al., 2005). Chez ces neurones, la perfusion d'ATP s'accompagne soit (1) d'une dépolarisation membranaire rapide et transitoire, (2) d'une dépolarisation suivie d'une hyperpolarisation ou (3) d'une dépolarisation prolongée, ce qui reflète la mise en jeu de différents sous-type de récepteurs purinergiques (**figure 23**).

Les récepteurs P2X sont des canaux cationiques formés par l'association de 3 sous-unités $P2X_{(1-7)}$ et dont l'ouverture génère un courant entrant dépolarisant. L'activation de ces récepteurs est donc associée à une réponse membranaire excitatrice rapide. Au sein des neurones cardiaques, les sous-unités $P2X_2$, $P2X_4$ et $P2X_6$ semblent impliquées dans la formation de ces canaux avec une nette prédominance de la sous-unité $P2X_2$.

Les récepteurs P2Y appartiennent quant à eux à la famille des RCPG et leur activation conduit à la stimulation de la voie de la PLC. Au sein des neurones cardiaques, l'activation du récepteur $P2Y_2$ se traduit par une augmentation des concentrations calciques intracellulaires suite à l'activation des récepteurs à l'IP3, et par l'augmentation d'une conductance potassique, probablement médiée par un KCa (Liu et al., 2000) (**figure 23**). L'activation de ce canal potassique permet d'expliquer que la perfusion d'ATP s'accompagne d'une hyperpolarisation membranaire dans près de 30 % des neurones.

Au sein du cœur, l'ATP peut provenir de multiples types cellulaires et faire intervenir de nombreux mécanismes de libération différents (libérations synaptiques, sécrétion, mort cellulaire…). L'ATP est notamment libérée par de nombreuses terminaisons nerveuses où elle agit en tant que co-transmetteur. Au niveau cardiaque, les terminaisons nerveuses sympathiques sont capables de co-libérer l'ATP avec la noradrénaline et le NPY. De même, les fibres sensorielles issues des DRG peuvent libérer ce co-transmetteur avec le CGRP et la substance P. La mobilisation des voies de signalisation purinergiques peut également résulter de libérations non synaptiques d'ATP, notamment au niveau vasculaire où les cellules endothéliales ainsi que certaines cellules circulantes sont connues pour sécréter de l'ATP, ou tout simplement découler d'évènements de mort cellulaire (Burnstock, 2017). La **figure 23** récapitule les différentes voies de signalisation médiées par l'ATP au sein des neurones cardiaques.

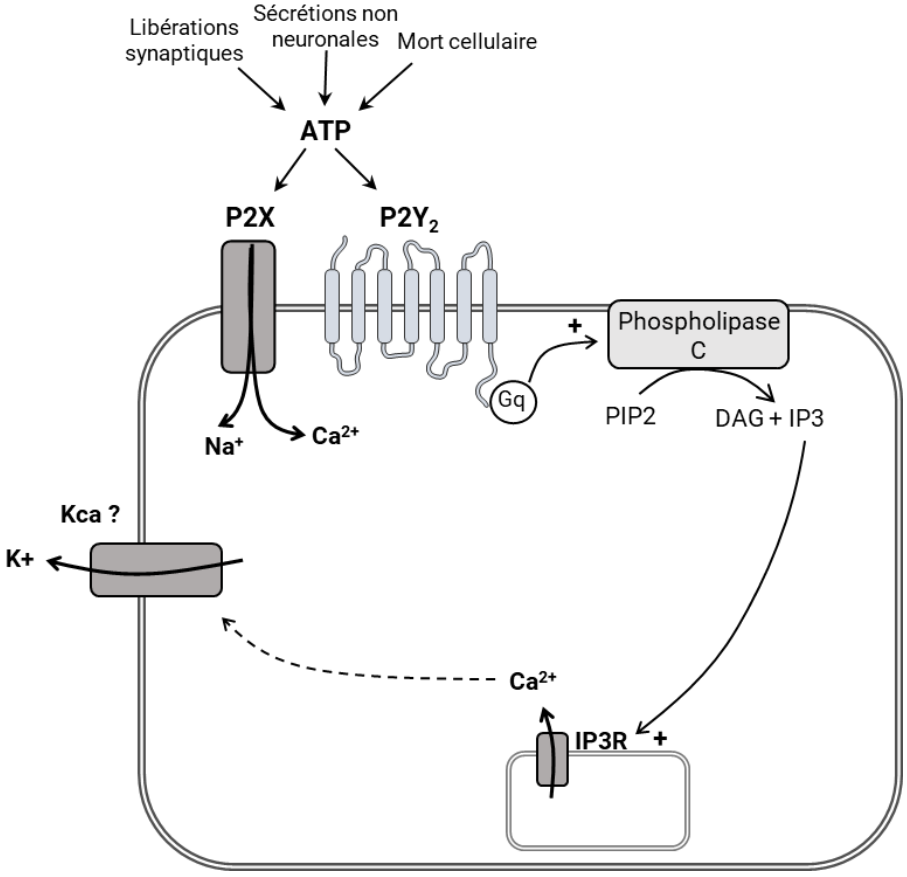


Figure 23 : Schéma représentant les voies de signalisation médiées par l'ATP au sein des neurones cardiaques.

d) Modulation par la bradykinine

En 2019, les travaux menés par le groupe de Arichi ont montré que les neurones cardiaques présentaient une réponse membranaire excitatrice caractérisée par une dépolarisation membranaire et des trains de potentiel d'action en réponse à la perfusion de BK (**figure 24A**) (Arichi et al., 2019).

La BK est un peptide de 9 acides aminés libéré à partir du clivage d'un peptide précurseur par les enzymes kallicréines en réponse à de multiples stimuli physiologiques et pathologiques. La BK est capable d'activer deux types de RCPG (B1 et B2), principalement connus pour être couplés à une protéine Gq (Couture et al., 2001).

Au sein des neurones cardiaques, les effets excitateurs de la BK apparaissent médiés par l'activation du récepteur B2 et l'activation de la voie de la PLC. Dans ces cellules, les auteurs montrent que l'activation de cette voie résulte en (1) l'inhibition du courant de type M, probablement suite à la déplétion des stocks de phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2), et (2) à l'activation d'un canal TRPC (TRPC5 et/ou TRPC6) médiée par des libérations calciques IP3-dépendantes (**figure 24B**). A lui seul, l'inhibition du courant de type M ne suffit pas à expliquer les effets excitateurs de la BK puisque ces effets perdurent en présence de XE-991,

inhibiteur spécifique de ce courant. En revanche, la dépolarisation induite par la BK apparait fortement impactée par la perfusion préalable de ML204, inhibiteur des canaux TRPC5 et TRPC6. Le courant entrant généré par l'activation de ces canaux semblent donc expliquer pour une large part les effets excitateurs de la BK.

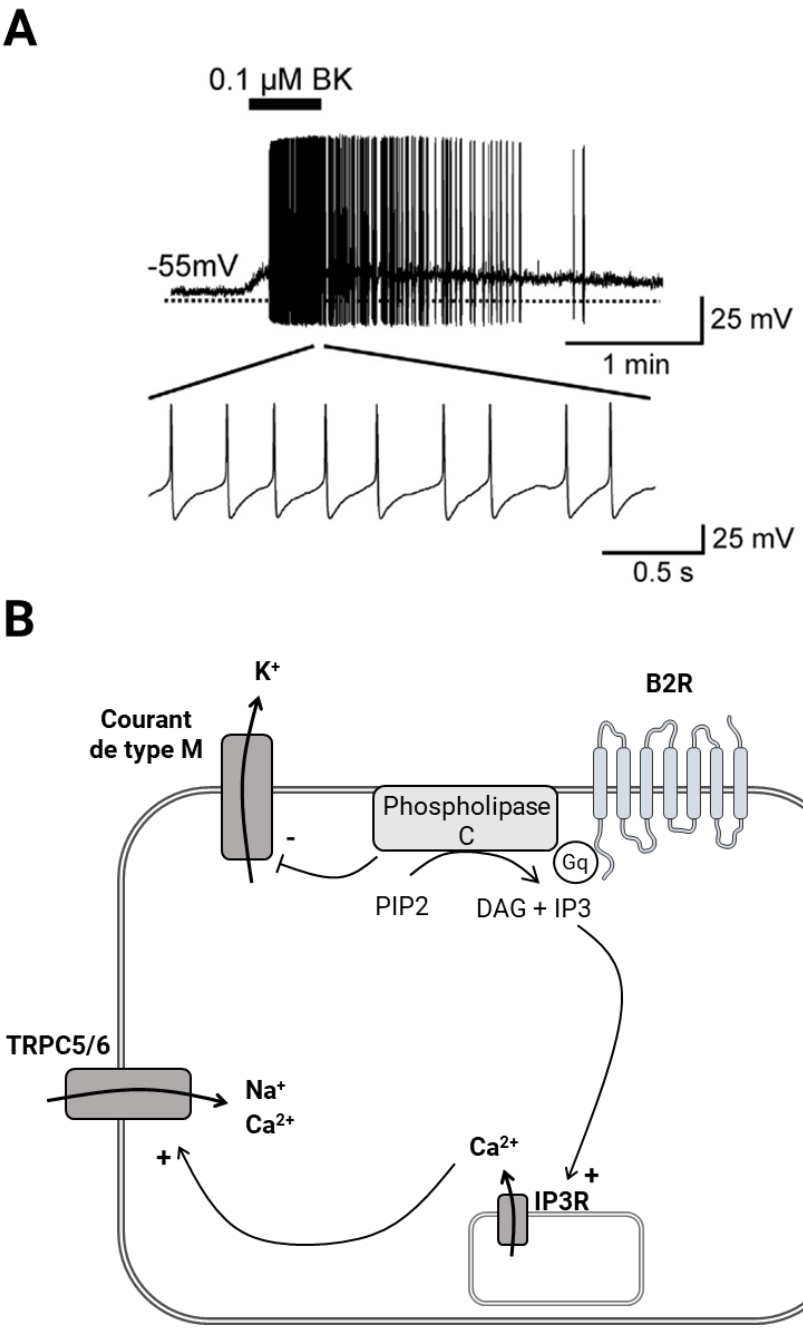


Figure 24 : Actions de la bradykinine sur les neurones cardiaques. (**A**) La perfusion de bradykinine (BK) conduit à une dépolarisation membranaire et à la survenue de trains de potentiels d'action. Ces résultats sont issus des travaux de Arichi et al. 2019 (**B**) Schéma récapitulant les voies de signalisations associées à l'effet excitateur de la BK. B2R : Récepteur B2 de la BK ; PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate ; DAG : diacylglycérol ; IP3 : inositol trisphosphate ; IP3R : récepteur de l'IP3.

Plusieurs études ont démontré que l'ischémie myocardique était associée à une augmentation de BK et que, dans ce contexte, ce peptide jouait un rôle cardioprotecteur. Parmi ces effets cardioprotecteurs, il a notamment été observé que l'injection de BK était associée à une réduction de la sévérité des arythmies déclenchées par l'ischémie (Parratt et al., 1995). L'innervation cardiaque jouant un rôle certain dans la survenue, l'entretien ou encore la prévention des arythmies, on peut donc supposer qu'une partie des effets cardioprotecteurs de la BK puisse découler de son action sur les neurones intracardiaques.

e) Modulation par les neuropeptides : PACAP, VIP, substance P

Les neuropeptides libérés par les terminaisons nerveuses participent également à la régulation de l'excitabilité des neurones cardiaques. Ces neurones apparaissent notamment régulés par la substance P, le VIP ainsi que le PACAP.

La substance P est un neuropeptide de 11 acides aminés appartenant à la famille des tachykinines. Ces tachykinines sont capables de conduire à de multiples voies de signalisation en interagissant avec trois types de RCPG, les récepteurs des neurokinines (NK1 à NK3). Les neurones cardiaques expriment les récepteurs NK1, NK2 et NK3 et l'activation de ces différents récepteurs par des agonistes spécifiques est associée à une modification de l'activité neuronale *in situ* (Armour et al., 1993; Thompson et al., 1998). Chez le cobaye, l'application de substance P conduit systématiquement à une dépolarisation membranaire et celle-ci s'accompagne de trains de potentiels d'action dans près de la moitié des neurones. Dans certains neurones, la perfusion de substance P est également associée à une augmentation des capacités de décharge en potentiels d'action en réponse à l'injection d'un courant dépolarisant ce qui suggère que ce neuropeptide est capable d'augmenter l'excitabilité neuronale (Hardwick et al., 1995, 1997; Zhang et al., 2001). L'utilisation d'antagonistes spécifiques des différents sous-types de récepteurs NK suggère que ces effets excitateurs découleraient principalement de l'activation du récepteur NK3. En voltage-clamp, la substance P induit l'activation d'un courant cationique non sélectif pouvant appartenir à la famille des TRP. En revanche, les voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'activation de ce canal n'ont pas été investiguées en détail (Hardwick et al., 1997).

La substance P est également capable de moduler la réponse nicotinique des neurones. En effet, chez le rat, la perfusion de substance P s'accompagne d'une réduction de 70 % de l'amplitude du courant médié par les nAChR tandis que chez le cobaye ce neuropeptide potentialise la réponse membranaire nicotinique (Cuevas and Adams, 2000; Zhang et al., 2001, 2005). L'inhibition de la réponse nicotinique apparait toutefois indépendante de l'activation des récepteurs NK et serait principalement liée à une interaction directe entre la

substance P et les nAChR. Les mécanismes expliquant la potentialisation de la réponse cholinergique par la substance P n'ont pas été investigués mais on peut résolument supposer que l'inhibition du courant de type M et l'activation du canal TRPC médiées par la substance P participent à cette modulation de la réponse cholinergique.

Le PACAP et le VIP sont des peptides structurellement analogues appartenant à la même famille. La perfusion de chacun de ces deux peptides conduit à une réponse membranaire excitatrice se traduisant par une dépolarisation membranaire (VIP et PACAP) ainsi qu'une augmentation des capacités de décharge en potentiels d'action (uniquement pour le PACAP) (Braas et al., 1998; DeHaven and Cuevas, 2004; Merriam et al., 2004; Tompkins et al., 2006, 2007). Par leurs effets excitateurs, ces neuropeptides sont notamment responsables d'une augmentation des libérations d'acétylcholine par les neurones intracardiaques provoquant une réduction de la fréquence cardiaque (Seebeck et al., 1996). Ces peptides exercent leurs effets via l'activation de trois RCPG spécifiques, PAC1, VPAC1 et VPAC2 (**figure 25**). En raison de sa haute affinité pour le PACAP, PAC1 est généralement considéré comme le récepteur du PACAP tandis que les récepteurs VPAC possèdent une affinité similaire pour le VIP et le PACAP. Au sein des neurones cardiaques, les effets médiés par le PACAP semblent pouvoir faire intervenir ces trois récepteurs puisque les transcrits codant chacun de ces trois récepteurs ont été détectés par RT-PCR (DeHaven and Cuevas, 2002).

Bien que la réponse membranaire au PACAP soit similaire chez le rat et le cobaye, les mécanismes impliqués semblent différents pour ces deux espèces. Chez le rat, l'augmentation d'excitabilité requiert l'activation des récepteurs VPAC et PAC1 et l'activation des récepteurs VPAC se traduit par une augmentation des concentrations calciques intracellulaires générée par (1) des libérations calciques réticulaires de la part des récepteurs à la ryanodine (RyR) et (2) des influx calciques certainement médiés par des canaux TRP (DeHaven and Cuevas, 2004) (**figure 25**). Chez le cobaye, l'augmentation des capacités de décharge apparait uniquement liée à l'activation des récepteurs PAC1 et indépendante des libérations calciques réticulaires. Dans cette espèce, l'augmentation d'excitabilité semble liée à la modulation de multiple canaux ioniques parmi lesquels les canaux HCN, des VGCC ainsi que le canal sodique $Na_v1.7$ (Merriam et al., 2004; Tompkins et al., 2015, 2016). Au-delà des voies de signalisation médiées par l'activation de PAC1 à la membrane plasmique, le groupe de Merriam suggère que l'augmentation d'excitabilité médiée par le PACAP passerait également par des voies de signalisation impliquant l'internalisation du complexe ligand-récepteur (Merriam et al., 2013) (**figure 25**). Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution. En effet, à l'exception des canaux HCN, l'action directe du PACAP sur les différents canaux ioniques n'a jamais été démontrée. La participation supposée des VGCC et de $Na_v1.7$ découle essentiellement du constat que l'inhibition de ces canaux masque les effets excitateurs du

PACAP. On ne peut toutefois pas exclure que l'inhibition de ces différents acteurs soit tout simplement associée à une réduction des capacités de décharge des neurones indépendamment du PACAP. La **figure 25** représente les différents mécanismes pouvant être associés à l'activation des récepteurs du VIP et du PACAP.

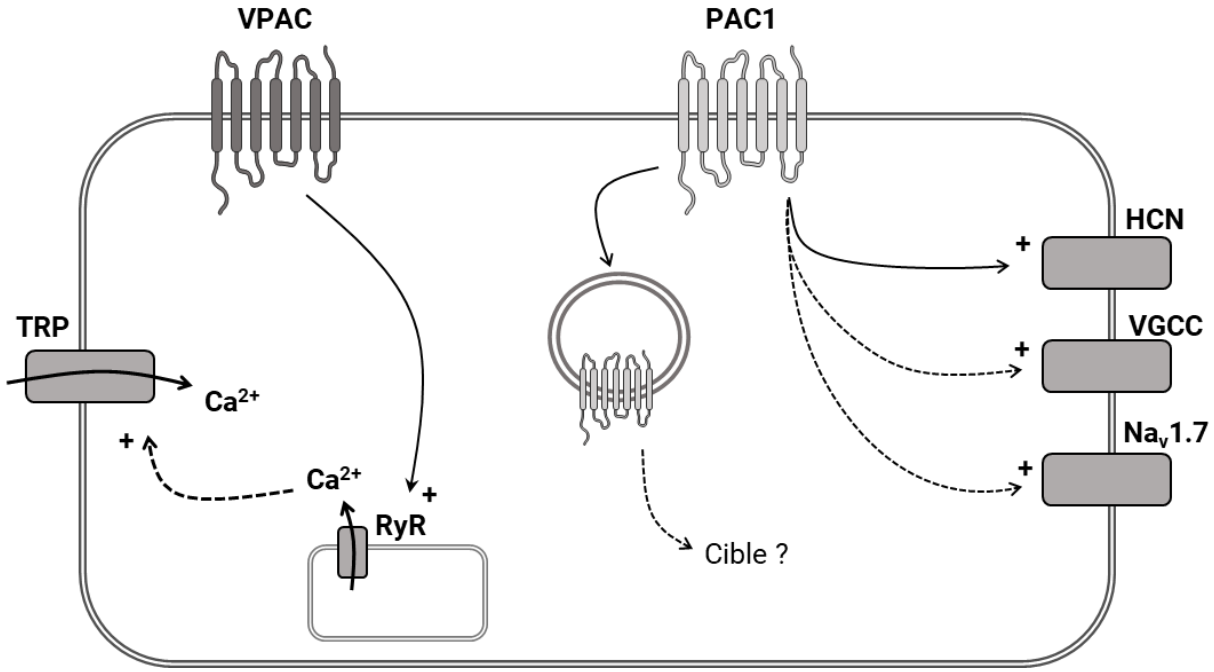


Figure 25 : Voies de transductions associées aux récepteurs du VIP et du PACAP. Chez le rat, l'activation des récepteurs VPAC par le VIP ou le PACAP conduit à une augmentation des concentrations calciques intracellulaires via l'activation des récepteurs à la ryanodine (RyR) et d'un canal TRP. Chez le cobaye, le PACAP stimule l'activité des canaux HCN et pourrait agir sur des canaux calciques voltage-dépendants (VGCC) et le canal $Na_v1.7$. L'internalisation du complexe PACAP-PAC1 pourrait aussi intervenir dans les effets excitateurs du PACAP. Les flèches en pointillées représentent des voies hypothétiques qu'il convient de confirmer.

Chapitre 3 : Pathologies cardiaques et système nerveux intracardiaque

Au-delà du rôle crucial joué par l'innervation cardiaque dans le contrôle physiologique des fonctions cardiaques, cette innervation autonome joue également un rôle essentiel en contexte pathologique. De nombreuses atteintes cardiaques sont par exemple caractérisées par un déséquilibre de la balance autonome. En tant que voie finale régulant les influences sympathiques et parasympathiques, le SNIC joue certainement un rôle important dans ces mécanismes pathologiques. Ce chapitre aborde ainsi les travaux mentionnant l'atteinte et/ou l'implication potentielle des ganglions cardiaques dans les pathologies cardiaques.

[1]. Arythmies cardiaques

Les arythmies cardiaques sont des troubles de l'activité électrique du cœur qui se caractérisent par une origine, une fréquence et/ou une régularité anormale du rythme cardiaque. Ces arythmies peuvent se traduire par une fréquence cardiaque anormalement faible (bradycardie) ou trop élevée (tachycardie) ou bien par une activité électrique anarchique au niveau des oreillettes ou des ventricules (fibrillation auriculaire (FA) ou ventriculaire).

Le système nerveux autonome joue un rôle crucial dans la genèse et l'entretien des arythmies, un déséquilibre de la balance autonome constituant généralement un substrat arythmogène (Shen et al., 2011). Ce déséquilibre de la balance autonome à l'origine des arythmies peut se traduire de différentes manières. Par exemple, l'hyperactivité vagale aurait été associée à l'initiation de FA chez le jeune adulte ne présentant pas d'anomalie cardiaque structurelle tandis que l'activité sympathique favoriserait la survenue de FA dans un contexte pathologique (Coumel, 1996). Dans certains modèles animaux de FA, l'activation simultanée des branches sympathiques et parasympathiques précède la plupart du temps les évènements arythmiques (Shen et al., 2011). Ces influences autonomes étant ultimement conditionnées par le SNIC, ce dernier joue très certainement un rôle central dans ces mécanismes. Cette partie vise à décrire les principaux éléments suggérant l'importance des ganglions cardiaques dans le contexte des arythmies cardiaques.

(i) Fibrillation auriculaire

Parmi les différents troubles du rythme cardiaque, la FA est l'arythmie la plus fréquemment répandue, affectant entre 600 000 et 1 million de personnes en France en 2010 (Charlemagne et al., 2011). Elle se traduit par une fréquence cardiaque irrégulière et souvent anormalement

élevée. En fonction de la récurrence des arythmies, on distingue trois types de FA : paroxystique (occasionnelle), persistante et permanente. Une fois initiée, la FA conduit à un remodelage du tissu auriculaire qui entretient et augmente la récurrence des arythmies.

Coumel est le premier, en 1978, à avoir suggéré l'implication du système nerveux autonome dans la genèse de FA. Ses travaux l'avaient en effet amené à observer qu'une activité excessive du système vagal constituait un facteur déclencheur de FA (Coumel et al., 1978). Chez le chien, l'injection d'acétylcholine au niveau du nœud sinusal est par ailleurs systématiquement associée à l'apparition de FA (Sharifov et al., 2004). L'effet proarythmique de l'acétylcholine découlerait notamment de la réduction de la période réfractaire auriculaire. Il est aussi intéressant de mentionner qu'un remodelage de l'innervation autonome est souvent observé dans le contexte de la FA. Gould et collaborateurs ont par exemple montré que les patients souffrant de FA présentaient une hyperinnervation sympathique au niveau auriculaire (Gould et al., 2006). Ce remodelage a également été constaté chez les modèles animaux de FA induit par stimulation électrique à haute fréquence des oreillettes. Au-delà du remodelage du tissu auriculaire, la genèse et/ou l'entretien des arythmies chez ces modèles animaux pourraient donc également s'expliquer par le remodelage de l'innervation autonome induit par le protocole de stimulation atriale (Jayachandran et al., 2000; Chang et al., 2001).

L'innervation cardiaque jouerait notamment un rôle important dans la genèse d'activités électriques atriales ectopiques. La FA est en effet souvent déclenchée par l'apparition de foyers ectopiques et dans 90 % des cas, ces activités ectopiques sont initiées au sein des VP (Haïssaguerre et al., 1998). Les mécanismes conduisant à l'apparition de foyers ectopiques au sein des VP restent encore mal compris mais plusieurs études ont montré que le système nerveux autonome favorisait la survenue de ces foyers (Shen et al., 2011). En effet, les VP sont richement innervées par les fibres sympathiques et parasympathiques et la stimulation de ces deux voies favoriserait la survenue de foyers ectopiques au sein des VP (Patterson et al. 2005; Tan et al. 2007). Il est également intéressant de mentionner que les ganglions intracardiaques apparaissent particulièrement concentrés aux abords des VP. En 2011, une étude menée sur une cohorte de 12 patients a d'ailleurs montré que la stimulation à haute fréquence des plexus ganglionnaires conduisait à la survenue de foyers ectopiques au sein des VP et à la genèse de FA (Lim et al., 2011).

En 2010, le groupe de Choi a montré que dans un modèle animal de FA paroxystique, les épisodes de FA étaient systématiquement précédés par une activité excessive des ganglions cardiaques, suggérant d'autant plus leur participation dans la survenue de ces arythmies. De plus, dans leur modèle animal, seuls 28 % des épisodes de FA sont précédés par l'activation conjointe des structures nerveuses extra et intracardiaques tandis que 72 % des épisodes de

FA semblent uniquement associés à l'activation des structures nerveuses intrinsèques (**figure 26**) (Choi et al., 2010). Ceci suggère que le SNIC pourrait de façon totalement indépendante conduire à la genèse d'arythmies.

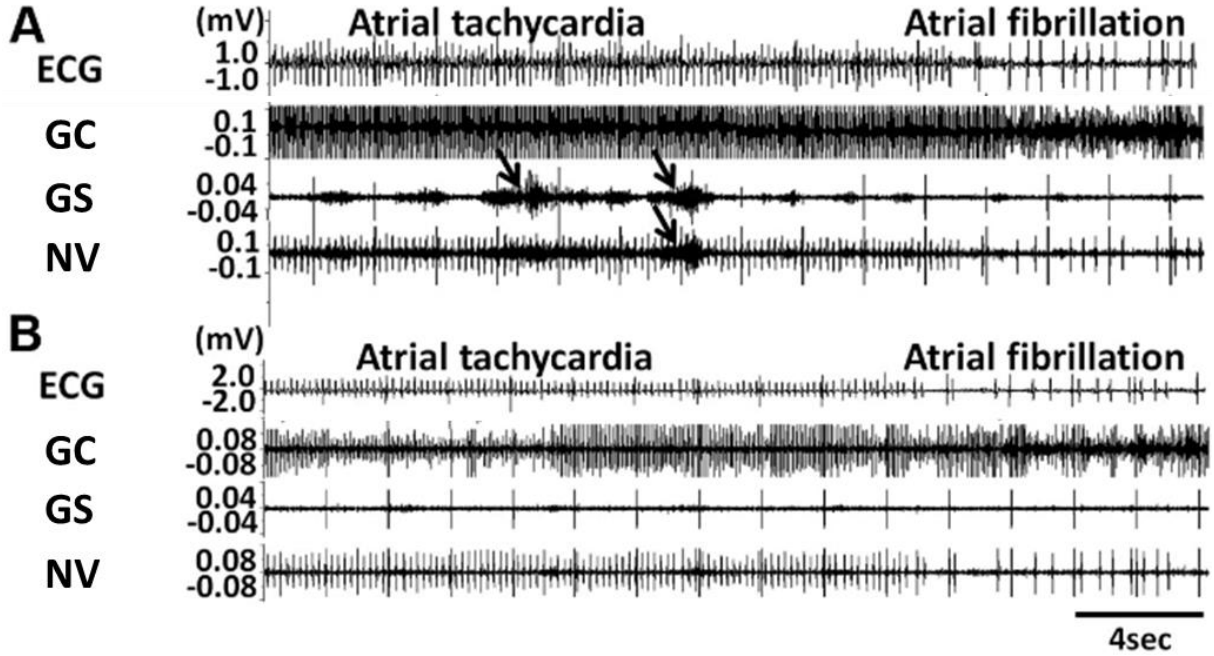


Figure 26 : Activité neuronale et fibrillation auriculaire. Parallèlement à l'enregistrement du tracé ECG, les auteurs ont enregistré l'activité électrique au niveau des ganglions stellaires et du nerf vague (innervation cardiaque extrinsèque) ainsi qu'au sein des ganglions cardiaques (innervation cardiaque intrinsèque) dans un modèle animal de fibrillation auriculaire. Leurs résultats indiquent que 28 % des épisodes de fibrillation auriculaire coïncident avec l'activation simultanée des structures nerveuses extra et intracardiaques (**A**) tandis que 72 % sont uniquement précédés par une augmentation d'activité au niveau des ganglions intracardiaques (**B**). GC : ganglions cardiaques ; GS : ganglions stellaires ; NV : nerf vague. Résultats issus de Choi et al. 2010.

Le rôle central des ganglions cardiaques dans la survenue de FA est renforcé par les études cliniques ayant montré que l'ablation de certaines zones ganglionnaires permettait de limiter la récurrence des arythmies chez les patients. Les travaux de Scherlag ont par exemple montré qu'en complément de l'isolement des VP, l'ablation des ganglions cardiaques permettait d'augmenter d'environ 70 à 91 % le succès de l'intervention (absence de récurrence des FA) par rapport à l'isolement des VP seul. Les bénéfices de cette double approche ont également été rapportés par les travaux de Katritsis quelques années plus tard. Dans leur étude, l'absence de récurrence de FA est retrouvée dans 45 % des patients ayant reçu une approche d'isolement des VP, tandis que ce pourcentage atteint 74 % chez les patients ayant reçu une approche combinée d'isolement des VP et d'ablation des ganglions cardiaques (**figure 27**) (Katritsis et al., 2011).

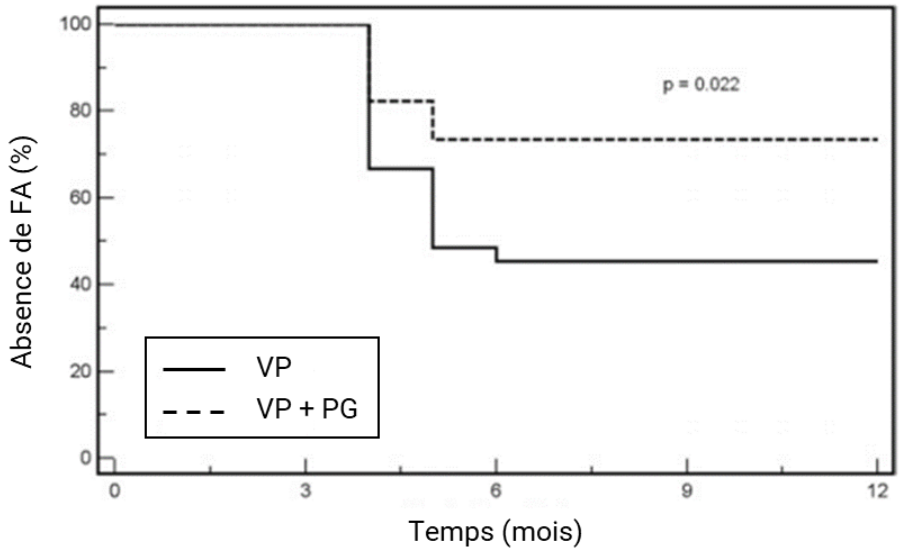


Figure 27 : Suivi post-opératoire des patients atteints de fibrillation auriculaire. Pourcentage de patients ne présentant pas de récurrence de FA après l'intervention. Ce suivi a été réalisé chez des patients ayant reçu une approche unique d'isolement des veines pulmonaires (VP) ou bien combinée à une ablation des ganglions cardiaques (VP + PG). Modifié d'après Katritsis et al. 2011.

(ii) Arythmies ventriculaires

Les neurones cardiaques semblent également impliqués dans la survenue d'arythmies au niveau ventriculaire. En 1994, Huang et collaborateurs ont par exemple montré que près d'une fois sur trois, la modulation pharmacologique de l'activité des neurones cardiaques conduisait à l'apparition d'arythmies ventriculaires et que cet effet perdurait dans près de la moitié des cas après élimination des influences nerveuses extracardiaques (Huang et al., 1994). A l'inverse, d'autres travaux suggèrent que ces ganglions cardiaques pourraient avoir un rôle protecteur vis-à-vis des arythmies puisque leur stimulation prolonge la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire ventriculaire (He et al., 2013). Jungen et collaborateurs ont d'ailleurs montré que l'ablation de certains ganglions cardiaques était associée à un raccourcissement de la période réfractaire et à une augmentation de la susceptibilité aux arythmies ventriculaires chez la souris (Jungen et al., 2017). La survenue d'arythmies ventriculaires a également été observée chez plusieurs patients ayant reçu un protocole d'ablation de FA (Osman et al., 2010; Wu et al., 2016). Ainsi l'ablation des ganglions cardiaques pourrait avoir des effets bénéfiques au niveau auriculaire mais délétères au niveau ventriculaire, ce qui pousse certains à remettre en cause cette approche (Buckley et al., 2017). Une meilleure compréhension de l'organisation du SNIC et une ablation beaucoup plus spécifique permettra certainement à l'avenir d'améliorer la prise en charge des patients.

[2]. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est une pathologie se traduisant par une incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant pour couvrir les besoins de l'organisme. Quelle que soit son étiologie, cet état pathologique est toujours associé à un déséquilibre de la balance autonome se traduisant par une hyper-activité sympathique et une dysfonction parasympathique (Kishi, 2012). Ce déséquilibre de la balance autonome renforce d'autant plus les atteintes cardiaques contribuant à la dysfonction de la contractilité, favorisant la survenue d'arythmies et par conséquent augmentant la mortalité associée à l'insuffisance cardiaque (J Boogers et al., 2011). Plusieurs études ont démontré que les neurones intracardiaques présentaient des atteintes morphologiques, structurelles et fonctionnelles dans ce contexte pathologique ce qui pourrait notamment participer au déséquilibre de la balance autonome (Bibevski and Dunlap, 1999; Singh et al., 2013; Tu et al., 2014; Zhang et al., 2017). Bibevski et Dunlap suggèrent notamment que la dysfonction parasympathique relèverait uniquement d'atteintes ganglionnaires intracardiaques et non des voies parasympathiques pré-ganglionnaires (Bibevski and Dunlap, 1999). Chez l'homme, les neurones cardiaques issus de patients insuffisants cardiaques présentent un corps cellulaire hypertrophié par rapport aux neurones issus de cœurs sains (580 ± 14 *versus* 327 ± 9 μm^2) et des observations similaires ont également été réalisées sur des modèles animaux de l'insuffisance cardiaque (Singh et al., 2013). Cette hypertrophie pourrait notamment découler d'une sécrétion élevée de NGF au sein du tissu cardiaque pathologique puisque des taux anormalement élevés de NGF ont été rapportés dans les cœurs issus de patients insuffisants cardiaques. En raison de l'augmentation de la surface membranaire, le groupe de Singh suggère que cette hypertrophie pourrait entraîner une réduction de l'excitabilité neuronale et ainsi expliquer en partie la dysfonction parasympathique associée à l'insuffisance cardiaque. Chez le rat CHF (Chronic Heart Failure, modèle animal de l'insuffisance cardiaque chronique), l'équipe de Li a effectivement montré que les neurones cardiaques présentaient une excitabilité réduite mais que celle-ci s'expliquait notamment par la réduction de l'expression du canal calcique de type N (Tu et al., 2014). Ce groupe a également montré que ce remodelage électrique des neurones intracardiaques était associé à une susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires (Zhang et al., 2017, 2018), ce qui coïncide avec les données cliniques rapportant la prévalence de ces arythmies dans le contexte de l'insuffisance cardiaque.

[3]. Ischémie myocardique

Au-delà des atteintes musculaires, l'ischémie myocardique génère également des atteintes neuronales qui peuvent participer à l'altération de la fonctionnalité cardiaque. Il est important

de préciser que ces atteintes ne semblent pas uniquement découler de l'altération de la perfusion des ganglions puisque des anomalies neuronales ont également été rapportées pour des atteintes myocardiques distantes des zones ganglionnaires et non associées à une diminution de la perfusion des ganglions (Hardwick et al., 2008). Chez l'homme, l'ischémie myocardique conduirait notamment à la présence de neurones hypertrophiés et présentant de nombreuses inclusions cytoplasmiques (Hopkins et al., 2000). Au-delà des atteintes structurelles, les travaux menés sur le cobaye suggèrent que l'ischémie myocardique pourrait aboutir à un remodelage fonctionnel des neurones notamment caractérisé par des modifications phénotypiques et électrophysiologiques. D'un point de vue électrophysiologique, les travaux de Hardwick et collaborateurs (2008) mentionnent notamment que les neurones présentent des capacités de décharge augmentées et une réponse pharmacologique à l'histamine, la noradrénaline et à l'angiotensine II modifiée dans leur modèle d'infarctus du myocarde. De plus, ces auteurs ont observé une proportion plus élevée de neurones nitrergiques dans ce modèle ischémique. L'augmentation de la proportion de neurones exprimant nNOS apparait à partir du 4ème jour suivant l'ischémie et perdure pendant plus de 50 jours (Hardwick et al., 2008, 2014, 2015). Dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde, Rajendran et collaborateurs ont également observé un remodelage morphologique, phénotypique et fonctionnel des neurones cardiaques. Outre l'hypertrophie neuronale, ces auteurs rapportent une légère réduction de l'expression de ChAT (87 ± 2 % *versus* 91 ± 2 %) ainsi qu'une importante augmentation de l'expression du peptide VIP (66 ± 2 % *versus* 37 ± 3 %) dans les neurones cardiaques de leur modèle (Rajendran et al., 2016). D'un point de vue fonctionnel, ces auteurs ont également constaté une modification de l'activité basale des neurones cardiaques (réduction de l'activité basale des neurones stimulés par le nerf vague et, à l'inverse, augmentation d'activité des neurones inhibés par le nerf vague) ainsi qu'une augmentation de la proportion de neurones cardiaques recevant des inputs sympathiques de la part des ganglions stellaires (Vaseghi et al., 2017). Il est possible que ce remodelage fonctionnel des ganglions intracardiaques participe au déséquilibre de la balance autonome observée dans l'infarctus du myocarde.

[4]. Canalopathies cardiaques

Bien que les données concernant les différents types de canaux ioniques exprimés par les neurones cardiaques soient relativement limitées, quelques études ont rapporté des modifications de l'expression ou de la fonction de certains de ces canaux ioniques dans un contexte cardiaque pathologique.

Une réduction de l'expression du canal calcique de type N au sein des neurones cardiaques a été observée dans plusieurs modèles animaux de pathologies cardiaques. Par exemple,

l'équipe de Li a montré que l'expression du transcrit codant pour la sous-unité Cav2.2 ainsi que l'amplitude du courant calcique de type N étaient réduites dans leur modèle de rat CHF (Tu et al., 2014) et cette perte de fonction pourrait notamment favoriser la survenue d'arythmies ventriculaires dans ces mêmes modèles (Zhang et al., 2017, 2018). Il est intéressant de mentionner qu'en 2015, l'étude génétique d'une famille de patients atteints de dystonie myoclonique associée à des arythmies cardiaques a permis d'identifier la présence d'une mutation affectant le gène CACNA1B codant pour la sous-unité Cav2.2 (Groen et al., 2015). Ainsi, les données expérimentales reliant l'expression de ce canal à l'électrophysiologie cardiaque sont certainement transposables à l'homme. La réduction de l'expression et de la densité de courant associée à ce canal a également été rapportée dans un modèle de diabète de type 2 chez le rat et pourrait expliquer les dysfonctions autonomes cardiaques associées à cette pathologie (Liu et al., 2012).

L'étude des variants génétiques affectant le gène SCN10A encodant la sous-unité alpha du canal sodique $Na_v1.8$ suggère l'implication de ce canal dans de nombreuses pathologies cardiaques telles que le syndrome de Brugada, les troubles de la conduction cardiaque et les FA (Jabbari et al., 2015; Fukuyama et al., 2016). Bien que certains suggèrent que ces atteintes s'expliqueraient par l'expression fonctionnelle de ce canal au sein des cardiomyocytes (Yang et al., 2012), il est également possible que ces pathologies découlent de la perturbation des fonctions neuronales intracardiaques puisque l'expression de ce canal a été suggérée au sein des neurones cardiaques (Verkerk Arie O. et al., 2012). Il a par exemple été montré que la perfusion localisée d'A-803467, inhibiteur du canal $Na_v1.8$, à proximité des ganglions cardiaques permettait de réduire la susceptibilité à la FA dans deux modèles canin aigus de FA (Qi et al., 2014; Chen et al., 2016).

Contexte scientifique et objectifs de thèse

Les travaux menés ces trente dernières années ont permis de démontrer que les ganglions cardiaques n'étaient pas uniquement formés par des neurones parasympathiques mais qu'au contraire, ils formeraient une structure plus complexe modulant les influences nerveuses autonomes et initiant probablement des boucles de régulation cardiaques locales et indépendantes.

Les investigations immunohistochimiques ont par exemple permis de mettre en évidence la diversité phénotypique de ces neurones et notamment l'expression de différents neurotransmetteurs et neuropeptides (Wake and Brack, 2016).

Cette diversité a également été retrouvée d'un point de vue électrophysiologique avec l'observation de différents profils électriques neuronaux (Selyanko, 1992; Edwards et al., 1995; Smith, 1999).

L'étude des inputs synaptiques reçus par ces neurones ainsi que de leur réponse à différents stimuli a permis de révéler la multiplicité des informations intra- et extracardiaques perçues par ces ganglions, suggérant le rôle intégrateur de ces structures (Smith, 1999; Parsons et al., 2006; Hoover et al., 2009; Beaumont et al., 2013).

Enfin, les études fonctionnelles menées *in situ et ex vivo* ont montré que ces ganglions pouvaient présenter une activité indépendante des influences nerveuses extrinsèques et qu'ils étaient certainement formés de différentes catégories fonctionnelles de neurones capables d'initier des boucles de régulations locales (Gagliardi et al., 1988; Ardell et al., 1991; Allen et al., 2018).

Ces éléments rappellent quelque peu la complexité des structures nerveuses entériques qui forment un véritable réseau neuronal intrinsèque capable de moduler la fonction gastro-intestinale indépendamment du système nerveux central (Spencer and Hu, 2020). Par analogie avec le système nerveux entérique, les ganglions cardiaques sont ainsi regroupés sous le terme de SNIC, et certains proposent même le concept de « petit cerveau cardiaque » (Armour, 2007).

Malgré l'ensemble des études menées jusqu'ici, la nature exacte des différents neurones composant les ganglions cardiaques n'a toutefois pas encore été déterminée et cela apparait d'autant plus important au regard de l'éventuelle implication de ces neurones dans la survenue

et l'entretien de certaines pathologies cardiaques telles que les arythmies (Stavrakis et al., 2015; Avazzadeh et al., 2020).

Les récents progrès scientifiques et techniques en matière d'ingénierie génétique offrent désormais la possibilité de décrypter précisément le fonctionnement de ce réseau neuronal intracardiaque et d'étudier plus minutieusement son implication dans les mécanismes pathologiques.

L'objectif initial de cette thèse a donc été d'améliorer notre compréhension du SNIC en s'appuyant notamment sur les dernières avancées techniques telles que la technologie Cre-Lox ou encore l'imagerie tridimensionnelle par clarification d'organe.

Pour cela, nous nous sommes tout d'abord consacrés à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système nerveux intracardiaque de la souris. En effet, bien que ce modèle offre de nombreuses possibilités techniques pour investiguer le rôle et les propriétés des différents types de neurones cardiaques, très peu d'études avaient été conduites sur ce modèle jusqu'à présent.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes appuyés sur la technologie Cre-Lox pour nous focaliser sur l'étude d'une sous-catégorie précise de neurones cardiaques. Nous nous sommes notamment intéressés aux propriétés phénotypiques, morphologiques et électrophysiologiques de cette population en utilisant des approches d'immunomarquage et la technique de patch-clamp.

Enfin, nous nous sommes également intéressés aux cellules non neuronales retrouvées dans les ganglions intracardiaques et à leur éventuelle capacité à initier des mécanismes de neurogenèse en culture.

Matériels et méthodes

[1]. Modèles animaux

Les expériences ont été conduites avec des souris C57bl6/J ainsi que sur des souris de la lignée B6;129S-Calb1tm2.1(cre)Hze/J (lignée calb-cre, The Jackson Laboratory). L'ensemble des procédures impliquant des animaux ont été réalisées en respectant les réglementations éthiques de la directive européenne 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Ce projet a également fait l'objet d'une autorisation APAFiS (APAFIS#20949-201906051642993) délivrée par le ministère de la recherche et approuvée par le comité d'éthique COMETHEA Poitou-Charentes (CEEA n°084).

(i) La lignée calb-cre

Cette lignée transgénique a été créée par l'Allen Institute for Brain Science. Elle comporte une séquence IRES2 ainsi que le gène codant pour la protéine Cre-recombinase en aval du codon stop du gène codant pour la protéine calbindine. Cette modification génétique conduit à l'expression ciblée de la protéine Cre-recombinase au sein des cellules exprimant la calbindine, sans altérer l'expression de la protéine endogène.

a) Génotypage par PCR

A réception de la lignée transgénique, le génotype des souris calb-cre a été validé en appliquant un protocole de génotypage par PCR à partir de biopsies de la queue. La PCR est la technique de premier choix utilisée pour le génotypage de routine car elle nécessite une petite quantité d'acide désoxyribonucléique (ADN) et donc de tissu au départ.

Extraction et dosage de l'ADN

L'extraction de l'ADN est obtenue en réalisant une lyse alcaline des échantillons tissulaires prélevés chez l'animal. Chaque biopsie est immergée dans 50 µL de solution de lyse alcaline (0.2 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, Sigma-Aldrich), 25 mM NaOH (Sigma-Aldrich) dans de l'eau milliQ stérile, pH = 12). Afin d'éviter toute évaporation, 40 µL d'huile minérale (Sigma-Aldrich) sont ajoutés dans chacun des tubes avant de procéder à l'étape de digestion à 94 °C pendant 1 heure dans un thermocycler (PTC-100, M.J Research, Inc). La lyse est ensuite stoppée par ajout d'un volume de 50 µL de solution de neutralisation (40 mM Tris HCl dans de l'eau milliQ stérile, pH = 5) et les échantillons sont refroidis à 4 °C. La concentration et la pureté en ADN sont déterminées en mesurant la densité optique à 230 nm,

260 nm et 280 nm à l'aide d'un nanodrop (NanoDrop ND-100, Labtech) à partir de 2 µL de solution d'extraction.

Amplification par PCR

Les fragments d'ADN d'intérêts sont amplifiés par PCR en incubant 50 à 200 ng d'ADN avec le mélange réactionnel de PCR (25 U/mL de Taq Polymerase (Invitrogen), 200 µM de dNTPs, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 µM d'amorce mutante anti-sens (13007), sauvage anti-sens (29730) et d'une amorce commune (29729) (Eurogentec, **tableau 4**) dans de l'eau milliQ stérile) pour un volume réactionnel final de 25 µL.

Numéro d'amorce	Séquence 5' - 3'	Nature de l'amorce	Taille du fragment amplifié
13007	ACACCGGCCTTATTCCAAG	Mutante (anti-sens)	144 pb
29729	AGAACATAATGGCCTTGTCG	Commune (sens)	-
29730	TACTGACTGGCCTAAGCATGG	Sauvage (anti-sens)	311 pb

Tableau 4 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris calb-cre.

Après ajout de 30 µL d'huile minérale, les échantillons sont placés dans le thermocycler (Mastercycler nexus GX2, eppendorf) et soumis à plusieurs cycles de température permettant l'amplification d'ADN (**tableau 5**).

Etape	Température	Durée	Nature et nombre de cycles
1	94°C	2 min	Pré-dénaturation
2	94°C	20 sec	10 cycles
3	65°C	15 sec - 0,5 °C par cycle	
4	68°C	10 sec	
5	94°C	15 sec	28 cycles
6	60°C	15 sec	
7	72°C	10 sec	
8	72°C	2 min	Cycle de sortie
9	10°C	Infini	maintien

Tableau 5 : Etapes du protocole de PCR

Ce protocole comporte une phase de dénaturation de l'ADN par la chaleur permettant de générer des molécules simple brin (94 °C), une étape d'hybridation des amorces à 60 °C et une étape d'élongation par l'action de l'ADN polymerase (Taq polymerase) dont l'activité est

optimale à 72 °C. Une fois le protocole de PCR terminé, les échantillons sont conservés à 4 °C.

Migration sur gel d'agarose et révélation

Les produits PCR ainsi que le marqueur de poids moléculaire ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) (Thermo Fisher) sont déposés sur un gel d'agarose 2 % (Sigma-Aldrich) comportant 0.001 % d'une solution de bromure d'éthidium à 10 mg/mL (Sigma-Aldrich). La migration est réalisée pendant 25 minutes à 100 V (Système d'électrophorèse ENDURO gel XL) et les résultats sont visualisés en utilisant un système d'imagerie UV autonome (E-box VX5, Vilber).

Résultats obtenus

La lignée transgénique a été établie à partir de 9 individus calb-cre (3 mâles et 6 femelles). Le schéma de reproduction initial comportait deux séries de 3 accouplements permettant d'obtenir un pool d'individus suffisant à partir des 6 femelles de départ. Le génotypage a ensuite été réalisé sur 6 individus représentatifs des 6 croisements réalisés. Les résultats obtenus ont permis d'observer la présence d'un seul fragment d'ADN dont le poids moléculaire correspond au fragment muté (**figure 28**).

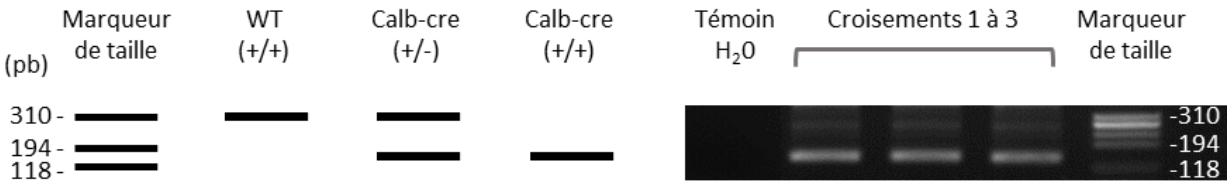


Figure 28 : Résultats théoriques (gauche) et obtenus (droite) pour le génotypage des souris calb-cre. Le schéma de gauche représente les résultats théoriquement obtenus après application du protocole PCR : le génotypage d'une souris sauvage se traduit par la présence d'une seule bande à 311 pb, tandis que le génotypage d'une souris calb-cre homozygote (+/+) se traduit par la présence d'une seule bande à 144 pb. La présence des deux bandes reflète ainsi la nature hétérozygote d'une souris calb-cre. La photo de droite représente les résultats obtenus lors du génotypage de 3 souris issus de 3 croisements distincts. Une seule bande, d'un poids moléculaire situé entre 118 et 194 pb, a été obtenu démontrant la nature homozygote mutée des souris testées.

Ces résultats nous ont permis de confirmer que les souris étaient bien homozygotes et porteuses de la mutation calb-cre.

[2]. Transduction virale *in vivo*

L'étude spécifique des neurones cardiaques exprimant la calbindine a été réalisée via la mise en place d'une stratégie de transduction virale combinée à la technologie Cre-Lox.

(i) La technologie Cre-Lox

La technologie Cre-Lox est un outil de manipulation génétique ciblée utilisant les propriétés de la protéine Cre-recombinase, issue du bacteriophage P1. Cette enzyme est spécialisée dans la catalyse de réaction de recombinaison au niveau de sites spécifiques appelés LoxP. L'activité de cette enzyme se traduit ainsi par la formation de coupure double brin de l'ADN entre deux sites loxP. En fonction de l'orientation et de la localisation de ces sites loxP, l'enzyme sera capable de générer des inversions, des délétions ou bien des insertions de matériel génétique (**figure 29**).

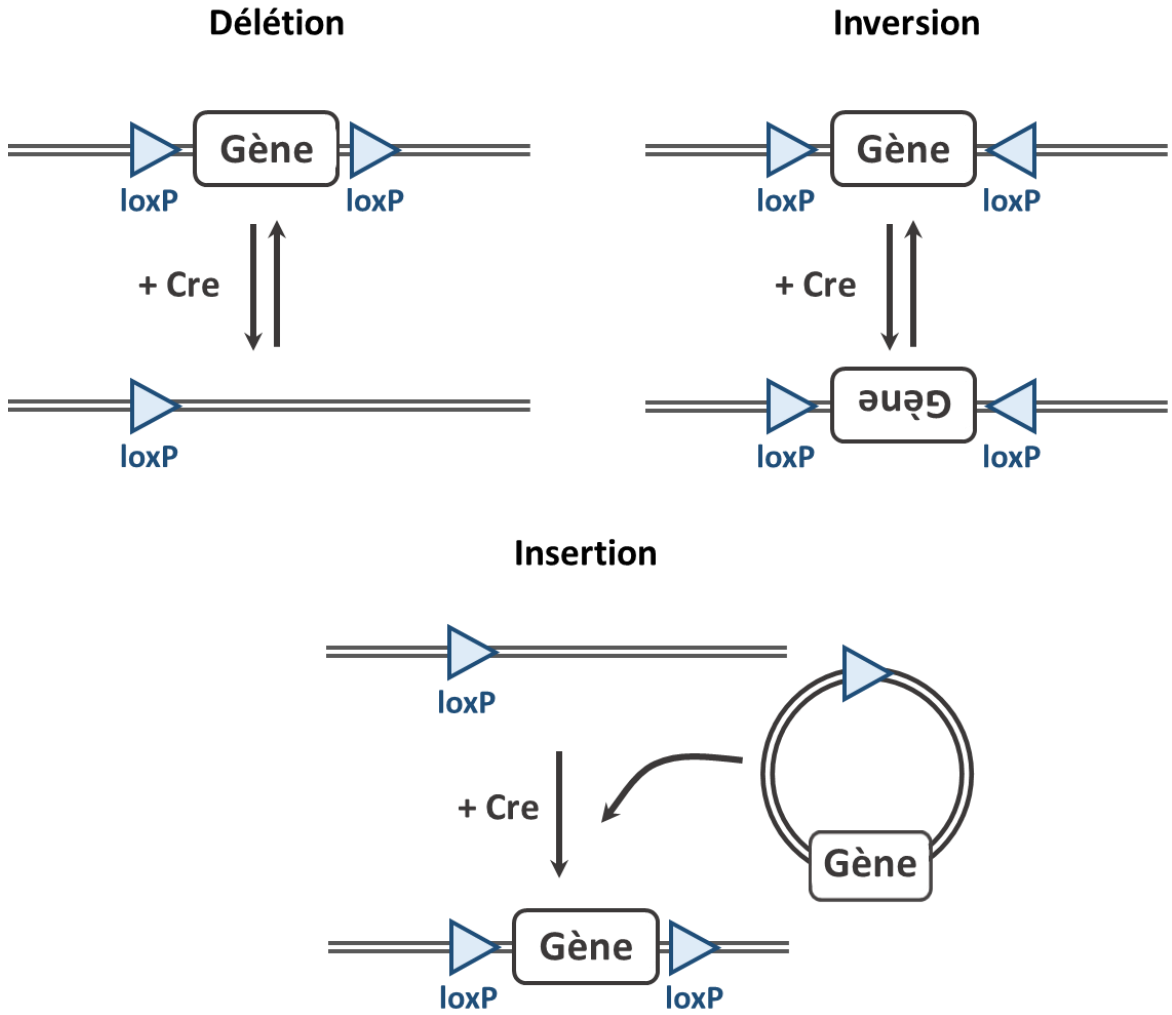


Figure 29 : Evénements de recombinaisons génétiques induit par l'activité de la Cre-recombinase. En fonction de la localisation et de l'orientation des sites LoxP, l'activité de la Cre-recombinase génère différentes modifications génétiques. Lorsque les deux sites loxP sont présents sur le même brin d'ADN et orientés dans le même sens, la Cre-recombinase génère une coupure double brin entre les deux sites loxP conduisant à une délétion du gène présent entre ces deux sites. Si les deux sites loxP sont orientés dans deux sens opposés, cette activité se traduira par une inversion du gène. Enfin, si les deux sites loxP sont présents sur deux fragments d'ADN distincts, la Cre-recombinase génère une insertion entre les deux sites loxP.

Les propriétés de cette enzyme ont révolutionné les possibilités techniques en terme de mutagénèse dirigée offrant, par exemple, la possibilité de générer des modèles d'invalidation génétique (knock-out, KO) conditionnelle, inductible, ou bien tissue-spécifique (Nagy, 2000).

(ii) Principe

Des adénovirus associés (AAV) Cre-dépendants sont utilisés afin de conduire à l'expression de différentes protéines (rapporteurs fluorescents et outils optogénétiques) au sein des neurones calbindine. Ces AAVs comportent au sein de leur séquence un codon stop, flanqué par deux sites loxP orientés dans le même sens, en amont de la séquence du transgène. L'expression du transgène est ainsi conditionnée par la présence de la Cre-recombinase : lorsque l'enzyme est présente, celle-ci vient se fixer sur les deux sites loxP et conduit à une délétion du codon stop, permettant ainsi l'expression du transgène. En revanche, lorsque l'AAV infecte une cellule n'exprimant pas la Cre-recombinase, le codon stop empêche l'expression du transgène (**figure 30**).

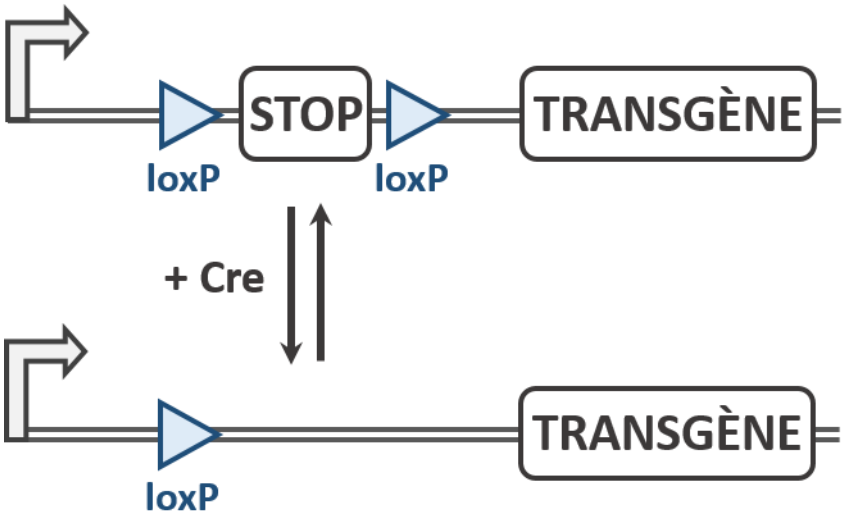


Figure 30 : Principe des AAVs Cre-dépendants.

(iii) Procédure expérimentale

Les AAVs (**tableau 6**) sont dilués dans une solution de tampon phosphate salin contenant du calcium et du magnésium (DPBS, Corning) et sont maintenus sur glace jusqu'à injection. L'efficacité de transduction virale peut être conditionnée par plusieurs paramètres tels que le sérotype, le promoteur ou encore la concentration en particule virale injectée. Le **tableau 6** ci-dessous récapitule les différents AAVs testés ainsi que leur efficacité à transduire les neurones cardiaques.

Référence	Sérotype	Promoteur	Transgène	Concentration virale injectée (vg/mL)	Efficacité de transduction
AAV9.FLEX.CAG.Arch.GFP (addgene – 22222)	AAV9	CAG	Arch	$4{,}75.10^{12}$	importante
AAV8.hSyn.hChR2(H134R).EYFP (addgene - 55645)	AAV8	hSyn	hChR2(H134R)	$5{,}25.10^{12}$	très faible
EF1a.dble floxed.hChR2(H134R).mcherry (addgene - 20297)	AAV5 AAV9	EF1α	hChR2(H134R)	$1{,}31.10^{12}$ $6{,}75.10^{12}$	inexistante
AAV9.FLEX.CAG.ChR2.tdtomato (addgene - 18917)	AAV9	CAG	ChR2	$5{,}25.10^{12}$	très faible
AAV1.CAG.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 (addgene - 100835)	AAV1	CAG	GCaMP6f	$1{,}0.10^{13}$	importante
FLEX.tdtomato (addgene - 28306)	AAV1 PHP.S	CAG	tdtomato	$6{,}25.10^{12}$ $4{,}5.10^{12}$	importante

Tableau 6 : Liste des AAVs utilisés.

La tranduction virale est réalisée sur des souriceaux hétérozygotes âgés de 4 à 6 jours. Avant toute manipulation des souriceaux, la mère est anesthésiée par inhalation d'un mélange d'isoflurane (Vetflurane, Coveto) et d'oxygène (rapport 2:1). Les souriceaux sont quant à eux anesthésiés par hypothermie dans la glace. Une fois l'endormissement suffisant, la solution contenant les AAVs est injectée par voie intrapéritonéale à l'aide d'une aiguille 30G (Terumo, VWR), à raison de 40 µL par individu. Les souriceaux injectés sont identifiés par la réalisation d'un tatouage sur une ou plusieurs pattes à l'aide d'une aiguille 30G et d'une encre à tatouer vétérinaire (Ketchum, vwr). Les souriceaux sont ensuite déposés sur une plaque chauffante (38 °C) et attentivement surveillés jusqu'au réveil complet. Lorsque l'ensemble des individus est réveillé, les souriceaux sont de nouveaux placés dans le nid. Avant de procéder au réveil de la mère, celle-ci est mise en contact avec la portée afin de masquer les odeurs provenant de l'expérimentateur. Une fois la mère réveillée, une surveillance quotidienne des individus est réalisée pendant 8 jours afin de s'assurer de la bonne santé des animaux.

[3]. Immunofluorescence indirecte

L'étude anatomique et phénotypique des ganglions intracardiaques et de leurs projections a été réalisée par l'utilisation de différentes approches d'immunomarquage. Ces expériences ont été réalisées à l'échelle de l'organe entier, sur coupes de tissu cardiaque ainsi que sur des cultures primaires issues de ganglions cardiaques. L'immunofluorescence indirecte est une technique qui repose sur la reconnaissance anticorps/antigène permettant ainsi la localisation d'une protéine d'intérêt au sein d'un échantillon biologique. Cette approche implique l'utilisation de deux types d'anticorps : un anticorps primaire, spécialisé dans la reconnaissance de la protéine d'intérêt, et un anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome,

et dirigé contre l'anticorps primaire. L'excitation du fluorophore en microscopie de fluorescence permet alors la détection de la protéine d'intérêt (**figure 31**).

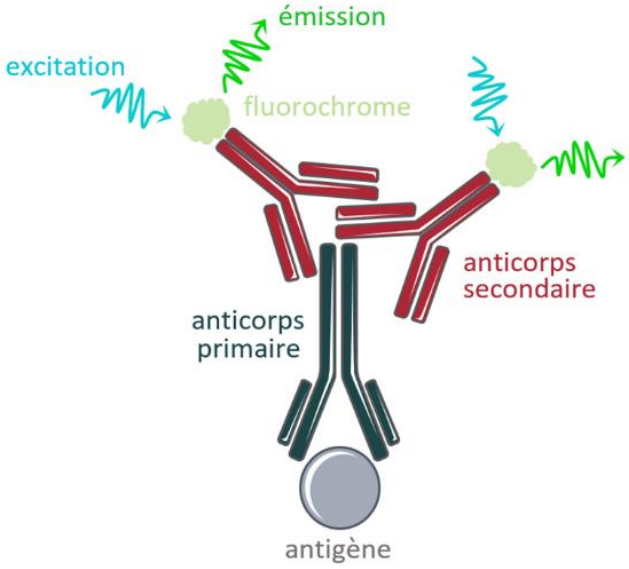


Figure 31 : Principe de l'immunofluorescence indirecte.

(i) Transparisation cardiaque par la technique iDISCO

Au cours de ces travaux de thèse, l'approche de transparisation d'organe a été utilisée afin d'étudier le SNIC dans sa globalité, à l'échelle du cœur entier.

a) Généralités et principe

L'objectif de la transparisation est d'homogénéiser la composition des tissus afin d'améliorer le passage de la lumière et ainsi permettre l'imagerie en profondeur des échantillons biologiques. En effet, les différents constituants de l'épaisseur d'un tissu sont à l'origine de multiples indices de réfraction qui génèrent d'importants phénomènes de diffusion de la lumière, rendant impossible la visualisation des structures profondes. L'imagerie des tissus est également limitée par la présence de pigments qui génèrent des phénomènes d'absorption de la lumière. Ainsi, l'objectif de la transparisation est de limiter tous ces phénomènes qui perturbent le passage de la lumière afin de rendre possible l'imagerie de structures épaisses (**figure 32**).

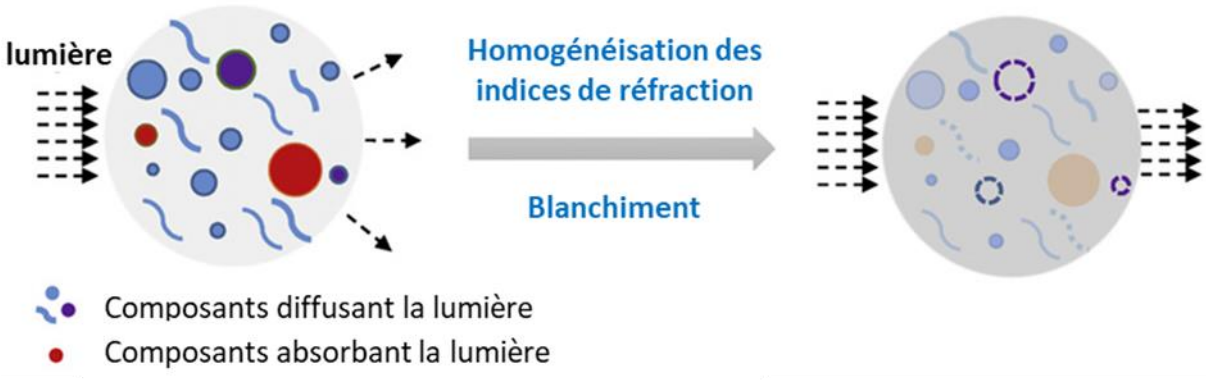


Figure 32 : Phénomènes physiques responsables de l'opacité des échantillons. L'opacité des échantillons découle des phénomènes entravant le passage de la lumière. La diversité des constituants tissulaires génère de multiples indices de réfraction à l'origine d'important phénomènes de diffusion de la lumière. Le passage de la lumière est également limité par les phénomènes d'absorption. L'objectif de la transparisation est d'homogénéiser les indices de réfraction et de limiter les phénomènes d'absorption pour favoriser le passage de la lumière. (modifié d'après **(Yu et al., 2021)**.

Parmi l'ensemble des techniques développées, on peut distinguer trois grandes familles de protocoles de transparisation, selon la nature chimique des solutions utilisées (Richardson and Lichtman, 2015; Ariel, 2017; Yu et al., 2021) :

(1) Les protocoles utilisant des solvants organiques
(2) Les protocoles basés sur l'utilisation d'agents hydrophiles
    a. Par immersion simple dans une solution aqueuse à indice de réfraction élevée
    b. Par hyper-hydratation
(3) Les protocoles qui reposent sur la formation d'un hydrogel

Bien que leurs méthodologies diffèrent, l'objectif de ces trois types d'approche est de conduire à une homogénéisation des indices de réfraction de l'échantillon étudié (**figure 33**).

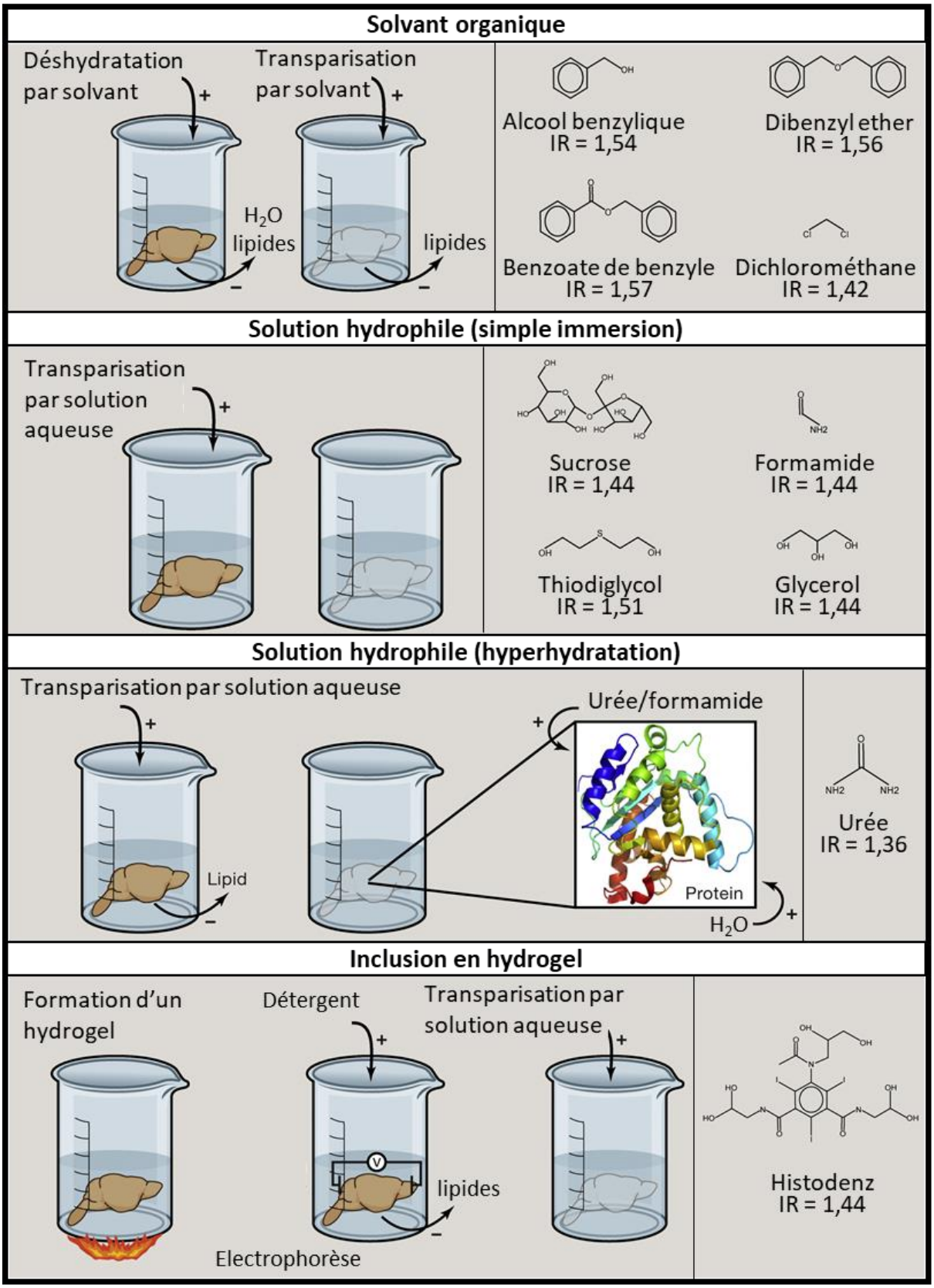


Figure 33 : Représentation schématique des différentes approches de transparisation (modifié d'après Richardson et Lichtman 2015)

Chacune de ces différentes approches possèdent des avantages et inconvénients dont il est nécessaire de tenir compte pour choisir un protocole adapté à la nature du tissu étudié et aux attentes expérimentales (préservation de la fluorescence endogène, compatibilité avec l'immunomarquage, durée du protocole, coût…).

Le protocole utilisé pour ces travaux de thèse est celui développé au sein du laboratoire d'Alain Chédotal (Belle et al., 2017) et qui correspond à une modification des protocoles iDISCO (immunolabeling-enabled three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs) et iDISCO+ élaborés par Nicolas Rénier. Ces protocoles de transparisation reposent sur l'utilisation de solvants organiques qui éliminent les lipides et homogénéisent les indices de réfraction au sein de l'épaisseur de l'échantillon, conduisant ainsi à une réduction de son opacité.

Ce protocole, particulièrement adapté à la transparisation des échantillons de taille importante et hautement autofluorescent, comporte trois principales étapes : le pré-traitement de l'échantillon (blanchiment et dénaturation au méthanol), l'immunomarquage et la clarification de l'échantillon (**figure 34**).

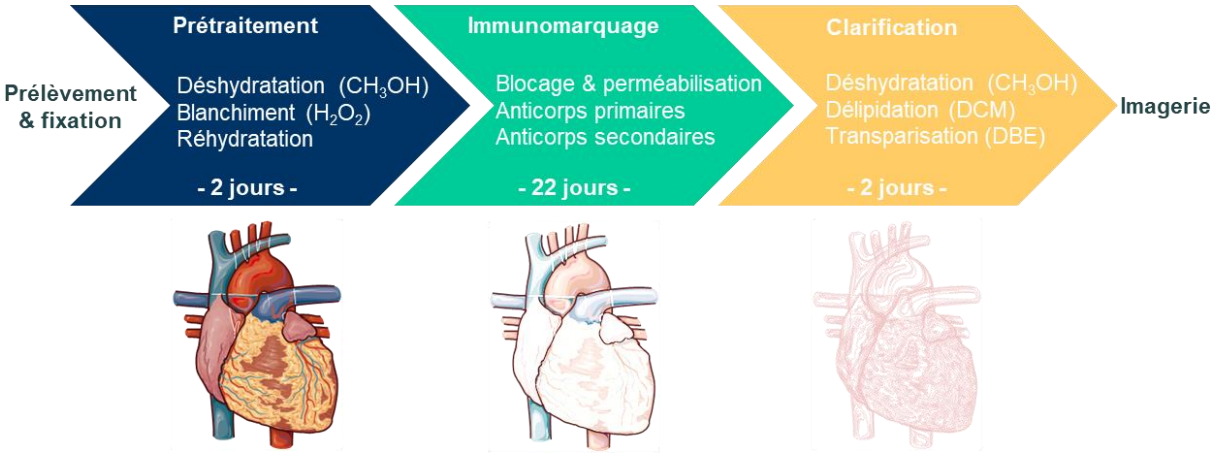


Figure 34 : Etapes du protocole de transparisation cardiaque. L'échantillon est d'abord déshydraté au méthanol et blanchit dans le peroxyde d'hydrogène. Ce pré-traitement permet de limiter l'autofluorescence et facilitera la pénétration des anticorps par la suite. Après réhydratation, l'étape d'immunomarquage est réalisée. Enfin, une nouvelle étape de déshydratation au méthanol est réalisée. Celle-ci participe à la dissolution de certains lipides et permet aux solvants organiques dissolvant les lipides et homogénéisant les indices de réfraction d'agir.

b) Procédure expérimentale

Prélèvement cardiaque

La souris est héparinée (5000 U/kg) et euthanasiée avec une injection intrapéritonéale de pentobarbitale (100 mg/kg). Après réalisation d'une thoracotomie, le cœur est prélevé et rincé

par deux fois dans du DPBS froid. Le cœur est ensuite fixé pendant 24 heures dans une solution de paraformaldehyde 4 % (PFA, Sigma-Aldrich) à 4 °C. Après 3 rinçages, le cœur est stocké à 4 °C dans du DPBS.

Prétraitement de l'échantillon

L'échantillon est progressivement déshydraté par incubation dans des solutions à concentration croissante en méthanol dilué dans du DPBS (50, 80 et 100 % ; 1,5 heures par étape) sous agitation et à température ambiante. Afin de réduire l'autofluorescence, l'échantillon est ensuite blanchi par incubation dans une solution de peroxyde d'hydrogène 6 % dilué dans le méthanol, pendant une nuit à 4 °C à l'abri de la lumière. Après deux lavages dans du méthanol 100 %, le cœur est progressivement réhydraté par diminution progressive de la concentration en méthanol (80, 50 % méthanol puis DPBS ; 1,5 heures par étape).

Immunomarquage

Une première étape de saturation des sites non spécifiques et de perméabilisation du tissu est réalisée en incubant l'échantillon dans du PBSGT (PBSGT : 0.2 % gélatine (Sigma-Aldrich), 0.5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 50mM Sodium Azide (Sigma-Aldrich) dans du DPBS) pendant 4 jours sous agitation à température ambiante. L'échantillon est ensuite mis en présence des anticorps primaires (**tableau 7**), dilués dans une solution de PBSGT supplémentée par 0.1 % de saponine (Sigma-Aldrich), pendant deux semaines sous agitation à 37 °C. Après 6 étapes de rinçage dans du PBSGT, l'échantillon est incubé pendant 2 jours avec les anticorps secondaires (**tableau 8**), dilués dans une solution de PBSGT supplémentée par 0.1 % de saponine, sous agitation à 37 °C. A partir de ce stade, toutes les étapes du protocole sont réalisées à l'abri de la lumière. L'échantillon est finalement rincé par 6 fois dans du PBSGT et conservé à 4 °C.

Antigène	Espèce hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
Choline acétyltransférase (ChAT)	Chèvre	1/100	AB144P	Sigma-Aldrich
tdtomato	Lapin	1/300	600-401-379	Rockland
Tyrosine hydroxylase (TH)	Lapin	1/400	AB152	Sigma-Aldrich

Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le protocole iDISCO.

Anticorps secondaire	Espèce hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
Alexa Fluor 647 anti chèvre	Âne	1/200	A-21447	ThermoFisher
Alexa Fluor 555 anti lapin	Âne	1/200	A-31572	ThermoFisher

Tableau 8 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour le protocole iDISCO.

Clarification

48 heures avant imagerie, l'échantillon est progressivement déshydraté dans le méthanol (20, 40, 60, 100 et 100% méthanol ; 1 heure par étape) sous agitation à température ambiante. Les lipides sont retirés par incubation dans un mélange dichlorométhane (DCM, Sigma-Aldrich) / méthanol (2/3 DCM ; 1/3 méthanol) pendant une nuit, sous agitation à température ambiante. Cette étape de délipidation est complétée par une incubation dans une solution de DCM pendant 30 minutes. Finalement, la transparisation est atteinte en plongeant le cœur dans du dibenzyl ether (DBE, Sigma-Aldrich).

Imagerie : la microscopie de fluorescence à feuillet de lumière

Les images sont acquises en trois dimensions à l'aide d'un microscope à feuillet de lumière. Cette technique de microscopie consiste à illuminer l'échantillon de manière latérale à l'aide d'une fine feuille de lumière. La détection du signal est réalisée par un objectif indépendant du système d'illumination et orienté perpendiculairement à la feuille de lumière (**figure 35**). L'acquisition en trois dimensions est obtenue en traversant successivement l'ensemble de l'épaisseur de l'échantillon, plan par plan. Au cours de l'acquisition, seul le plan focal est illuminé, limitant ainsi grandement le phénomène de photoblanchiment.

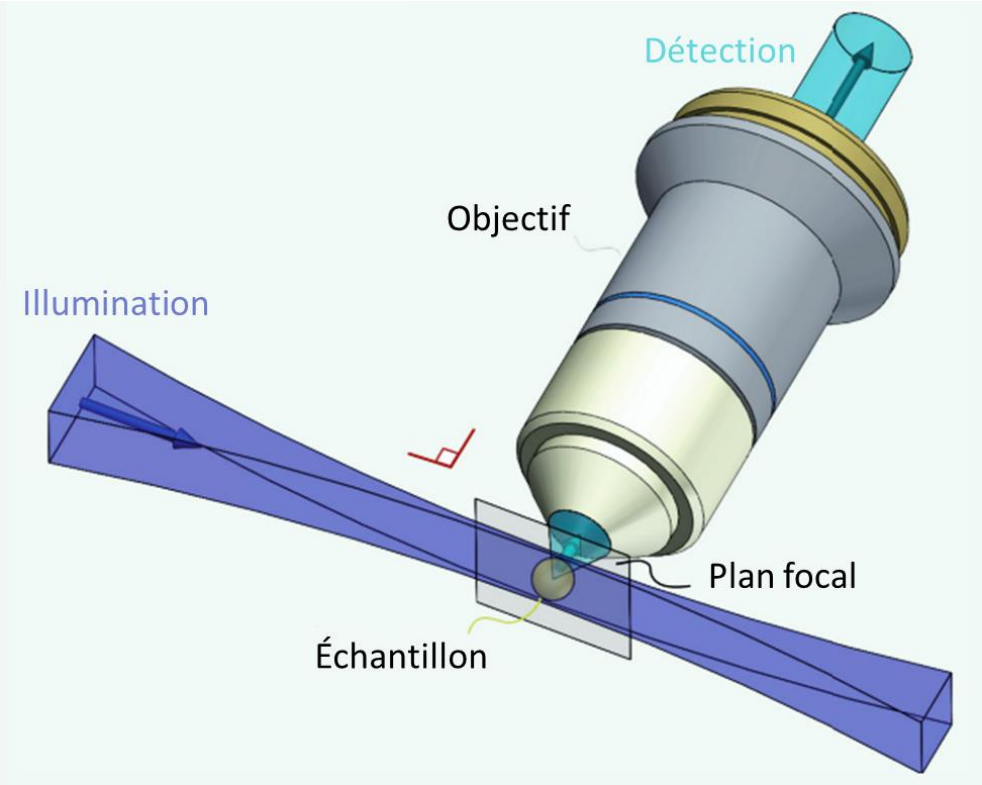


Figure 35 : Le microscope à feuillet de lumière (modifié d'après (Girard and Forget, 2011)).

Au cours de ces travaux, deux systèmes d'acquisition différents ont été utilisés pour l'acquisition des images : le microscope à feuillet de lumière mesoSPIM de la plateforme Advanced Lightsheet Imaging Center (ALICe) du centre Wyss à Genève ainsi que l'ultraMicroscope de LaVision Biotec. L'acquisition a été réalisée à l'objectif 1X avec un zoom numérique de 1.25 (mesoSPIM) et à l'objectif 2X, zoom numérique 0.65 (Ultramicroscope). L'imagerie est réalisée dans le DBE ou dans l'éthyl cinnamate (Sigma-Aldrich), équivalent non toxique du DBE. La visualisation et l'analyse des images sont réalisées à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) et Imaris (Bitplane).

c) Analyse de l'innervation ventriculaire catécholaminergique cardiaque

L'analyse de l'innervation ventriculaire catécholaminergique cardiaque a été réalisée en développant une macro sous le logiciel ImageJ (macro développée par Côme Pasqualin, (Lizot et al., 2022) à partir des immunomarquages anti-TH (**figure 36**).

Cette macro comporte trois étapes :

1) **Seuillage :** l'image subit une étape de seuillage permettant de discriminer l'intensité de fluorescence liée au bruit de fond de celle liée au signal. Ce seuillage est réalisé en utilisant l'algorithme « maximum entropy ».

2) **Squelettisation :** le diamètre de chaque fibre est ramené à un voxel. Cette étape permet d'éviter une surestimation de l'innervation liée à l'hétérogénéité d'illumination au sein de l'échantillon et aux phénomènes de PSF (Point Spread Function, ou fonction d'étalement du point) inhérents à la microscopie.

3) **Calcul de la longueur totale :** la longueur totale des fibres innervant les ventricules cardiaque est déterminée en utilisant une version modifiée du plugin « analyse skeleton » d'ImageJ.

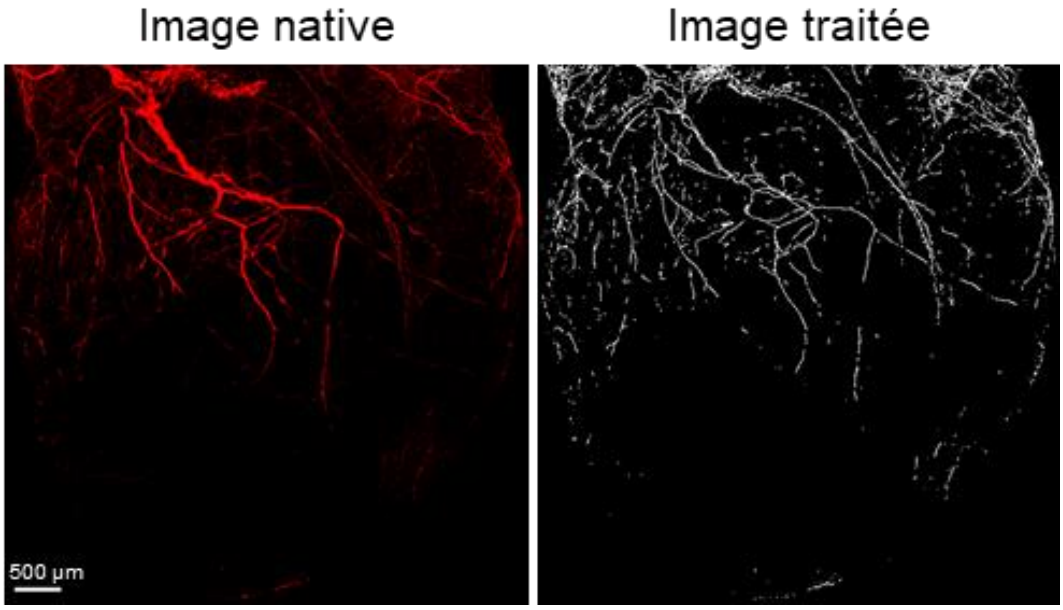


Figure 36 : Analyse de l'innervation ventriculaire cardiaque sous imageJ.

(ii) Immunohistochimie sur coupes de tissu cardiaque

Après prélèvement et fixation du cœur selon le protocole détaillé précédemment ([3] (i) b.), celui-ci est cryoprotégé par incubation dans une solution de sucrose 30 % (Sigma-Aldrich) dans du DPBS pendant une nuit à 4 °C. Le cœur est ensuite inclus dans le milieu d'inclusion tissue-TEK OCT (VWR) et l'ensemble congelé par immersion dans l'ethanol absolu (VWR) refroidi avec de la glace carbonique. Des coupes sériées (40-50 µm) sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM 3050) à -22 °C, déposées sur des lames de verre recouvertes de poly-Lysine (Menzel-Gläser, Thermo Scientific) et mises à sécher pendant plusieurs heures.

Après trois rinçages de 10 minutes dans du DPBS, la perméabilisation du tissu et la saturation des sites aspécifiques sont réalisées pendant 2 heures dans une solution de DPBS contenant 1 % d'albumine bovine sérique (BSA ; Sigma-Aldrich) et 0.5 % de tritonX-100. L'incubation avec les anticorps primaires (dilués dans le DPBS (**tableau 9**)) est réalisée sur la nuit à 4 °C, en chambre humide. Après 3 rinçages dans le DPBS, l'incubation avec les anticorps secondaires (**tableau 10**) est réalisée pendant 3 heures à température ambiante et

à l'abri de la lumière. Le marquage nucléaire est réalisé par incubation dans une solution de diamidino-2-phénylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) dilué au 1/200e dans du DPBS. Après trois nouveaux rinçages dans le DPBS, les coupes sont montées dans du milieu de montage mowiol (Sigma-Aldrich) et mises à sécher pendant une nuit à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont observées à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser IX83 FV3000 (Olympus). L'acquisition des images est réalisée grâce au logiciel Fluoview (Olympus) et leur analyse par le logiciel ImageJ.

Antigène	Espèce hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
Calbindin D28k	Lapin	1:1200	CB38	Swant
CART (55-102)	Lapin	1 :1000	H-003-62	Phoenix Pharmaceuticals
CGRP	Chèvre	1:300	Ab36001	Abcam
ChAT	Chèvre	1:100	AB144P	Sigma-Aldrich
GABA	Lapin	1:500	A2052	Sigma-Aldrich
Gad67	Souris	1:500	MAB5406	Sigma-Aldrich
GFAP	Lapin	1:500	Z0334	Dako
GFP	Poulet	1:400	GFP-1020	Interchim
Glutamine synthetase	Lapin	1:100	Ab73593	Abcam
MAP2	Lapin	1:600	AB5622	Merck Millipore
nNOS	Lapin	1:500	AB5380	Merck Millipore
NPY	Lapin	1:500	Ab10980	Abcam
PGP9.5	Cobaye	1:200	Ab10410	Abcam
PGP9.5	Lapin	1:2000	AB1761-I	Sigma-Aldrich
Somatostatin	Rat	1:200	sc-47706	Santa cruz
Sox2	Chèvre	1 :100	Sc-17320	Santa cruz
Substance P	Cobaye	1:500	Ab10353	Abcam
tdtomato	Lapin	1:300	600-401-379	Rockland
TH	Poulet	1:500	Ab76442	Abcam
TH	Lapin	1:400	AB152	Sigma-Aldrich
VIP	Lapin	1:500	20077	Immunostar
VGLUT1	Lapin	1:500	ABN1647	Sigma-Aldrich
VGLUT2	Cobaye	1:400	135404	Synaptic System

Tableau 9 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunohistochimie.

Anticorps secondaire	Espèce hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
Alexa Fluor 488 anti chèvre	Âne	1/300	A-11055	ThermoFisher
Alexa Fluor 555 anti chèvre	Âne	1/300	A-21432	ThermoFisher
Alexa Fluor 647 anti chèvre	Âne	1/200	A-21447	ThermoFisher
Alexa Fluor 488 anti cobaye	Chèvre	1/300	A-11073	ThermoFisher
Alexa Fluor 647 anti cobaye	Âne	1/200	706-605-148	Jackson Immunoresearch
Alexa Fluor 594 anti poulet	Âne	1/300	FP-SD1110	Interchim
Alexa Fluor 488 anti lapin	Poulet	1/300	A-21441	ThermoFisher
Alexa Fluor 555 anti lapin	Âne	1/300	A-31572	ThermoFisher
Alexa Fluor 647 anti lapin	Âne	1/300	A-31573	ThermoFisher
Alexa Fluor 488 anti rat	Chèvre	1/300	A-11006	ThermoFisher

Tableau 10 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour l'immunohistochimie.

(iii) Immunocytochimie

Les cellules sont rincées trois fois dans du DPBS et fixées pendant 10 minutes dans du PFA 4 %. Après trois rinçages avec du DPBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution de DPBS comportant 0.1 % de tritonX-100 pendant 10 minutes. Pour les anticorps nécessitant un démasquage antigénique (5-bromo-2´-désoxyuridine (BrdU), Ki67 et Sex determining region Y-box 2 (Sox2)), l'étape de perméabilisation est précédée par une incubation de 20 minutes avec une solution de citrate de sodium 0.1% bouillant, suivie de trois rinçages au DPBS. 3 nouveaux rinçages sont effectués avant de procéder à la saturation des sites aspécifiques à l'aide d'une solution de PBS contenant 1 % de BSA et 0.1 % de Tween20 (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes. L'incubation avec les anticorps primaires (dilués dans la solution de saturation, **tableau 11**) est ensuite réalisée en chambre humide à 4 °C pendant une nuit. Les cellules sont ensuite rincées par 3 fois dans du DPBS puis incubées avec les anticorps secondaires (**tableau 12**) pendant 2 heures à température ambiante et dans l'obscurité. Après trois derniers rinçages, les noyaux sont marqués avec une solution de DAPI au 1/500e et les cellules sont montées entre lame et lamelle dans le mowiol.

L'observation des lames est réalisée à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser IX83 FV3000. Les images sont acquises grâce au logiciel Fluoview puis analysées par le logiciel ImageJ.

Antigène	Espèce hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
BrdU	Rat	1 :200	OBT0030	AbDSerotec
DCX	Lapin	1 :200	4604	Cell Signalling
CD31	Rat	1 :1000	553370	BDPharmingen
GFAP	Lapin	1 :500	Z0334	Dako
GFAP	Poulet	1 :1000	ab4674	Abcam
Ki67	Lapin	1 :200	ab16667	Abcam
Nestine	Souris	1 :250	MAB353	Sigma-Aldrich
PSA-NCAM	Souris	1 :200	MAB5324	Sigma-Aldrich
Tuj1	Souris	1:400	T8660	Sigma-Aldrich
Tuj1	Lapin	1 :200	ab52623	Abcam
PGP9.5	Cobaye	1:400	Ab10410	Abcam
PGP9.5	Lapin	1:6500	AB1761-I	Sigma-Aldrich
S100-β	Lapin	1:200	ab52642	Abcam
Sox2	Lapin	1:200	ab97959	Abcam
Sox2	Souris	1:200	sc365964	SantaCruz
Sox10	Souris	1:200	sc365692	SantaCruz

Tableau 11 : Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunocytochimie.

Anticorps secondaire	Espèce hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
Alexa Fluor 488 anti souris	Poulet	1/500	A-21200	ThermoFisher
Alexa Fluor 488 anti souris	Souris	1/250	A-21202	ThermoFisher
Alexa Fluor 488 anti cobaye	Chèvre	1/300	A-11073	ThermoFisher
Alexa Fluor 568 anti poulet	Chèvre	1/250	A-11041	ThermoFisher
Alexa Fluor 555 anti lapin	Âne	1/500	A-31572	ThermoFisher
Alexa Fluor 594 anti rat	Âne	1/250	A-21209	ThermoFisher

Tableau 12 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour l'immunocytochimie.

[4]. Isolement des neurones cardiaques

Les neurones cardiaques ont été isolés à partir de souris C57bl6 et calb-cre, indépendamment du sexe, âgées de 8 à 20 semaines. Ce protocole a été adapté à partir du protocole d'isolement des neurones de DRG du Dr Emmanuel Deval.

(i) Dissection

La souris est héparinée (5000 U/kg) et euthanasiée avec une injection intrapéritonéale de pentobarbitale (100 mg/kg). Après réalisation d'une thoracotomie, le cœur est prélevé et rincé par deux fois dans une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) froide (HBSS : 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.3 mM Na_2HPO_4, 0.4 mM KH_2PO_4, 16 mM glucose, 4 mM $NaHCO_3$, 1 % de Pénicilline / Streptomycine (P/S, Gibco), 5 mM HEPES, pH = 7.45 (NaOH)). Le cœur est ensuite fixé dans une boite de pétri à l'aide de trois minuties placées dans chacune des deux oreillettes ainsi qu'à l'apex, permettant d'exposer la face dorsale du cœur. Après avoir retiré les poumons ainsi que les principaux gros vaisseaux du cœur, la zone tissulaire située entre les deux oreillettes est disséquée et découpée en petits morceaux. Le prélèvement est ensuite centrifugé à 800 RPM pendant 4 minutes à 10 °C, et le surnageant éliminé, afin de limiter la contamination par les hématies.

(ii) Digestion enzymatique et dissociation mécanique des cellules

Le tissu est digéré dans une solution d'HBSS supplémentée avec 5 mM de Ca^{2+}, en présence de collagénase de type II (3 mg/mL, Worthington) et de dispase II (7,5 mg/mL, Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à 37 °C. Une deuxième étape de digestion est ensuite réalisée dans une solution de trypsine-EDTA 0.23% (Sigma-Aldrich) pendant 36 minutes à 37

°C. Après élimination du surnageant, la mixture est lavée une fois dans du milieu Neurobasal (NBA) complet (NBA complet : NBA™ (Gibco) supplémenté avec 5 % de sérum de cheval (Gibco) 1 % P/S, 2 % de B-27™ (Gibco) et 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich)). Les cellules sont ensuite triturées dans du NBA complet avec des pipettes Pasteur rodées de diamètres décroissants dont la surface a été recouverte de sérum de veau fœtal afin de limiter l'adhérence cellulaire. Une fois les cellules correctement dissociées, celle-ci sont centrifugées à 1000 RPM pendant 5 minutes et le culot repris dans du milieu NBA complet, permettant d'éliminer toutes traces résiduelles d'enzyme.

(iii) Ensemencement cellulaire

Les cellules sont ensemencées dans 400 µL de NBA complet dans des boites de Petri 35 mm recouvertes de poly-D-lysine (50 µg/mL, Sigma-Aldrich) et de laminine (10 µg/mL, Sigma-Aldrich). Après une période de repos de 4 à 5 heures à 37 °C, le volume du milieu de culture est ajusté à 2 mL par boite par ajout de NBA complet frais. Les cellules sont ensuite maintenues dans une atmosphère humide à 37 °C, 5 % CO_2 pendant 24 à 72 heures.

[5]. Étude électrophysiologique par la technique de patch-clamp

(i) Généralités

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires spécialisées dans le transfert d'ions entre les compartiments intra et extracellulaires. Ces mouvements de charges (positives ou négatives) entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule constituent ainsi des courants électriques, exprimés en ampère. La perméabilité de la membrane aux différentes espèces ioniques est également responsable de la création d'une différence de potentiel entre la face interne et la face externe de la membrane appelée potentiel membranaire. Ce potentiel membranaire traduit une variation de quantité de charges de part et d'autre de la membrane plasmique et s'exprime en volt. Les canaux ioniques jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement physiologique des neurones en assurant la communication neuronale par l'intermédiaire de la genèse de potentiels d'action et de la libération des neurotransmetteurs. L'étude électrophysiologique des neurones intracardiaques constitue donc une étape importante dans la compréhension de leur fonctionnement.

(ii) La technique de patch-clamp : principe

La technique de patch-clamp est une approche qui permet d'étudier les propriétés électriques membranaires (courants ioniques traversant la membrane, potentiel membranaire…) des cellules (Neher and Sakmann, 1976). Initialement développée pour l'enregistrement des courants ioniques à l'échelle unitaire, cette technique consiste à réaliser un accolement très étroit entre une pipette de verre, reliée à un système de mesure et d'amplification, et une portion de la membrane cellulaire. Cet accolement très étroit (aussi appelé gigaohm seal) est obtenu en touchant délicatement la surface cellulaire avec un fin capillaire de verre (comportant un diamètre d'ouverture de l'ordre du micromètre). L'application d'une dépression dans le capillaire permet de conduire à une invagination de la membrane et à un accolement très étroit entre la membrane et le verre du capillaire, isolant électriquement cette portion membranaire (configuration cellule-attachée, **figure 37**). A partir de la configuration cellule attachée, plusieurs autres configurations peuvent être obtenue, permettant l'enregistrement de courants unitaires (résultant de l'ouverture de quelques canaux ioniques) ou globaux. Au cours de ces travaux de thèse, c'est la configuration cellule entière qui a été utilisée. Une fois le gigaohm seal obtenu, une seconde dépression est appliquée afin de conduire à la rupture de la membrane, ce qui permet d'atteindre la configuration cellule entière (**figure 37**). Cette configuration permet d'accéder aux paramètres électriques de l'ensemble de la cellule (enregistrement de courant globaux résultant de la dynamique d'ouverture de l'ensemble des canaux ioniques membranaires, étude du potentiel membranaire…).

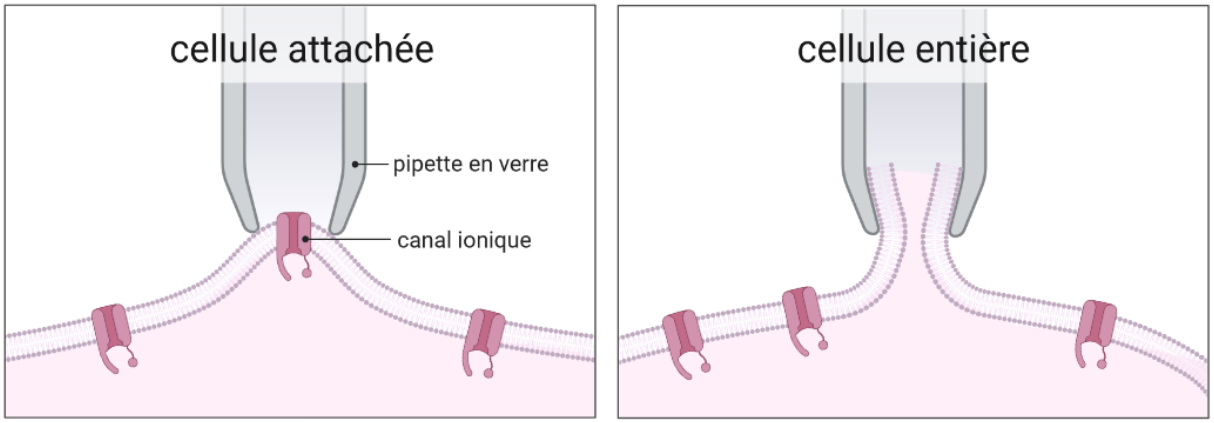


Figure 37 : Passage de la configuration cellule attachée à la configuration cellule entière en patch-clamp.

La technique de patch-clamp offre la possibilité de contrôler le potentiel membranaire et d'enregistrer les courants ioniques (mode voltage imposé ou voltage-clamp) ou d'enregistrer les variations de potentiels membranaires en réponse à l'injection de courant (mode courant imposé ou current-clamp).

(iii) Matériel et dispositif expérimental

Le dispositif expérimental d'une installation de patch-clamp comprend les éléments suivants (**figure 38**) :

- Un microscope : il permet la visualisation des cellules et d'approcher la pipette à proximité de la surface membranaire
- Une électrode de mesure en contact avec la solution intracellulaire
- Une électrode de référence plongée dans le milieu extracellulaire
- Un amplificateur : il permet d'amplifier et de filtrer le signal, de choisir le mode voltage- ou current-clamp et de corriger les courants de capacité
- Un convertisseur analogique/numérique : il permet de traduire les signaux analogiques en grandeurs numériques exploitables informatiquement
- Un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition et d'analyse

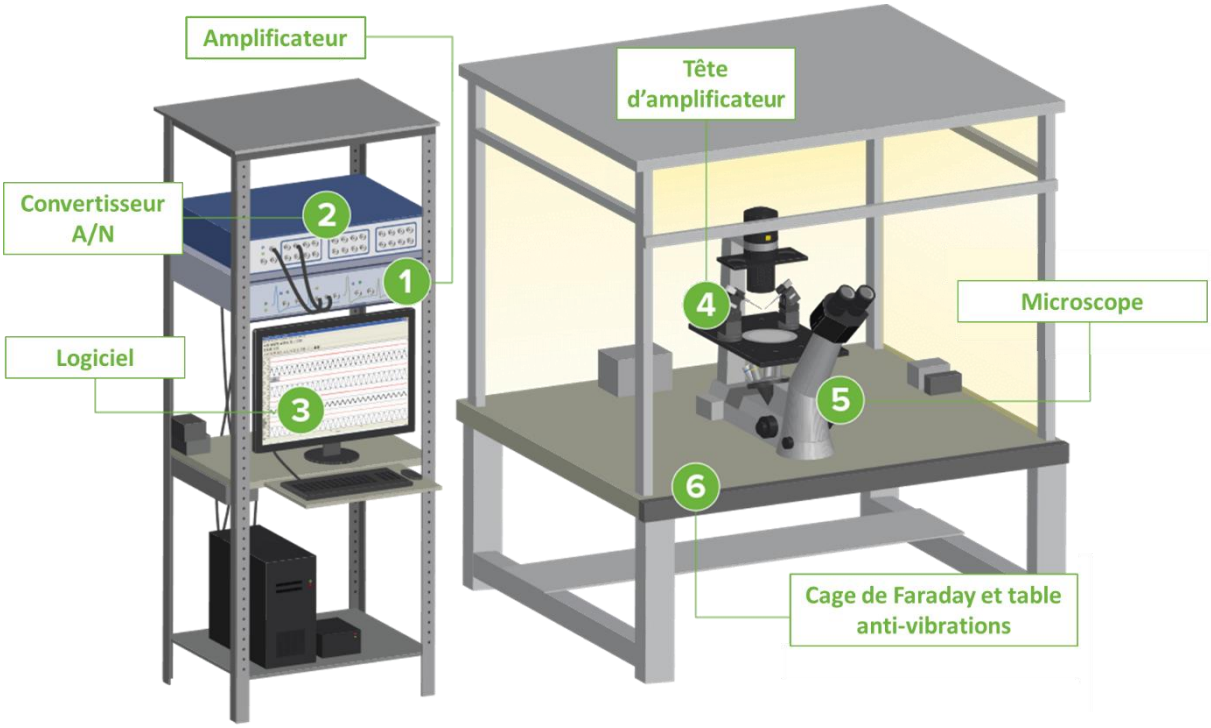


Figure 38 : Dispositif expérimental de patch-clamp. (schéma modifié à partir du site moleculardevices.com).

Dans notre étude, les neurones cardiaques sont observés à l'aide d'un microscope optique inversé IX71 (Olympus). Ce microscope est équipé d'un dispositif d'illumination LED pE-300 (CoolLED) permettant l'identification des neurones exprimant la tdtomato. Les pipettes de verre (PG150T, Harvard Apparatus) sont étirées à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige) pour obtenir une résistance finale de 3 MOhm (expériences de voltage-clamp) ou situées entre 4 et 5 MOhm (expériences de current-clamp). Les mesures électriques sont effectuées à l'aide

d'une électrode de mesure Argent/Argent chlore reliée à une tête d'amplificateur CV202-AU et à un amplificateur Axopatch 200B (Molecular devices). Le signal est filtré avec un filtre passe-bas de 5 kHz et la fréquence d'échantillonnage est de 20 kHz. Le signal analogique est transformé en signal numérique par un convertisseur analogique/numérique Digidata 1550 B (Molecular devices). L'acquisition et le traitement des données sont réalisés grâce au logiciel pClamp (version 11, Molecular devices). L'ensemble des expériences de patch-clamp sont conduites dans les 30 heures suivant la dissociation afin d'éviter toute dérive cellulaire liée à la culture. Une modification de certaines propriétés électrophysiologiques a en effet été constatée après ce délai de 30 heures.

(iv) Etude des propriétés membranaires passives et actives en current-clamp

Le mode current-clamp permet d'étudier les propriétés membranaires passives et actives des neurones intracardiaques. Pour ces enregistrements, les pipettes de verres sont remplies à l'aide d'une solution intracellulaire dont la composition est la suivante : 130 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP, 10 mM Na_2-phosphocreatine et 0.3 mM Na-GTP, (pH ajusté à 7.2 avec du KOH ; osmolarité de 335.6 mOsm). La solution extracellulaire baignant les cellules est quant à elle composée de 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose et 10 mM HEPES (pH ajusté à 7.4 avec du NaOH ; osmolarité de 337.5 mOsm). Cette différence de composition ionique entre les deux solutions créée un potentiel de jonction de +16 mV qui n'a pas été corrigé lors des enregistrements.

a) Propriétés membranaires passives

Les valeurs de capacité membranaire sont obtenues en voltage-clamp en utilisant la fonctionnalité du logiciel pClamp. Le potentiel de repos des neurones est mesuré juste après l'obtention de la configuration cellule entière en configuration I=0 (aucun courant injecté). La résistance membranaire au repos (notée Rinput) reflète la quantité de canaux ioniques ouverts au repos. Elle est déterminée en mesurant l'amplitude de variation de potentiel obtenue suite à l'injection de courants hyperpolarisants (de -10 pA à -40 pA, incrément de -10 pA, **figure 39**)

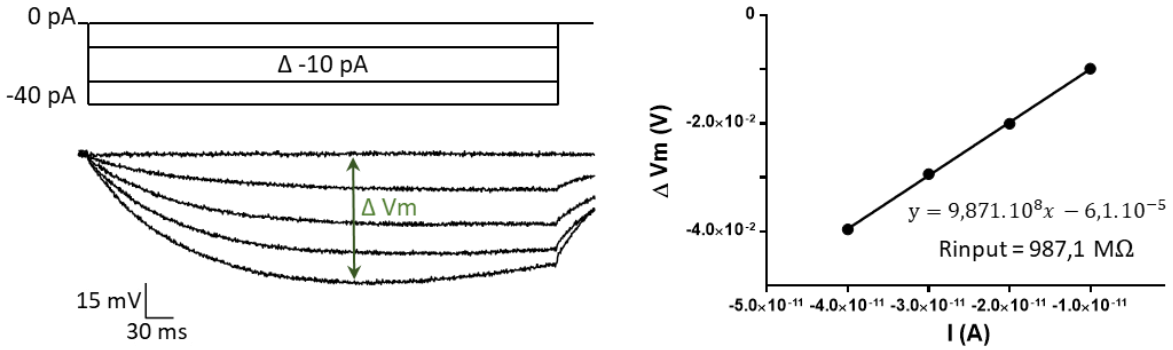


Figure 39 : Détermination de la résistance membranaire au repos.

b) Propriétés membranaires actives

Protocole 1 : étude de l'excitabilité neuronale (rhéobase et capacités de décharge)

L'excitabilité des neurones intracardiaques est étudiée en injectant un courant dépolarisant d'amplitude croissante (de 20 à 400 pA ; incrément de 20 pA) pendant 500 ms. Ce protocole permet de déterminer l'intensité minimale de courant nécessaire à l'obtention du premier potentiel d'action (rhéobase), la nature phasique ou accommodante du neurone ainsi que le nombre maximal de potentiels d'action émis.

Protocole 2 : étude des caractéristiques du potentiel d'action

Les propriétés du potentiel d'action sont déterminées après injection d'un courant dépolarisant d'amplitude croissante (de 40 à 1200 pA ; incrément de 40 pA) sur un intervalle de temps très court de 2 ms. Les caractéristiques du potentiel d'action (APD_{50}, vitesse maximale de dépolarisation et repolarisation, amplitude et durée de l'hyperpolarisation) sont mesurées sur le deuxième potentiel d'action obtenu après atteinte du seuil (**figure 40**).

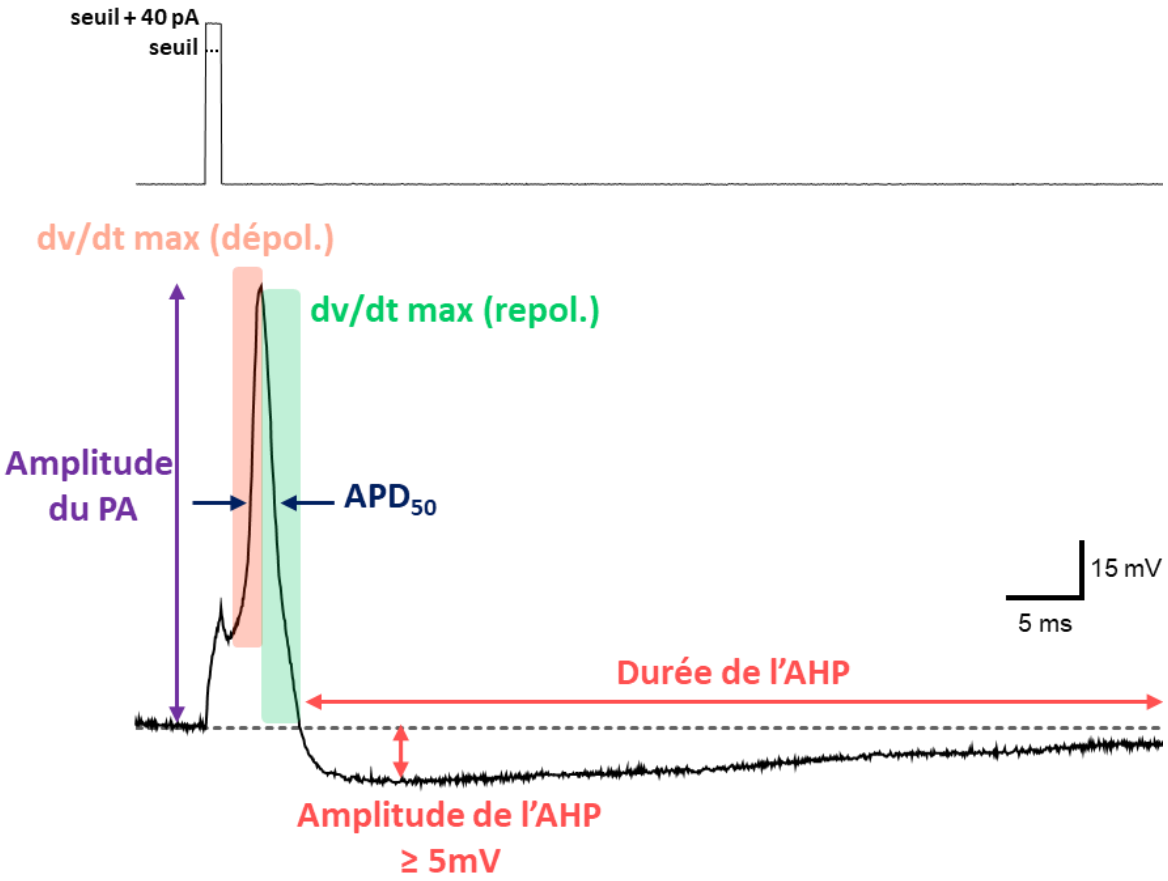


Figure 40 : Détermination des propriétés du potentiel d'action neuronal.

(v) Réponses pharmacologiques

La réponse pharmacologique à plusieurs substances neuro-modulatrices est étudiée en voltage-clamp (à un potentiel de maintien de -60 mV) et en current-clamp (I=0). Les substances (**tableau 13**) sont perfusées à l'aide d'un système de perfusion par gravité (Ala Scientific Instruments).

Substance pharmacologique	Concentration utilisée	Fournisseur
Acétylcholine	100 - 500 µM	Sigma-Aldrich
ATP	300 µM	Sigma-Aldrich
BK	0.2-0.5 µM	Bachem
Oxotremorine-M	1 µM	Tocris Bioscience

Tableau 13 : Liste des substances pharmacologiques utilisées.

(vi) Etude des courants ioniques en voltage-clamp

a) Courants sodiques voltage-dépendants

Pour ces enregistrements, les pipettes de verres sont remplies à l'aide d'une solution intracellulaire dont la composition est la suivante : 140 mM CsF, 10 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES et 1 mM EGTA (pH ajusté à 7.2 avec du CsOH ; osmolarité de 314 mOsm). La solution extracellulaire baignant les cellules est quant à elle composée de 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM HEPES et 100 µM de Cd^{2+} (pH ajusté à 7.4 avec du NaOH ; osmolarité de 333 mOsm). Cette différence de composition ionique entre les deux solutions créée un potentiel de jonction de +8,4 mV qui a été corrigé lors des enregistrements.

Le courant sodique est observé en imposant une dépolarisation de -120 mV à -10 mV pendant 30 millisecondes. Chacune de ces dépolarisations sont séparées par un intervalle de temps de 5 secondes. L'inactivation du canal est étudiée en imposant un pré-pulse de -140 à +30 mv (incrément de 10 mv) pendant 500 millisecondes suivie d'un pulse à -10 mV pendant 30 millisecondes. La courbe d'inactivation est obtenue à partir des amplitudes de courant obtenues lors du second pulse, en représentant le rapport I/Imax en fonction du potentiel de pré-pulse. Les courants de capacité et de fuite ont été éliminés en utilisant un protocole P/4 et les résistances séries compensées électroniquement (70 % à 80 %). La nature des courants sodiques a été étudiée en perfusant de la TTX (Sigma-Aldrich) ainsi que de l'A-803467 (A-80, Sigma Aldrich), inhibiteur spécifique de l'isoforme $Na_v1.8$.

b) Courants calciques voltage-dépendants

Pour ces enregistrements, les pipettes de verres sont remplies à l'aide d'une solution intracellulaire dont la composition est la suivante : 120 mM CsCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 40 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM BAPTA, 4 mM Mg-ATP, 0.1 mM leupeptine, 10 mM Na_2-phosphocreatine et 0.3 mM Tris-GTP (pH ajusté à 7.3 avec du CsOH ; osmolarité de 326.7 mOsm). La solution extracellulaire baignant les cellules est quant à elle composée de 140 mM TEACl, 5 mM $BaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM 4-aminopyridine (4-AP), 10 mM glucose et 10 mM HEPES (pH ajusté à 7.4 avec du TEAOH ; osmolarité de 320 mOsm). Cette différence de compositions ioniques entre les deux solutions créée un potentiel de jonction de +10,4 mV qui a été corrigé lors des enregistrements.

La courbe courant-potentiel est obtenue en imposant une dépolarisation de -80 mV à +40 mV en 300 millisecondes (protocole de rampe). Le courant porté par le canal calcique de type N (Cav2.2) est spécifiquement étudié en perfusant 1 µM d'oméga-conotoxine GVIA (Smartox biotechnology), inhibiteur spécifique des canaux calciques de type N.

[6]. Culture des cellules intraganglionnaires non neuronales

Le protocole d'isolement des neurones intracardiaques a également été utilisé pour l'étude des autres cellules (non neuronales) présentes au sein des ganglions intracardiaques.

(i) Conditions de culture et repiquage des sphères

Après mise en œuvre du protocole d'isolement neuronale (voir partie [4] (i) et (ii)), le culot est repris dans du milieu S+ (milieu S+ : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12, Gibco) supplémenté avec 1 % de P/S, 1 % de B-27^{TM}, 20 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF, Gibco) et 10 ng/mL de facteur de croissance des fibroblastes (FGF, Gibco) et la suspension cellulaire est filtrée au travers d'un tamis cellulaire pluriStrainer® de 20 µm (pluriSelect) afin d'éliminer les neurones. Après numération sur cellule de Malassez, les cellules sont ensemencées sur des boites de culture de diamètre 6 cm standard (ThermoFisher) ou recouverte de poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA, Sigma-Aldrich), traitement empêchant l'adhérence cellulaire. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 37 °C, 5 % CO_2.

Au bout de 4 jours, des sphères primaires (sphères de type I) commencent à apparaitre en culture. A partir du 7e jours de culture, ces sphères sont collectées et dissociées mécaniquement à la micropipette et à l'aide d'une aiguille 29G (BD Micro-Fine). La suspension cellulaire est filtrée sur tamis cellulaire de 20 µm et ensemencée en boite de culture à raison de 100 000 à 300 000 cellules par boite. Ces cellules permettent alors la formation de sphères secondaires. Des sphères de type III peuvent également être obtenue en réitérant le protocole de repiquage au bout de 7 jours à partir des sphères II (**figure 41**).

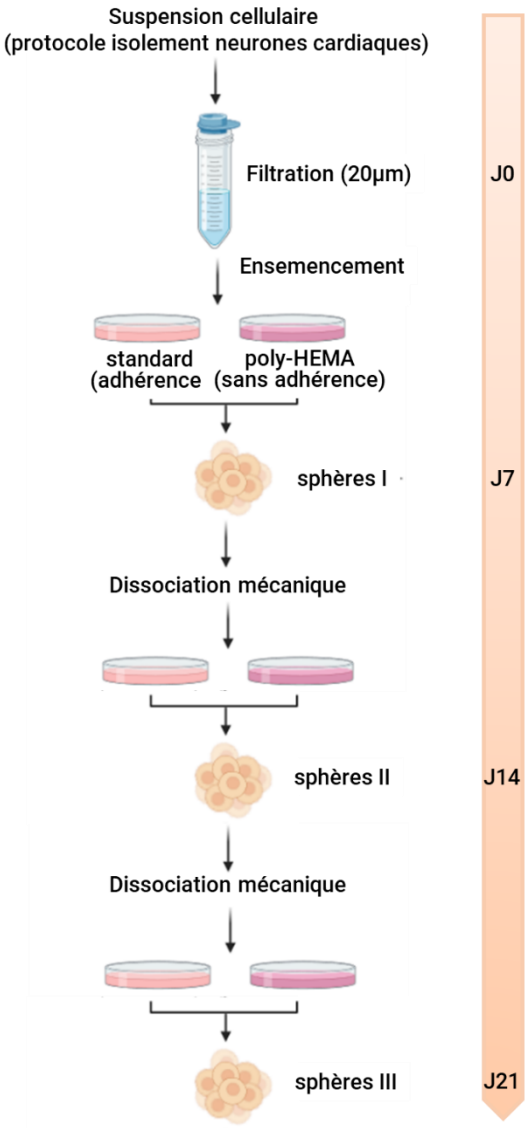


Figure 41 : Protocole de culture et de repiquage des sphères issus des ganglions intracardiaques

(ii) Etude des sphères : composition cellulaire, capacité d'auto-renouvellement et de différenciation

Les sphères obtenues en culture sont étudiées en déterminant leur capacité à former de nouvelles sphères (auto-renouvellement), la nature des cellules qui les composent et en évaluant leurs capacités de différenciation (**figure 42**).

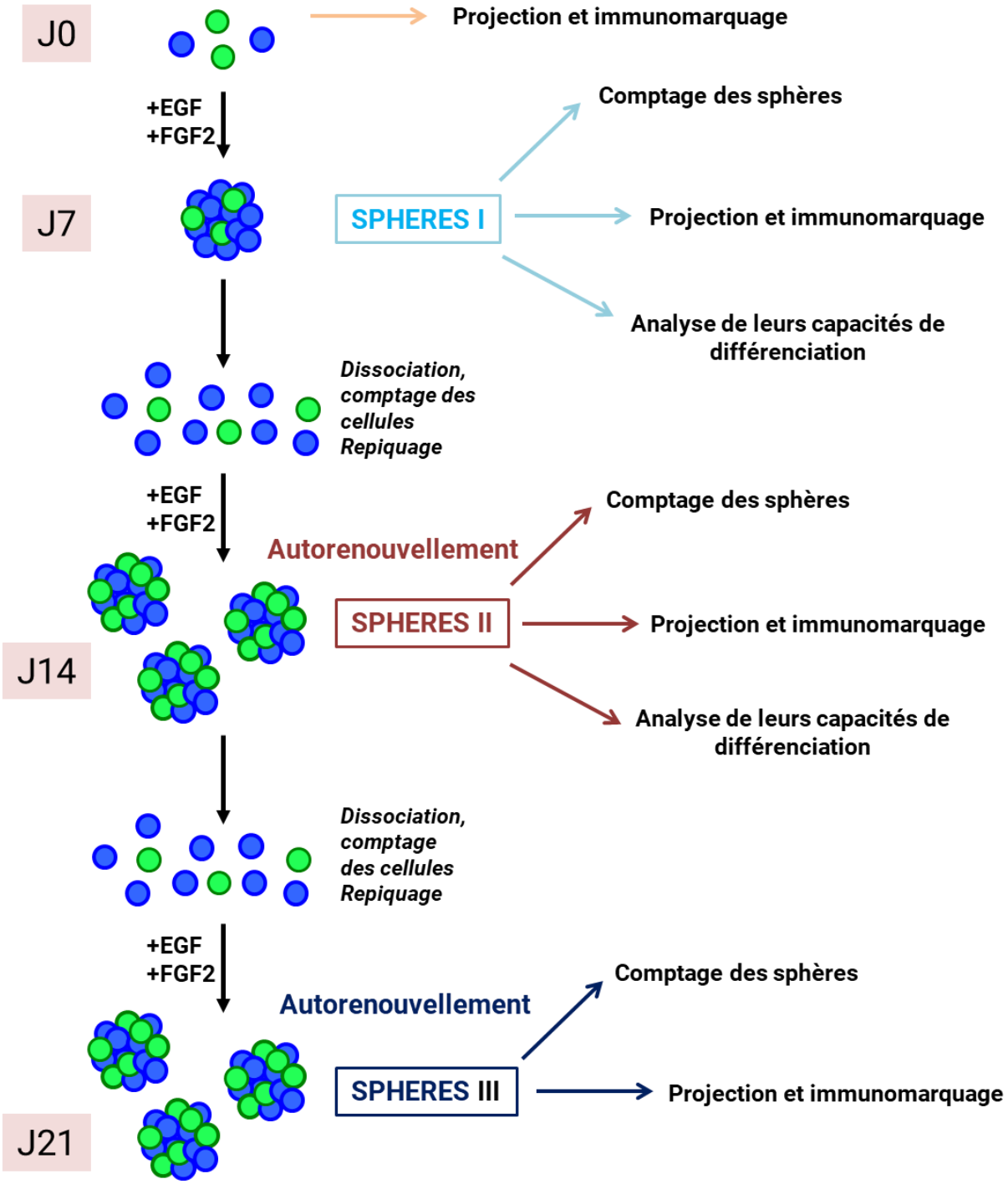


Figure 42 : Protocole d'étude des sphères obtenues après isolement des cellules intra-ganglionnaires cardiaques.

a) Capacités d'auto-renouvellement

Le protocole de repiquage permet d'évaluer la capacité d'amplification et de renouvellement des sphères primaires. Les capacités d'auto-renouvellement sont estimées en quantifiant, avant chaque repiquage, le nombre total de sphères (primaires, secondaires ou tertiaires) obtenues. Cette quantification est complétée par le dénombrement des cellules issues de la dissociation mécanique des sphères.

b) Caractérisation des cellules des sphères

Les sphères (primaires, secondaires ou tertiaires) sont collectées et projetées sur lame par centrifugation à 5000 RPM pendant 8 minutes (Cytospin, Thermo Scientific). Les cellules sont ensuite fixées au PFA 4 % pendant 30 minutes. Des étapes d'immunomarquage sont ensuite réalisées afin d'identifier la nature des cellules composant les sphères. Afin d'étudier le phénotype des cellules initialement présentes dans les ganglions cardiaques, ce protocole est également appliqué à J0, sur un échantillon de la suspension cellulaire initiale issue de la dissociation.

c) Etude des capacités de différenciation

Sous microscope, les sphères sont collectées et ensemencées sur des lamelles recouvertes de poly-Lysine. Les cellules sont cultivées dans du milieu S+ additionné de 1 µM de BrdU (Roche) pendant 24 à 48 heures. La BrdU est un analogue nucléosidique de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules lors de la réplication. Cette étape permet ainsi de distinguer les cellules issues d'une division cellulaire de celles préalablement existantes. Les sphères sont ensuite incubées dans un milieu de différenciation pendant une à deux semaines avant de procéder à des expériences d'immunomarquage. La composition des trois milieux de différenciation utilisés est indiquée dans le **tableau 14** ci-dessous.

Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
DMEM-F12, 1% B27, 1% P/S, BDNF (20 ng/mL), FGF (10 ng/mL)	DMEM-F12, 1% B27, 1% P/S, FGF (10 ng/mL), NGF (40 ng/mL)	DMEM-F12, 1% B27, 1% P/S, BDNF (20 ng/mL), NGF (40 ng/mL), FGF (10 ng/mL)

Tableau 14 : Composition des différents milieux de différenciation utilisés.

[7]. Analyse des données et traitement statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM, standard error of the mean). Les données sont analysées à l'aide des logiciels GraphPad Prism (version 6, GraphPad), ImageJ (NIH), Imaris (Bitplane), Microsoft Excel (excel 2016, Microsoft Office) et pClamp (Molecular devices). Les analyses statistiques sont réalisées par l'intermédiaire d'un t.test de student, d'un test Mann-Whitney ou du test du chi^2 (nature du test statistique précisée dans la légende des figures). Les différences sont considérées comme significatives quand $p<0.05$ (*****), $p<0.01$ (******), $p<0.001$ (*******) et $p<0.0001$ (********).

Résultats

Cette partie s'articule autour de trois chapitres visant à améliorer notre compréhension du SNIC.

Dans un premier temps, nous avons conduit une série d'expériences visant à caractériser le SNIC murin, modèle jusque-là très peu décrit dans la littérature. Ces travaux nous ont notamment permis de mettre en évidence l'existence de différentes populations de neurones cardiaques se distinguant par l'expression de différents marqueurs moléculaires ainsi que par différents comportements électrophysiologiques.

Dans la continuité de ces travaux, nous nous sommes ensuite consacrés à l'étude d'une population spécifique de neurones intracardiaques, caractérisée par l'expression de la protéine calbindine.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux cellules non neuronales participant à la complexité des structures ganglionnaires intracardiaques. Nous avons notamment mis en évidence l'existence de nombreuses cellules exprimant le facteur de transcription Sox2 et qui pourraient participer à la néogenèse de neurones *in vitro*.

Chapitre 1 : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système nerveux intracardiaque murin

[1]. Contexte de l'étude

Le contrôle nerveux des fonctions cardiaques implique des structures nerveuses centrales et périphériques dont l'action coordonnée conduit à la modulation des paramètres cardiaques telles que la fréquence cardiaque, la force contractile ou encore la vitesse de conduction de l'influx électrique. Ces mécanismes de régulation font notamment intervenir un ensemble de neurones localisés au sein du tissu cardiaque et formant le SNIC. Initialement, ces neurones furent seulement considérés comme de simples relais parasympathiques. Toutefois, les études menées depuis une trentaine d'années suggèrent une organisation plus complexe de ce système. Elles proposent notamment que le SNIC serait impliqué dans la mise en place de boucles de régulations locales et indépendantes grâce à la présence de neurones sensoriels, d'interneurones ainsi que de neurones moteurs. Cette organisation complexe a notamment conduit John Andrew Armour à proposer le concept de « petit cerveau cardiaque » (Armour, 2007).

Les études phénotypiques et électrophysiologiques menées sur différents modèles ont permis de révéler la nature hétérogène des neurones composant le SNIC (Selyanko, 1992; Xu and Adams, 1992a; Xi et al., 1994; Edwards et al., 1995; Horackova et al., 1999; Richardson et al., 2003; Hoover et al., 2009; Rysevaite et al., 2011b; Pauziene et al., 2016). Toutefois, le rôle fonctionnel de chacune de ces populations neuronales n'a pas encore pu être déterminé. De telles investigations permettraient de clarifier l'influence des neurones intracardiaques sur le fonctionnement physiologique et physiopathologique du cœur. Ceci apparait d'autant plus important depuis qu'il a été démontré que ces neurones participent à la genèse et l'entretien de troubles du rythme cardiaque (Choi et al., 2010; Gibbons et al., 2012; Avazzadeh et al., 2020).

Les récentes avancées dans le domaine de l'ingénierie génétique offrent désormais la possibilité de décrypter précisément le fonctionnement du réseau neuronal intracardiaque. Ces approches sont en revanche principalement développé sur le modèle murin, modèle très peu étudié dans le contexte du SNIC.

Devant ce manque cruel d'information chez la souris et dans l'objectif de décrypter davantage le fonctionnement du SNIC, nous avons donc conduit une série d'expériences visant à caractériser les neurones intracardiaques d'un point de vue phénotypique, électrophysiologique et pharmacologique. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal Heart Rhythm en avril 2022.

[2]. Résumé des travaux

Dans un premier temps, nous avons développé une approche de transparisation cardiaque permettant d'étudier l'innervation cardiaque autonome à l'échelle du cœur entier. Cette approche permet de visualiser la densité de l'innervation catécholaminergique cardiaque (marquée par la TH) et de visualiser l'ensemble des ganglions qui forment le SNIC. Cette innervation autonome a notamment été quantifiée en déterminant le nombre de ganglions, le volume ganglionnaire et la longueur totale des fibres catécholaminergiques innervant les ventricules.

Nous nous sommes par la suite intéressés aux différents phénotypes neuronaux retrouvés chez la souris. Nos expériences d'immunohistomarquage nous ont ainsi permis d'identifier l'expression de 7 marqueurs neuronaux distincts (ChAT, TH, nNOS, calbindine, VGLUT2, NPY et CART) au sein de ces neurones intracardiaques.

L'étude des propriétés électriques de ces neurones par la technique de patch-clamp révèle l'existence de deux profils d'excitabilité distincts, déterminant des neurones phasiques (peu excitables) et des neurones accommodants. De plus, ces neurones peuvent également être différenciés par la présence ou l'absence d'une phase d'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action.

Enfin, nous avons également démontré que ces neurones étaient capables de répondre à différentes substances pharmacologiques (Ach, ATP et BK).

En conclusion, ces résultats montrent que le SNIC murin présente une complexité moléculaire et fonctionnelle similaire à celle des autres espèces. La souris semble ainsi être un modèle approprié pour tenter d'élucider le rôle individuel des différentes populations neuronales dans la modulation des fonctions cardiaques et la genèse d'arythmies.

[3]. Article

ARTICLE IN PRESS

Molecular and functional characterization of the mouse intrinsic cardiac nervous system

Guénaëlle Lizot, PhD,* Côme Pasqualin, PhD,* Audrey Tissot, MSc,†
Stephane Pagès, PhD,† Jean-François Faivre, PhD,* Aurélien Chatelier, PhD*

*From the *PReTI Laboratory, UR 24184, University of Poitiers, Poitiers, France, and †Wyss Center for Bio and Neuroengineering, Campus Biotech, Geneva, Switzerland.*

BACKGROUND The intrinsic cardiac nervous system (ICNS) refers to clusters of neurons, located within the heart, that participate in the neuronal regulation of cardiac functions and that are involved in the initiation of cardiac arrhythmias. Therefore, deciphering its role in cardiac physiology and physiopathology is mandatory.

OBJECTIVE The aim of this study was to provide a phenotypic, electrophysiological, and pharmacological characterization of the mouse ICNS, which is still poorly characterized.

METHODS Global cardiac innervation and phenotypic diversity were investigated using immunohistochemistry on cleared murine hearts and on tissue sections. The patch clamp technique was used for the electrophysiological and pharmacological characterization of isolated mouse intracardiac neurons.

RESULTS We have identified the expression of 7 distinct neuronal markers within the mouse ICNS, thus proving the neurochemical diversity of this network. Of note, it was the first time that the existence of neurons expressing the calcium-binding protein calbindin, neuropeptide Y, and cocaine and amphetamine regulated transcript peptide was described in the mouse. Electrophysiology studies also revealed the existence of 4 different neuronal populations on the basis of their electrical behavior. Finally, we showed that these neurons can be modulated by several neuromodulators.

CONCLUSION This study showed that the mouse ICNS presents a molecular and functional complexity similar to other species and is therefore a suitable model to decipher the role of individual neuronal subtypes regarding the modulation of cardiac function and the initiation of cardiac arrhythmias.

KEYWORDS Intrinsic cardiac ganglia; Autonomic nervous system; Heart; Cardiac innervation; Peripheral neuron electrophysiology

(Heart Rhythm 2022;■:1–11) © 2022 Heart Rhythm Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

The neural control of the heart involves central and peripheral neurons that act interdependently to modulate cardiac parameters such as heart rate, conduction velocity, or contractility. As part of this cardiac neuronal regulation, the intrinsic cardiac nervous system (ICNS) is receiving increasing attention. Indeed, whereas intracardiac neurons were initially considered as simple parasympathetic postganglionic neurons, studies conducted over the past 30 years have suggested a more complex organization, including sensory, local regulatory, and motor neurons within intracardiac ganglia, finally leading to the concept of "little brain on the heart."[1]

Phenotypic studies have been conducted in many species to identify several neuronal subpopulations. Besides cholinergic phenotype, the presence of catecholaminergic, glutamatergic, and nitregic phenotypes have been described in intracardiac neurons.[2–10] This neurochemical diversity has been further confirmed by the expression of several neuropeptides, such as neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide, somatostatin, or cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide.[3,6,10–13]

From a functional point of view, several studies have also identified various types of cardiac neurons on the basis of their membrane electrical properties.[14–17] In guinea pig, electrophysiological experiments combined with a morphological characterization of intracardiac neurons led to the identification of 3 distinct types of neurons, including a putative sensory one.[16] However, evidence that this neuronal diversity is associated with a functional specialization of neurons is still lacking. Such a characterization would bring essential information to assess the influence of the cardiac neuronal network on the cardiac physiology. This would be even more important since the ICNS has also been implicated in arrhythmias. For example, atrial fibrillation (AF) has been correlated with excessive activity of intracardiac neurons[18] and specific stimulation of cardiac ganglia has been able to trigger AF.[19] Moreover, it has

Funding Sources: This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (DPC20171138946 and FDT202106012947). Disclosures: The authors have no conflicts of interest to disclose. **Address reprint requests and correspondence:** Dr Aurélien Chatelier, PReTI Laboratory, UR 24184, University of Poitiers, Pôle Biologie Santé, B36, 1 rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers, France. E-mail address: aurelien.chatelier@univ-poitiers.fr.

1547-5271/© 2022 Heart Rhythm Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2022.04.012

been showed that ablation of ganglionated plexus reduces AF and is now one of the strategies used in therapy.[20] Deciphering modulation of cardiac function by the ICNS through the role of individual neuronal subtypes is therefore essential but has been for a long time hindered by technical limitations.

Recent advances in genetic engineering have opened new opportunities to improve our understanding of the ICNS. For example, cre-lox systems combined with fluorescent reporter, optogenetic, or Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) approaches represent powerful tools to precisely address the function of 1 particular subtype of intracardiac neurons. However, because these technologies are almost exclusively available in mouse models, a better understanding of the mouse ICNS is required.

To date, the few existing studies focused on the mouse model identified choline acetyltransferase (ChAT), tyrosine hydroxylase (TH), and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) within cardiac neurons.[2,7] However, the expression of other neuronal markers has not yet been investigated.

Moreover, little is known about the electrical and pharmacological properties of mouse cardiac neurons. To our knowledge, only 1 study investigated this aspect.[21]

This study was therefore designed to better characterize the phenotypic, electrophysiological, and pharmacological properties of the mouse ICNS. Immunohistochemical experiments were conducted on cleared whole murine hearts and on tissue sections, allowing us to (1) quantify global autonomic cardiac innervation and (2) investigate the phenotypic heterogeneity of mouse intracardiac neurons. This examination was further strengthened by the characterization of passive and active electrical membrane properties as well as by pharmacological responses of isolated mouse cardiac neurons using the patch clamp technique.

Methods

Animals

Experimental procedures were performed using adult C57/BL6 mice (8–20 weeks) of either sex in accordance with the European Union Directive (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the local ethics committee "COMETHEA."

iDISCO heart clearing

Mouse hearts were stained and cleared using a modified iDISCO+ protocol.[22] Images were acquired with the ALICe's custom-built mesoSPIM microscope at Wyss Center, Geneva, Switzerland (see the Online Supplement).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 40–50 μm heart sections and acquired using a confocal laser scanning microscope (FV3000 Olympus, Tokyo, Japan) (see the Online Supplement).

Neuron dissociation

Ganglia were enzymatically digested with 2 mL of Hanks' Balanced Salt solution containing 3 mg/mL of collagenase type II (Worthington, Lakewood, NJ), 7.5 mg/mL of dispase II (Sigma-Aldrich, Lyon, France), and 0.25 mg/mL of deoxyribunuclease I (Sigma-Aldrich, Lyon, France; 30 minutes at 37°C). This was followed by incubation in 2 mL of trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid 0.25% supplemented with 0.25 mg/mL of deoxyribunuclease I (35 minutes at 37°C). Finally, cells were gently triturated with fire-polished Pasteur pipettes coated with fetal bovine serum and plated on laminin-coated 35 mm Petri dishes.

Electrophysiology

The electrical membrane properties of isolated cardiac neurons were determined using the whole-cell configuration of the patch clamp technique. Recordings were done at room temperature within 30 hours of isolation. Data acquisition and analysis were performed using pCLAMP software (Molecular Devices, San Jose, CA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Data are presented as mean ± SEM. The Mann-Whitney test was used for statistical comparison. Statistical significance was accepted when $P < .05$.

Results

Cholinergic and catecholaminergic innervation of the mouse heart

The neural control of the heart involves a combination of peripheral and intrinsic neural structures.[1] In order to investigate global cardiac innervation in the mouse, we performed detection of cholinergic (ChAT-IR) and catecholaminergic immunoreactivity (TH-IR) structures on cleared murine hearts.

This approach allowed us to appreciate the network of TH-IR nerves innervating mouse hearts (Online Supplemental Movie 1). Large bundles of nerves accessed the heart through the heart hilum, at the base of the heart, and extended toward the dorsal and ventral sides of both ventricles (Figure 1A). Ventricular innervation was mainly located at the epicardial surface even if thinner fibers could be seen deeper through the heart wall, especially coursing along the interventricular septum (Online Supplemental Movie 1).

ChAT-IR was used to identify intrinsic cardiac ganglia. As seen in Figure 1, ganglia were exclusively located in the dorsal side of the heart, in close proximity to the pulmonary veins. The mean number of ganglia per heart was 18 ± 3, ranging from 13 to 23 (n = 3) (Figure 1D). Most of them were characterized by TH-IR puncta, allowing us to see individual neurons (Figure 1A, insets 1 and 2). Unlike TH, ChAT-IR fibers were almost exclusively located around ganglionated plexus, where they interconnected multiple ganglia.

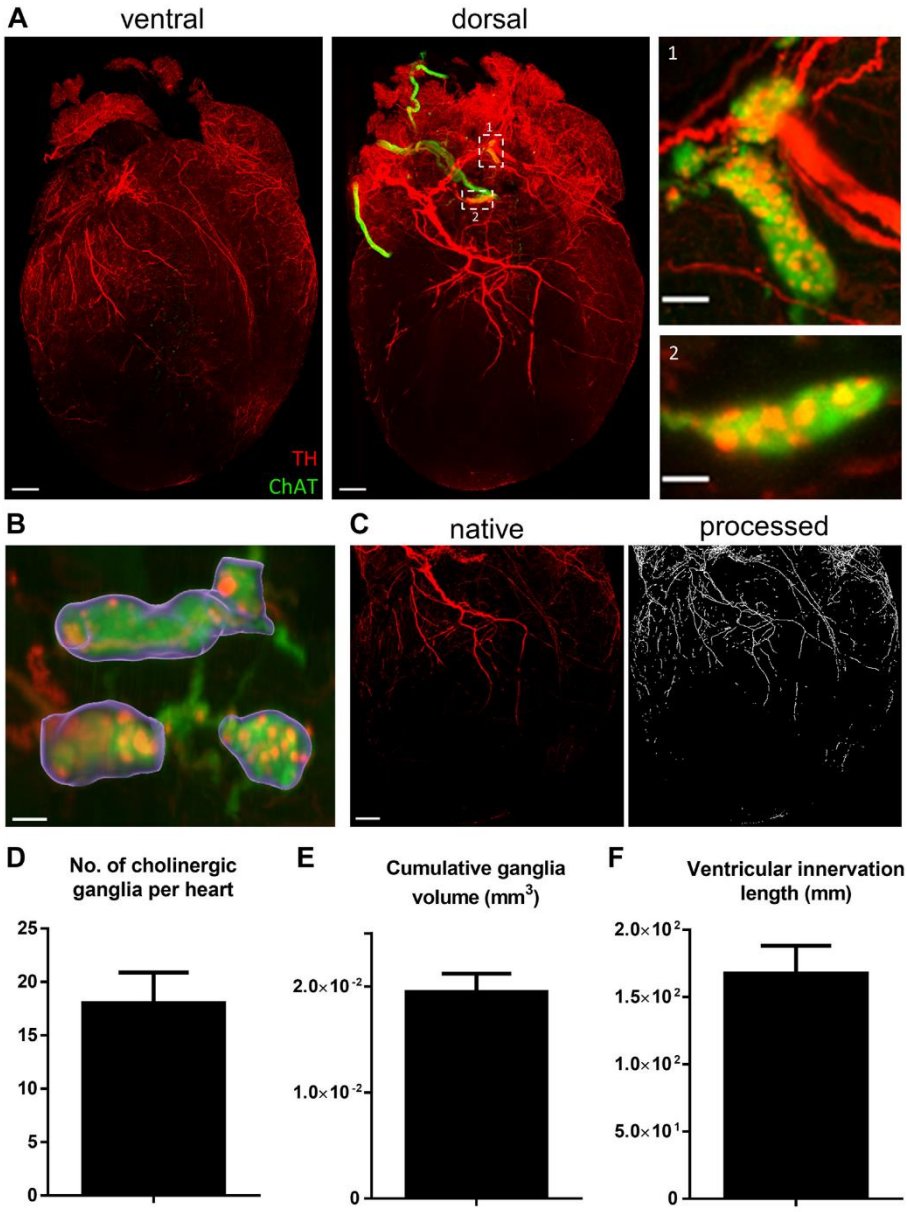


Figure 1 Cholinergic and catecholaminergic cardiac innervation. **A:** Three-dimensional (3D) projections of the ventral (2500 μm z-stack) and dorsal (2440 μm z-stack) sides of a cleared heart with tyrosine hydroxylase (TH; *red*) and cocaine and amphetamine regulated transcript (ChAT; *green*) staining. Magnification of ganglia is presented in *insets 1 and 2*. **B and C:** 3D image processing used for the quantification of ganglion volume (*purple*) and ventricular innervation (*white*). **D–F:** Assessment of the total number of ganglia per heart (panel D), the cumulative ganglion volume (panel E), and the total length of adrenergic fibers innervating both ventricles (panel F). Scale bar are 500 μm (panels A [ventral and dorsal] and C) and 100 μm (panels A [insets 1 and 2] and B).

Global cardiac innervation was further studied by developing a volumetric quantification approach using Imaris. Based on ChAT staining, the volume of each individual ganglion was estimated, resulting in a total ganglion volume of $(1.95 \pm 0.17) \times 10^{-2}$ mm^3 (n = 3) per heart (Figures 1B and 1E). The total length of TH-IR nerve fibers innervating both ventricles was quantified using ImageJ software. The total length was found to be $(1.68 \pm 0.21) \times 10^2$ mm (n = 3) (Figures 1C and 1F).

Neurochemical phenotype of mouse intracardiac neurons

Immunodetection of the cholinergic marker ChAT confirmed the prominent cholinergic phenotype of intrinsic cardiac

neurons (98.7%). This marker also labeled intra- and interganglionic nerve fibers, as well as varicose terminals surrounding neurons. Immunoreactivity for TH was detected in ~30% of cardiac neurons and in numerous nerve fibers (Figures 2A–2C).

Apart from the widely established cholinergic and catecholaminergic markers, we observed that a large proportion of neurons (46%) expressed the calcium-binding protein calbindin D-28k (calbindin). In neuronal somata, calbindin-IR was always observed in the cytoplasm and often accompanied by a strong nucleus staining (Figures 2D–2F). Calbindin-IR was also present in multiple intra- and interganglionic nerve fibers and occasionally in pericellular baskets surrounding neuronal somata (Figure 2D, inset). Calbindin neurons were always costained by ChAT, and 11.8% of cardiac neurons showed immunoreactivity for calbindin, ChAT, and TH (Table 1).

A small population of neurons stained with nNOS, the neuronal enzyme responsible for the synthesis of NO, were

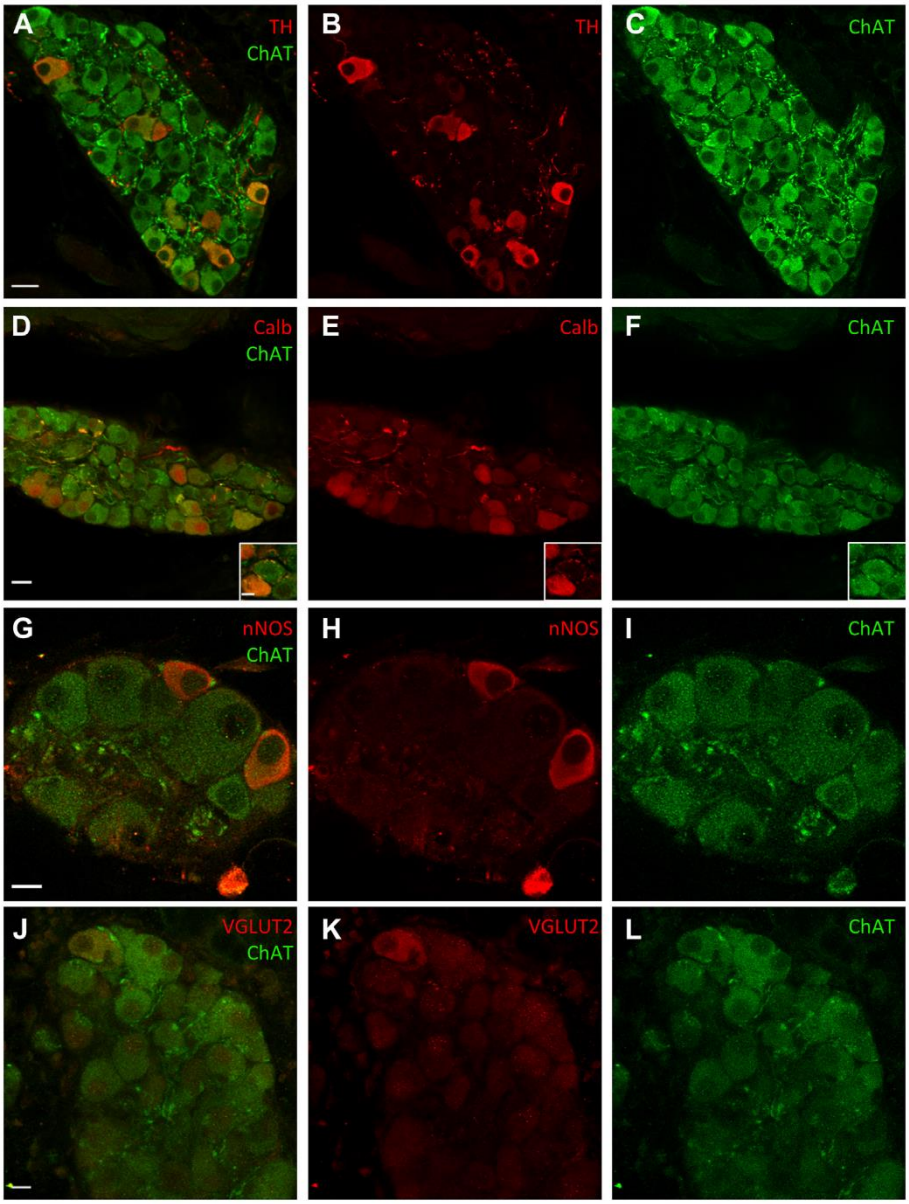


Figure 2 Phenotypic properties of intracardiac neurons. Confocal images of sections of cardiac ganglia immunostained with tyrosine hydroxylase (TH) (**A–C**), calbindin (**D–F**), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (**G–I**), vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) (**J–L**), and cocaine and amphetamine regulated transcript (ChAT). *Insets* in panels D–F show typical calbindin-immunoreactivity (Calb) pericellular baskets surrounding neuronal somata. Scale bars are 10 μm (inset in panel D and panels G–I and J–L) and 20 μm (all other panels).

also present in cardiac ganglia. These neurons were not present in all ganglia and accounted for only 2% of total neurons (Figures 2G–2I). Even though most nNOS-IR somata coexpressed ChAT, not all of them did.

On rare occasions, we observed immunoreactivity for vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) (Figures 2J–2L). However, no soma was stained by the other vesicular glutamate transporter VGLUT1. Moreover, despite the use of different markers such as glutamate decarboxylase 67, gamma aminobutyric acid and tryptophan hydroxylase 2, we did not observe any GABAergic or serotoninergic phenotype.

Intracardiac neurons have been shown to express several neuropeptides in various species, especially in rodents.[6,11] In mouse hearts, a large proportion of neuronal somata were immunoreactive for NPY (67%) and CART peptide (61%). However, antibody cross-reactions prevented us from quantifying the number of neurons coexpressing both peptides. In somata, both staining were granular with a perinuclear localization, suggesting a localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus (Figure 3). Numerous intra- and interganglionic nerve fibers were also labeled by these 2 peptides.

Calcitonin gene–related peptide–IR and substance P (SP)–IR, 2 peptides distinctive of sensory neurons, were also observed in nerve fibers, but never in neuronal somata (Figures 3A–3F). Both peptides were frequently colocalized, although SP-IR nerve fibers were far less numerous. IR for somatostatin and vasoactive intestinal peptide was also tested. However, we did not observe any labeling for these neuropeptides.

Electrophysiological properties of mouse intracardiac neurons

After isolation, cardiac neurons were identified as cells with rounded cell body with numerous extensions emerging from it (Figure 4A). Most neurons were multipolar, even if some uni- and bipolar neurons were also observed.

After 12–30 hours of culture, passive and active electrical membrane properties of isolated mouse cardiac neurons were assessed using the patch clamp technique in the current clamp mode.

Table 1 Neurochemical profile of mouse intracardiac neurons

Neurochemical phenotype	Percentage (number of profiles)	Multiple phenotype (percentage of total)
ChAT	98.7	
TH	28.8 (251/873)	27.9 are ChAT/TH
NPY	66.5 (581/874)	
nNOS	1.7 (10/577)	
Calb	45.7 (596/1305)	11.8 are Calb/ChAT/TH
CART	60.8 (578/950)	

Calb = calbindin; CART = cocaine and amphetamine regulated transcript; ChAT = choline acetyltransferase; nNOS = neuronal nitric oxide synthase; NPY = neuropeptide Y; TH = tyrosine hydroxylase.

Under our experimental conditions, no spontaneous firing activity was observed. An investigation of discharge characteristics revealed 2 different profiles: 77.4% of neurons showed limited firing activity (phasic neurons) characterized by a maximum of 1–3 action potentials (APs) at the onset of the stimulus, while 22.6% of neurons exhibited adapting firing behavior (Figures 4B and 4C). Adapting neurons also showed a lower rheobase (40.0 ± 2.3 pA; n = 14) than did phasic neurons (64.0 ± 3.3 pA; n = 48) ($P < .0001$) (Figure 4D). In addition, adapting neurons displayed shorter afterhyperpolarization (AHP; 67.0 ± 5.2 ms [adapting] vs 132.8 ± 17.0 ms [phasic]; $P < .01$) (Figure 4E).

Upon brief injection of suprathreshold depolarizing current, intracardiac neurons were divided into 2 additional groups according to the presence or absence of AHP. Fifty-five percent of APs (30 of 55) were followed by AHP, while other neurons did not exhibit any (Figure 5). Neurons with AHPs were characterized by a more depolarized resting membrane potential (−57.4 ± 0.9 mV [AHP] vs −62.7 ± 1.1 mV [no AHP]; $P < .001$) (Figure 5B), a smaller AP amplitude (120.8 ± 2.8 mV [AHP] vs 137.5 ± 2.1 mV [no AHP]; $P < .0001$) (Figure 5C), and a smaller maximum rate of depolarization (147.9 ± 7.8 V/s [AHP] vs 189.2 ± 5.6 V/s [no AHP]; $P < .001$) (Figure 5D). It is noteworthy that these 2 newly defined types of neurons were not correlated to phasic or adapting patterns (Fisher exact test, $P > .05$). The electrophysiological properties of mouse intracardiac neurons are summarized in Online Supplemental Table 1.

Pharmacological response of mouse intracardiac neurons

Since the ICNS depends on several modulators,[23] we investigated the pharmacological response of isolated mouse cardiac neurons to known peripheral neuromodulators.

All tested neurons (n = 28) exhibited membrane voltage and current responses to acetylcholine (Ach) perfusion, and the resulting inward current was sufficient to trigger AP (Figure 6A). The superfusion of Ach resulted in the development of a large inward current, whose amplitude decreased before the end of the drug application, probably owing to channel desensitization. The peak current density evoked by Ach was similar in phasic and adapting neurons but was significantly smaller in neurons displaying AHP ($P < .01$) (Figure 6B).

The expression of several purinergic receptors has been described in rat cardiac neurons,[24] and adenosine triphosphate (ATP) and other purinergic compounds have been reported to modulate intracardiac neurons.[23] In our study, the exogenous application of ATP was accompanied by a strong membrane depolarization in all tested neurons (n = 17), resulting most of the time in AP firing (Figure 6C). In voltage clamp, ATP induced a rapidly activating and sustained inward current, distinctive of purinergic receptor activation. There was no statistical difference between phasic and adapting neurons, while AHP neurons were characterized by a smaller current amplitude as compared with neurons without AHP ($P < .05$) (Figure 6D).

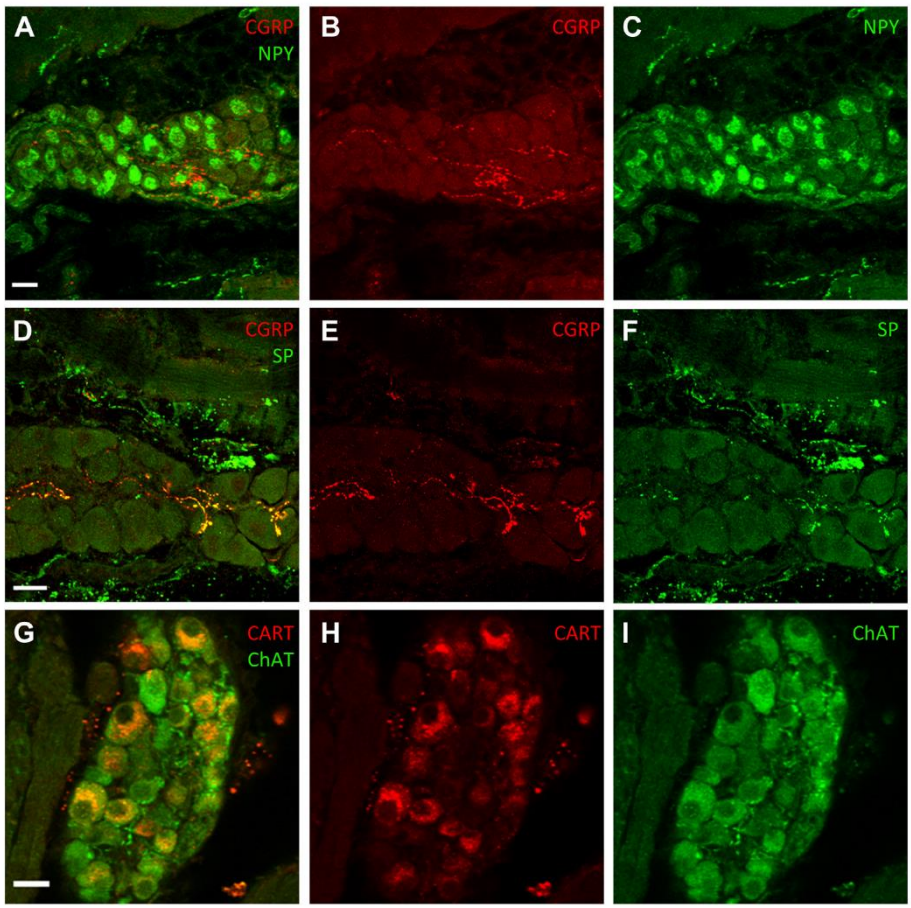


Figure 3 Peptide expression in mouse intracardiac neurons. Confocal images of sections of cardiac ganglia immunostained with neuropeptide Y (NPY) and calcitonin gene–related peptide–immunoreactivity (CGRP) (**A–C**), substance P (SP) and CGRP (**D–F**), and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) (**D–F**). Scale bars are 20 μm.

In our study, perfusion of bradykinin (BK) was able to slowly depolarize mouse cardiac neurons without eliciting AP (0.2 μM: 8.4 ± 1.1 mV [n = 7]; 0.5 μM: 13.0 ± 2.4 mV [n = 8]). This was confirmed by the observation of a slowly activating inward current of small amplitude after BK exposure in voltage clamp experiments (Figure 6F).

Discussion

This study presents for the first time a detailed report of anatomic, phenotypic, electrophysiological, and pharmacological properties of the mouse ICNS.

Cholinergic and catecholaminergic innervation of the mouse heart

For the past 30 years, cardiac innervation and ICNS have been studied in a variety of species using tissue sections or whole-mount approaches. Although these techniques have brought a lot of information regarding the cardiac autonomic innervation, they essentially report superficial information and suffer from limitations because of sample damaging. The recent development of optical clearing techniques combined with advances in 3-dimensional imaging of a large-scale specimen helped overcome these limitations, opening new opportunities to study global cardiac innervation.

The iDISCO clearing method allowed us to visualize and quantify in 3 dimensions the sympathetic and parasympathetic innervation of the mouse heart, thus enabling the determination of the exact location and number of cardiac ganglia in the whole nonsectioned murine heart. Our results are in accordance with Rysevaite et al,[25] who reported a mean number of 19 ± 3 ganglia. Since a 3-dimensional analysis of ganglia was missing in the literature, we quantified ganglion size using a volumetric approach and found that the cumulative ganglion volume is 0.02 mm^3. We also developed an automatic pipeline in ImageJ to quantify the total length of nerve fibers innervating the heart. Our approach is complementary to the remarkable work done by Rajendran et al,[26] who developed a clearing-imaging-analysis pipeline to assess the diameter and orientation of

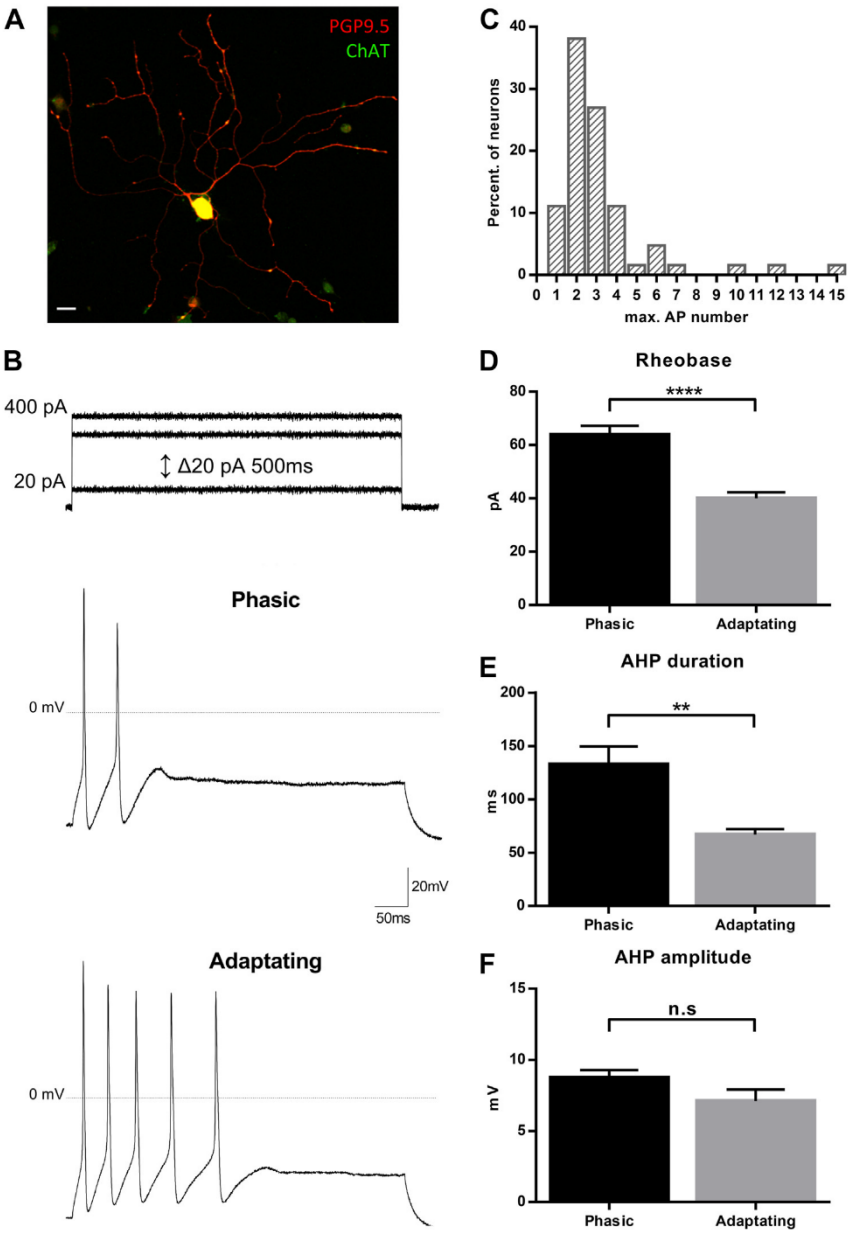


Figure 4 Action potential (AP) discharge profiles in mouse dissociated intracardiac neurons. **A:** Mouse isolated cardiac neuron costained with the neuronal marker Protein gene product 9.5 and choline acetyltransferase (ChAT). **B:** Maximum discharge of AP observed in 2 distinct neurons in response to 500 ms depolarizing current injection from 20 to 400 pA (Δ20 pA). The *upper trace* presents AP obtained in a phasic neuron, whereas the *lower trace* was obtained in an adapting one. **C:** Distribution of the maximum numbers of AP recorded with the stimulation protocol presented in panel A. **D:** Assessment of the rheobase of phasic (n = 48) vs adapting (n = 14) neurons. **E and F:** Assessment of the duration and amplitude of afterhyperpolarization (AHP) in phasic (n = 21) vs adapting (n = 7) neurons with the stimulation protocol used in Figure 5. $^{**}P < .01$, $^{****}P < .0001$. n.s. = not significant ($P = .14$).

nerve fibers innervating the mouse heart. This anatomical description of neuronal cardiac circuits will bring useful information to better understand the autonomic cardiac innervation and to identify abnormal cardiac innervation in pathological states, as already described in myocardial infarction or in cardiac autonomic neuropathy.[27,28]

Neurochemical phenotype of mouse intracardiac neurons

So far, little was known about the neurochemical diversity of intracardiac neurons in mouse, with only 3 different neuronal markers (ChAT, TH, and nNOS) identified.[2,7,8] Our results confirm that almost all intracardiac neurons express the

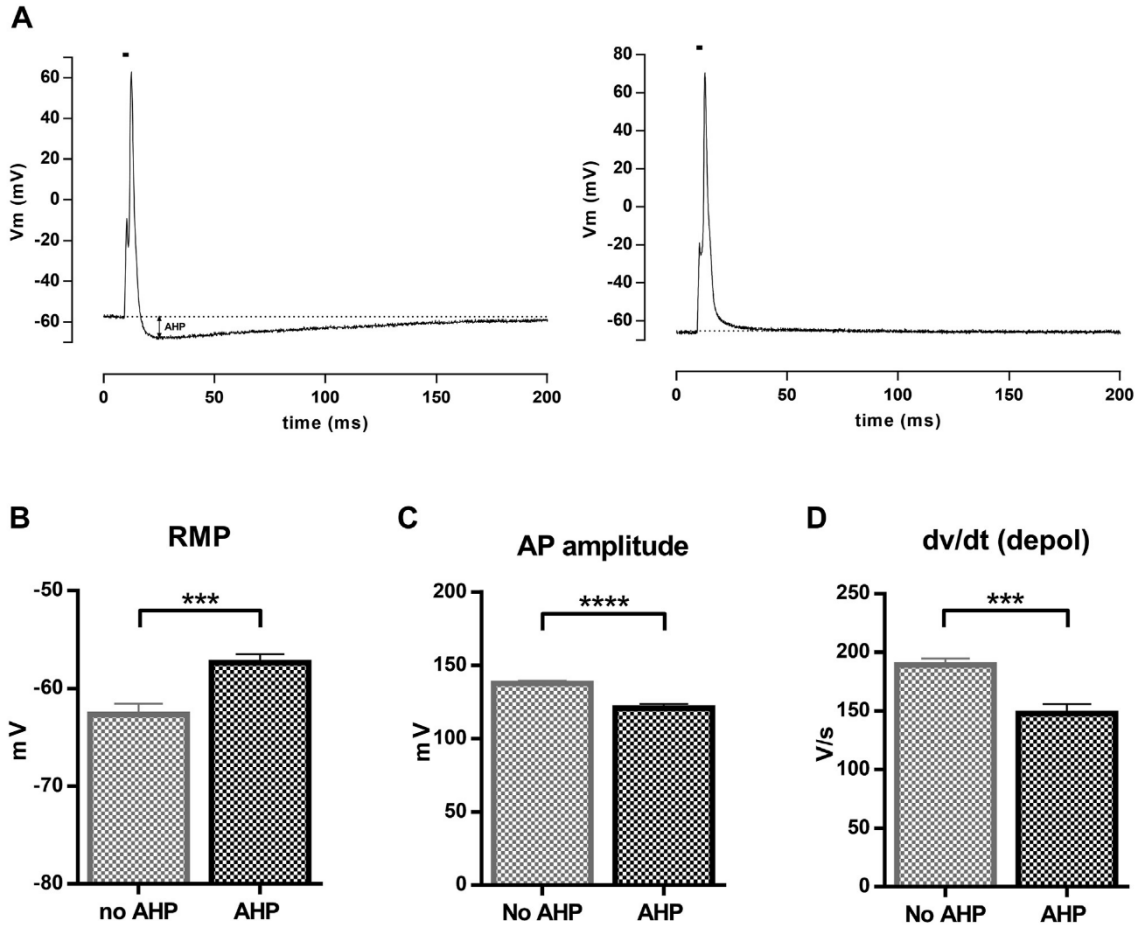


Figure 5 Action potential (AP) properties in intracardiac neurons with or without afterhyperpolarization (AHP). AP with (*left*) or without (*right*) AHP recorded in response to brief injection (2 ms; *black line*) of suprathreshold depolarizing current (**A**). Assessment of resting membrane potential (RMP) (**B**), AP amplitude (**C**), and maximum rate of depolarization (dv/dt (depol)) (**D**). ***$P < .001$, ****$P < .0001$; no AHP: n = 25; AHP: n = 28.

cholinergic marker ChAT and that ~30% of them coexpress ChAT and TH.[7,8] We also identified a small population of nitrergic neurons, which is consistent with previous investigations that have reported such a phenotype in rat, guinea pig, rabbit, and human.[3–5]

For the first time, we described the expression of 4 additional markers within the somata of mouse intracardiac neurons, thus showing that this species is characterized by a relative phenotypic diversity, as reported in others mammals.[3,5,10] Indeed, we emphasized the existence of neurons expressing the calbindin, NPY, and CART peptides and to a lesser extent glutamatergic neurons. A large proportion (46%) of mouse intracardiac neurons expressed the calcium-binding protein calbindin. To date, only 1 study had identified such neurons in rat hearts, where they represent only 7% of total neurons.[3] The expression of this protein has been reported in central and peripheral neurons and is often used as a marker to discriminate different functional subpopulations of neurons, such as sensory neurons.[29] We also observed a lot of intra- and interganglionic fibers, as well as terminals surrounding cell bodies that are immunoreactive for calbindin, suggesting that calbindin-expressing neurons may be crucial components of local circuits. Whether the expression of this protein is associated with any specialized function still remains to be determined.

Recently, glutamatergic neurons immunoreactive for VGLUT1, VGLUT2, and glutaminase, the synthetic enzyme for glutamate, have been found within the ICNS of rat.[9] In our study, we occasionally observed neurons immunoreactive for VGLUT2, yet without detecting any VGLUT1 immunoreactivity. Therefore, we suggest that in the mouse, glutamatergic intracardiac neurons may exist but do not represent a significant neuronal population.

The expression of a variety of neuropeptides also accounts for the neurochemical diversity of intracardiac neurons, especially in rodents.[6,11] However, apart from the description of sensory fibers immunoreactive for calcitonin gene–related peptide–IR and SP, the expression of other

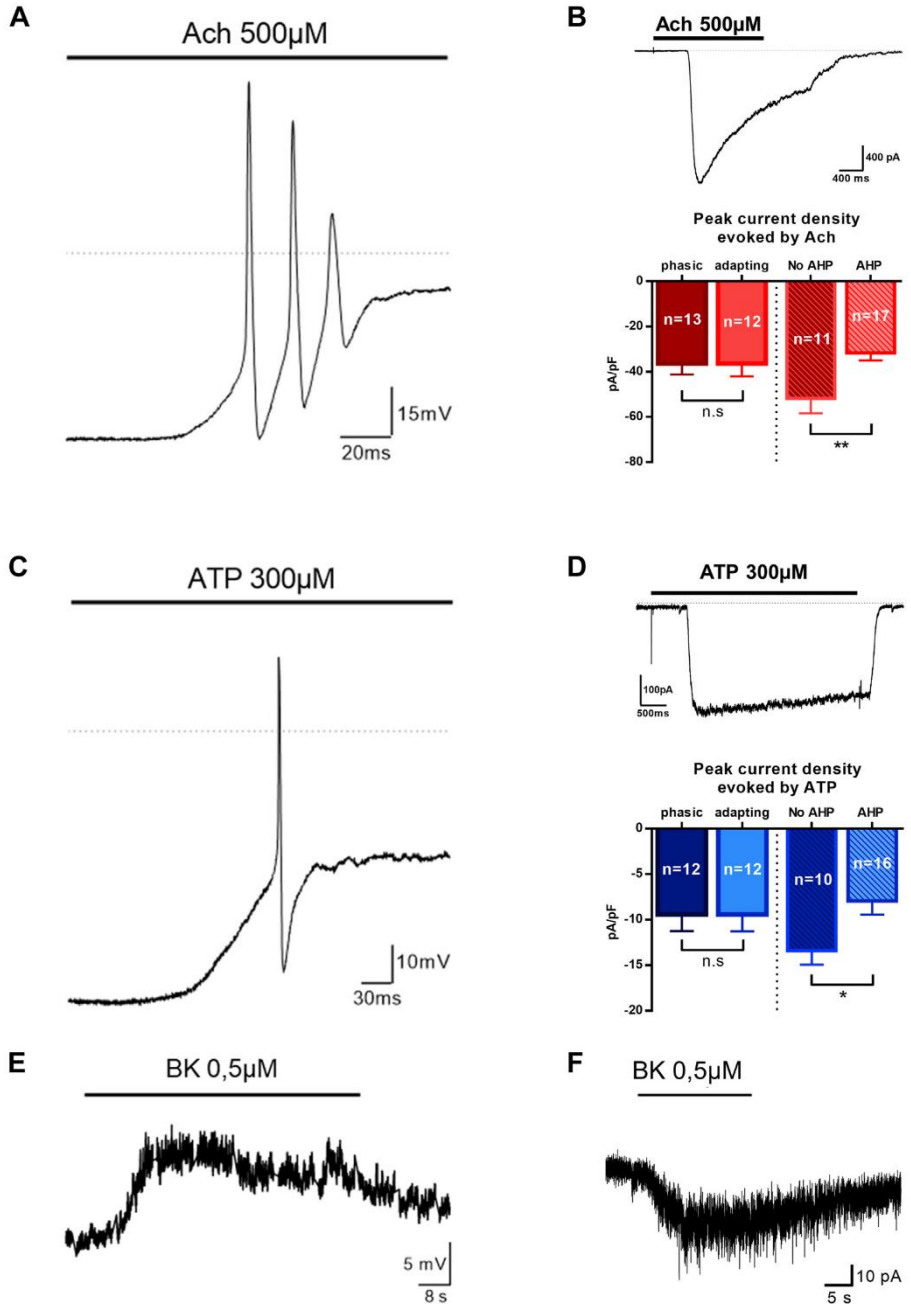


Figure 6 Pharmacological responses of mouse intracardiac neurons. Effects of 500 µM acetylcholine (Ach), 300µM adenosine triphosphate (ATP) or 0.5µM bradykinin (BK) on membrane potential (**A**, **C** and **E** respectively) and current (**B**, **D** and **F** respectively). The peak current densities of Ach and ATP evoked currents are compared between the different neuronal populations (respectively in **B** and **D**). $*P < .05$, $**P < .01$. n.s. = not significant ($P = .97$ in **B** and .87 in **D**).

neuropeptides had not yet been investigated in the mouse.[7] Here, we highlighted the expression of 2 neuropeptides, NPY and CART, within mouse intracardiac neurons. The expression of NPY within these neurons is not surprising, since it is known to be widely distributed in the autonomic nervous system and its cardiovascular effects have been well documented.[30]

CART peptide expression concerns only a small number of cardiac neurons in guinea pig while it was observed in 46% of neurons in rat.[11,12] This proportion is even higher in the

mouse, with 61% of neurons showing immunoreactivity for CART. This peptide has been extensively studied in the enteric nervous system, where it is expressed in many neurons, but experimental evidence elucidating its biological function is still lacking.[31] Further studies will be necessary to clarify its function within the cardiac context.

Electrophysiological and pharmacological properties of mouse intracardiac neurons

The complex organization of the ICNS was further supported by the examination of its electrophysiological properties. Indeed, on the basis of their electrical behavior, different subtypes of neurons have been identified within mammals, demonstrating that intracardiac neurons are forming a heterogeneous population.[14,16,17] Here, we report the first detailed investigation of passive and active electrical properties of mouse intracardiac neurons. By studying their firing activity, we identified 2 distinct neuronal populations as observed previously.[15,17,21] While most neurons were classified as phasic because of limited firing activity, a small proportion of neurons were able to discharge more APs (adapting neurons). Phasic neurons have a significantly higher rheobase as well as a higher AHP duration than do adapting neurons, which confirms the existence of 2 types of neurons displaying different excitability features. Little is known about the different ionic channels expressed by intracardiac neurons, especially in the mouse. Thus, it would be interesting to closely investigate the molecular determinants of these 2 types of electrical behaviors.

It is important to emphasize that our results were not obtained from freshly isolated cardiac neurons. Hence, they may have been affected by cell culture conditions. However, it is worth mentioning that our results are consistent with those previously obtained in situ.[32] Another limitation is that our experiments were carried out at room temperature; thus, it would be interesting to assess these electrophysiological properties at a more physiological temperature.

A significant number of studies have revealed the diversity of neuromodulatory sources of intracardiac neurons, which further suggests that they could play the role of integrative centers. In dogs, neuronal activity is known to be regulated by mechanical and chemical stimuli.[27] Similarly, a variety of substances have been reported to modulate the excitability of intracardiac neurons in rat and guinea pig.[13,23,33] However, the pharmacological modulation of mouse intracardiac neurons has never been investigated. Here, we showed that mouse cardiac neurons respond to Ach, ATP, and BK, suggesting that they could be modulated by a variety of stimuli. In our experiments, BK induced a small inward current associated with a slight membrane depolarization. This indicates that BK receptors are present in mouse cardiac neurons but their stimulation was not sufficient in our conditions to trigger AP firing as observed in rat.[33]

Conclusion

Our study is the first detailed report providing the phenotypic, electrophysiological, and pharmacological characterization of mouse intracardiac neurons. Our results demonstrate that the mouse ICNS shares similar complexity to that of other species. ICNS complexity deserves consideration since there is growing evidence that the ICNS plays an essential role in cardiac modulations and in the initiation and maintenance of cardiac arrhythmias. To this purpose, the use of transgenic mouse models will allow the functional investigation of neuronal phenotypes by expressing a fluorescent reporter in specifically targeted neurons. Furthermore, the emergence of new genetic tools such as DREADDs and optogenetics opened new opportunities to control the activity of specific neurons within a global network. This represents a promising strategy to understand the role of targeted neurons in global cardiac modulation as described in the recent review of Scalco et al.[34] However, these transgenic technologies are essentially available in the mouse, where the ICNS had been poorly characterized yet. Hence, our study is paving the way for future investigations using a combination of cre-lox systems and DREADDs/optogenetic tools in order to decipher the functional organization of the ICNS as well as its implication in pathological states such as arrhythmias.

Acknowledgments

This work has benefited from ImageUP platform facilities (University of Poitiers) and the technical assistance of Anne Cantereau, PhD, Christophe Magaud, MSc, and Cedric Bauer, MSc. We also thank Laura Batti, PhD for her help in the analysis of light-sheet microscopy images. We also thank the Fondation pour la Recherche Médicale for its financial support.

Appendix

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2022.04.012.

References

1. Armour JA. The little brain on the heart. Cleve Clin J Med 2007;74:S48–S51.
2. Maifrino LBM, Liberti EA, Castelucci P, De Souza RR. NADPH-diaphorase positive cardiac neurons in the atria of mice: a morphoquantitative study. BMC Neurosci 2006;7:10.
3. Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. Cell Tissue Res 2003;314:337–350.
4. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, et al. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. J Anat 2016;228:26–46.
5. Hoover DB, Isaacs ER, Jacques F, Hoard JL, Pagé P, Armour JA. Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. Neuroscience 2009;164:1170–1179.
6. Steele PA, Gibbins IL, Morris JL, Mayer B. Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart. Neuroscience 1994;62:241–250.
7. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, et al. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. Heart Rhythm 2011;8:731–738.
8. Hoard JL, Hoover DB, Mabe AM, Blakely RD, Feng N, Paolocci N. Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes,

norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors TrkA and p75. Neuroscience 2008;156:129–142.
9. Wang T, Miller KE. Characterization of glutamatergic neurons in the rat atrial intrinsic cardiac ganglia that project to the cardiac ventricular wall. Neuroscience 2016;329:134–150.
10. Horackova M, Armour JA, Byczko Z. Distribution of intrinsic cardiac neurons in whole-mount guinea pig atria identified by multiple neurochemical coding: a confocal microscope study. Cell Tissue Res 1999;297:409–421.
11. Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Cocaine- and amphetamine-related transcript peptide and somatostatin in rat intracardiac ganglia. Cell Tissue Res 2006; 324:17–24.
12. Calupca MA, Locknar SA, Zhang L, Harrison TA, Hoover DB, Parsons RL. Distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the guinea pig intrinsic cardiac nervous system and colocalization with neuropeptides or transmitter synthetic enzymes. J Comp Neurol 2001;439:73–86.
13. Braas KM, May V, Harakall SA, Hardwick JC, Parsons RL. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide expression and modulation of neuronal excitability in guinea pig cardiac ganglia. J Neurosci 1998;18:9766–9779.
14. Selyanko AA. Membrane properties and firing characteristics of rat cardiac neurones in vitro. J Auton Nerv Syst 1992;39:181–189.
15. Xu ZJ, Adams DJ. Resting membrane potential and potassium currents in cultured parasympathetic neurones from rat intracardiac ganglia. J Physiol 1992; 456:405–424.
16. Edwards FR, Hirst GD, Klemm MF, Steele PA. Different types of ganglion cell in the cardiac plexus of guinea-pigs. J Physiol 1995;486:453–471.
17. Xi X, Randall WC, Wurster RD. Electrophysiological properties of canine cardiac ganglion cell types. J Auton Nerv Syst 1994;47:69–74.
18. Choi E-K, Shen MJ, Han S, et al. Intrinsic cardiac nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmia in ambulatory dogs. Circulation 2010;121:2615–2623.
19. Gibbons DD, Southerland EM, Hoover DB, Beaumont E, Armour JA, Ardell JL. Neuromodulation targets intrinsic cardiac neurons to attenuate neuronally mediated atrial arrhythmias. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2012; 302:R357–R364.
20. Avazzadeh S, McBride S, O'Brien B, et al. Ganglionated plexi ablation for the treatment of atrial fibrillation. J Clin Med 2020;9:3081.
21. Hoard JL, Hoover DB, Wondergem R. Phenotypic properties of adult mouse intrinsic cardiac neurons maintained in culture. Am J Physiol Cell Physiol 2007;293:C1875–C1883.
22. Belle M, Godefroy D, Couly G, et al. Tridimensional visualization and analysis of early human development. Cell 2017;169:161–173.e12.
23. Armour JA, Ardell JL. Basic and Clinical Neurocardiology. Oxford: Oxford University Press; 2004.
24. Ma B, Ruan H-Z, Burnstock G, Dunn PM. Differential expression of P2X receptors on neurons from different parasympathetic ganglia. Neuropharmacology 2005;48:766–777.
25. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. Heart Rhythm 2011;8:448–454.
26. Rajendran PS, Challis RC, Fowlkes CC, et al. Identification of peripheral neural circuits that regulate heart rate using optogenetic and viral vector strategies. Nat Commun 2019;10:1944.
27. Yokoyama T, Lee J-K, Miwa K, et al. Quantification of sympathetic hyperinnervation and denervation after myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. PLoS One 2017;12:e0182072.
28. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. Circ Res 2015;116:2005–2019.
29. Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Smith TK. Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. Cell Tissue Res 1990;260:261–272.
30. Tan CMJ, Green P, Tapoulal N, Lewandowski AJ, Leeson P, Herring N. The role of neuropeptide Y in cardiovascular health and disease. Front Physiol 2018; 9:1281.
31. Ekblad E. CART in the enteric nervous system. Peptides 2006;27:2024–2030.
32. Harper AA, Adams DJ. Electrical properties and synaptic transmission in mouse intracardiac ganglion neurons in situ. Physiol Rep 2021;9:e15056.
33. Arichi S, Sasaki-Hamada S, Kadoya Y, Ogata M, Ishibashi H. Excitatory effect of bradykinin on intrinsic neurons of the rat heart. Neuropeptides 2019;75:65–74.
34. Scalco A, Moro N, Mongillo M, Zaglia T. Neurohumoral cardiac regulation: optogenetics gets into the groove. Front Physiol 2021;12:1323.

Supplementary data

Supplementary table 1: electrophysiological properties of mouse intracardiac neurons.

Parameters	Phasic	Adapting	No AHP	AHP
Resting membrane potential (mV)	-60,0 ± 0,8 (n=48)	-59,8 ± 1,4 (n=15)	**-62,7 ± 1,1 (n=25)**	**-57,4 ± 0,9 (n=30)*** **
Input resistance (MΩ)	1392 ± 82 (n=30)	1558 ± 103 (n=6)	1365 ± 83 (n=20)	1489 ± 122 (n=16)
Capacitance (pF)	35,7 ± 1,6 (n=45)	35,4 ± 3,0 (n=14)	33,6 ± 1,9 (n=25)	35,9 ± 2,1 (n=29)
Rheobase (pA)	**64,0 ± 3,3 (n=48)**	**40,0 ± 2,3 (n=14)****	64,4 ± 5,0 (n=25)	54,7 ± 3,5 (n=30)
Spike half-width (ms)	1,94 ± 0,05 (n=41)	1,79 ± 0,1 (n=12)	1,88 ± 0,07 (n=25)	1,93 ± 0,07 (n=28)
AP amplitude (mV)	128,1 ± 2,0 (n=41)	130,5 ± 6,6 (n=12)	**137,5 ± 2,1 (n=25)**	**120,8 ± 2,8 (n=28)****
dV/dt (depol.) (V/s)	164,5 ± 6,0 (n=41)	177,3 ± 14,7 (n=12)	**189,2 ± 5,6 (n=25)**	**147,9 ± 7,8 (n=28)*** **
dV/dt (repol.) (V/s)	-84,1 ± 2,9 (n=41)	-97,7 ± 10,2 (n=12)	-90,8 ± 4,5 (n=25)	-83,9 ± 4,7 (n=28)
AHP duration (ms)	**132,8 ± 17,0 (n=21)**	**67,0 ± 5,2 (n=7)****		8,4 ± 0,5 (n=29)
AHP amplitude (mV)	8,5 ± 0,6 (n=25)	7,1 ± 0,8 (n=8)		112,6 ± 14,4 (n=26)

dV/dt: maximum rate of the depolarization or repolarization phase. AHP duration and amplitude were only calculated for neuron displaying AHP. **P<0,01; ***P<0,001. **** P<0,0001 Mann Whitney test.

Supplementary material

Animals

29 animals were used for this work :

- 3 mice for the iDISCO clearing approach
- 13 mice for immunohistochemistry
- 13 mice for the electrophysiological experiments

iDISCO heart clearing

Mouse hearts were stained and cleared using a modified iDISCO+ protocol(Renier et al., 2016; Belle et al., 2017). Fixed hearts were dehydrated with a graded methanol series (50, 80 and 100% methanol in PBS, each for 1.5 h at room temperature (RT)) and bleached overnight with 6% H202 in methanol at 4 °C. After two washes in 100% methanol, hearts were gradually rehydrated (80, 50% methanol and PBS, 1h30 each).

Samples were blocked and permeabilized with PBS containing 0.2% gelatin 0.5% triton X-100 and 50mM sodium azide (PBSGT) for 4 days at RT. Primary antibodies (see supplementary table 1) were incubated during two weeks in PBSGT supplemented with 0.1% saponin at 37°C. Samples were then washed in PBSGT for 1 day followed by a 48 hours incubation with secondary antibodies. After another day of washing, samples were again dehydrated in methanol (20, 40, 60, 100 and 100% methanol, 1h each) and incubated overnight in a mixture of dichloromethane (DCM) – methanol (2:1) at RT. Samples were incubated in 100% DCM for 30mn and finally incubated and stored in DiBenzyl Ether.

Imaging was performed using a mesoSPIM system(Voigt et al., 2019) at Wyss Center, Geneva. Briefly, the sample is illuminated by two digitally scanned light sheets coming from opposite directions. The excitation paths also contain galvo scanners for light-sheet generation and reduction of shadow artifacts due to absorption of the light-sheet. In addition, the beam waist is scanned using electrically tunable lenses (ETL, Optotune EL-16-40-5D-TC-L) synchronized with the rolling shutter of the sCMOS camera. This axially scanned light-sheet mode (ASLM) leads to a uniform axial resolution across the field-of-view (FOV). Emitted fluorescence is collected by high-numerical-aperture objectives (Olympus MVPLAPO 1 X – NA 0,25) and imaged on a digital camera (Hamamatsu ORCA-Flash 4.0).

Image processing and analysis was performed using Bitplane Imaris. Quantification of ganglionic volume was performed using the surface mode of the software based on ChAT staining. Ventricular innervation analysis was performed using ImageJ custom routines. Briefly, it consists in: First, discriminating the innervation from the background noise by thresholding the 3D image using a ‘maximum entropy’ algorithm(Sahoo et al., 1988). The result is an image showing only the neural fibers network. Second, a ‘skeletonization’ that consists in reducing the diameter of all fibers to one voxel. This corrects the overestimation of the fiber volume in the image due to the point spread function, and the heterogeneity of illumination and optical density within the heart. The efficiency of these first parts of the analysis was validated by a systematic control of the overlap of neural network of a z-projection of a raw image and over-threshold fibers of a z-projection of a skeletonized image. Third, computing the length of the neural network using a custom version of the ImageJ plugin ‘analyse skeleton’(Arganda-Carreras et al., 2010).

Immunohistochemistry

After injection of heparin, mice were euthanized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (100 mg/kg). Hearts were quickly removed, washed in cold Tyrode solution and fixed in 4% paraformaldehyde for 24h at 4°C. After 3 washes in PBS, hearts were cryoprotected in 30% sucrose

overnight at 4°C. Just before sectioning, samples were embedded in OCT tissue compound (Tissue Tek) and frozen in cold ethanol. Sections 40–50 µm thick were cut with a cryostat and were collected on microscope slides (Adhesion slides, Menzel Gläser, SuperFrost® Plus, Thermo scientific). Sections were washed 3 times with PBS and permeabilized with 0.5% TritonX-100/1% BSA in PBS for 2h at RT. Incubation with primary antibodies (supplementary table 1) was performed overnight at 4°C. After 3 washes with PBS, sections were incubated with secondary antibodies for 3h in the dark at RT. Nuclei were stained with DAPI and sections were mounted in mowiol mounting medium. Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (FV3000 Olympus). As a control, images obtained after incubation with the secondary antibodies in the absence of primary antibodies did not elicit any labelling. Quantification was performed by manual cell counting using NIH ImageJ (Bethesda, Maryland, USA). For each marker, quantification was done with sections coming from at least two distinct animals. All micrographs are a projected confocal Z-series from sectioned material.

Neuron dissociation

Mice were injected with heparin and euthanized with pentobarbital sodium (100 mg/kg). Hearts were quickly removed and washed in cold HBSS solution. Fat pads located between both atria were dissected, cut into small pieces and dissociated in 2 mL HBSS containing 3 mg/mL collagenase type II (Worthington), 7.5mg/mL dispase II and 0.25 mg/mL DNase I for 30 mn at 37°C. This was followed by an additional incubation in 2 mL trypsin-EDTA 0.25% supplemented with 0.25 mg/mL DNase I for 35 mn at 37°C. After two washes in culture media, cells were gently triturated with fire-polished Pasteur pipettes coated with SVF and plated on laminin-coated 35 mm Petri dishes. Cells were maintained in Neurobasal-A medium supplemented with 2mM L-glutamine, B27 supplement, 5% horse serum and 1% penicillin/streptomycin in a humidified chamber at 37°C with 5% CO_2.

Electrophysiology

Passive and active electrical membrane properties of isolated cultured neurons were determined using the whole-cell configuration of the patch clamp technique in current clamp mode. For pharmacological studies, drugs were perfused using a gravity perfusion system (Ala Scientific Instruments) and ionic currents were assessed using the voltage clamp mode at a holding potential of -60mV. Recordings were carried out at RT within 30 hours following neurons isolation. Patch electrodes (≈4 MΩ) were pulled from glass capillaries (PG150T-7.5, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) using a vertical micropipette puller (Narishige, Tokyo, Japan). The patch pipettes were filled with (mM): 130 K-gluconate, 10 KCl, 1 MgCl2, 10 HEPES, 1 CaCl2, 5 EGTA, 2 Mg-ATP, 10 Na2-phosphocreatine and 0.3 Na-GTP, (pH adjusted to 7.2 using KOH). The bath solution contained (mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl2, 1.5 CaCl2, 10 glucose, and 10 HEPES, (pH adjusted to 7.4 using NaOH). Liquid junction potential was +16 mV and was not corrected. Recordings were made with an Axopatch 200B amplifier (Molecular devices, San Jose, California, USA) with a 5-kHz low-pass filter. Data were sampled at 20 kHz and digitized by

a Digidata 1550 B (Molecular devices, San Jose, California, USA). Data acquisition and analysis were performed using pClamp software (v11, Molecular devices, San Jose, California, USA).
Input resistance was determined by measuring voltage changes evoked by injection of hyperpolarizing current (from -10 pA to -40 pA; in -10 pA increments). Discharge characteristics were determined by injecting depolarizing current of increasing amplitude (from 20 to 400 pA ; 20 pA increment) during 500 ms. AP properties were determined upon brief injection (2 ms) of suprathreshold current. AP amplitude was measured as the difference between the AP peak amplitude and the resting membrane potential. Spike half-width was calculated as the AP duration measured at 50% of its amplitude.

Chemicals

PACAP27, VIP and Bradykinin was obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland), oxotremorine-M from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Neurobasal A medium and B27 supplement was supplied by ThermoFisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). Unless stated, all others chemicals was obtained from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

Supplementary Table 1 : Primary and secondary antisera used within this study.

Primary Antibody	Host Species	Dilution	Catalogue Number	Supplier
Calbindin D28k	Rabbit	1:1200	CB38	Swant
CART (55-102)	Rabbit	1 :1000	H-003-62	Phoenix Pharmaceuticals
CGRP	Goat	1:300	Ab36001	Abcam
ChAT	Goat	1:150	AB144P	Merck Millipore
MAP2	Rabbit	1:600	AB5622	Merck Millipore
nNOS	Rabbit	1:500	AB5380	Merck Millipore
NPY	Rabbit	1:500	Ab10980	Abcam
PGP9.5	Guinea pig	1:200	Ab10410	Abcam
PGP9.5	Rabbit	1:2000	AB1761-I	Merck Millipore
Somatostatin	Rat	1:200	sc-47706	Santa cruz
Substance P	Guinea pig	1:500	Ab10353	Abcam
TH	Chicken	1:500	Ab76442	Abcam
TH	Rabbit	1:400	AB152	Merck Millipore
VIP	Rabbit	1 :500	20077	Immunostar
VGLUT2	Guinea pig	1 :400	135404	Synaptic Systems
Secondary Antibody				
Anti-chicken (FluoProbe594)	Donkey	1:300	FP-SD1110	Interchim
Anti-goat (AF488)	Donkey	1:300	A-11055	ThermoFisher Scientific
Anti-goat (AF555)	Donkey	1:300	A-21432	ThermoFisher Scientific
Anti-goat (AF647)	Donkey	1:300	A-21447	ThermoFisher Scientific
Anti-guinea pig (AF488)	Goat	1:300	A-11073	ThermoFisher Scientific
Anti-guinea pig (AF647)	Donkey	1:200	706-605-148	Jackson Immunoresearch
Anti-rabbit (AF488)	Chicken	1:300	A-21441	ThermoFisher Scientific
Anti-rabbit (AF555)	Donkey	1:300	A-31572	ThermoFisher Scientific
Anti-rabbit (AF647)	Donkey	1:300	A-31573	ThermoFisher Scientific
Anti-rat (AF488)	Goat	1:300	A-11006	ThermoFisher Scientific

References

1. Renier N, Adams EL, Kirst C, et al.: Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell Elsevier, 2016; 165:1789–1802.

2. Belle M, Godefroy D, Couly G, et al.: Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. Cell Elsevier, 2017; 169:161-173.e12.

3. Voigt FF, Kirschenbaum D, Platonova E, et al.: The mesoSPIM initiative: open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue. Nat Methods 2019; 16:1105–1108.

4. Sahoo PK, Soltani S, Wong AKC: A survey of thresholding techniques. Computer Vision, Graphics, and Image Processing 1988; 41:233–260.

5. Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C: 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. Microsc Res Tech 2010; 73:1019–1029.

[4]. Résultats complémentaires : étude des courants sodiques voltage-dépendants

En complément des résultats précédents, nous avons poursuivi l'étude électrophysiologique des neurones cardiaques murins par l'étude de leurs courants sodiques voltage-dépendants.

Nos résultats permettent d'observer que ces neurones présentent un courant sodique voltage-dépendant majoritairement porté par des canaux TTX-sensibles mais qu'il existe également un courant TTX-résistant. En effet, la perfusion de 300 nM de TTX, concentration permettant de bloquer l'ensemble des canaux TTX-sensibles, ne permet pas d'éliminer l'ensemble du courant sodique enregistré. La part TTX-résistante représente ainsi 8.4 ± 1.1 % du courant sodique total (**figure 43 A et B**). Ce courant TTX-résistant est également caractérisé par une courbe d'inactivation décalée vers des potentiels plus négatifs ($V_{0.5\ (Ina\ total)}$ = -60.2 ± 3.3 mV *versus* $V_{0.5\ (Ina\ TTX\ resistant)}$ = -78.0 ± 4.0 mV), **figure 43 C**).

Parmi les trois sous-unités qui composent la famille des canaux TTX-résistants, le canal $Na_v1.5$ se distingue des canaux $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ par sa sensibilité plus importante à la TTX. En effet, dans la littérature, certains travaux rapportent un IC_{50} de la TTX proche de 2 µM pour l'isoforme $Na_v1.5$ alors qu'il serait de l'ordre de 45 µM pour les isoformes $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ (Renganathan et al., 2002). Dans notre étude, la perfusion d'une solution de TTX à 2 µM s'est traduit par une réduction de 45 % de l'amplitude du courant TTX-résistant (**figure 43 A et B**), ce qui pourrait suggérer la présence du canal $Na_v1.5$ dans les neurones cardiaques murins. De plus, ces neurones ne semblent pas exprimer l'isoforme $Na_v1.8$ puisque la perfusion de 0.5 µM d'A-803467, inhibiteur spécifique des canaux $Na_v1.8$, ne s'est pas traduit par une réduction de l'amplitude du courant enregistré (**figure 43 B**).

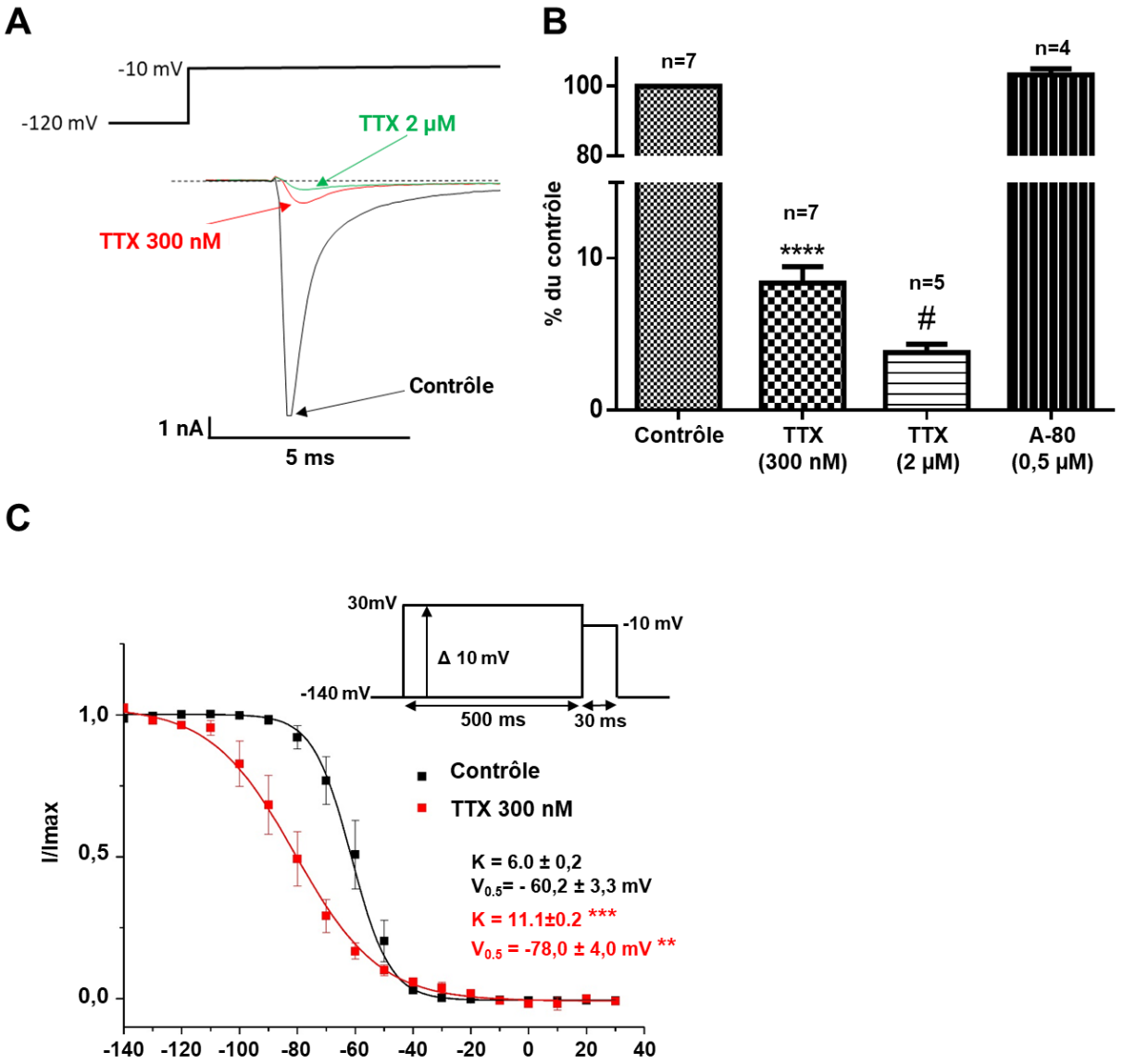


Figure 43 : Etude des courants sodiques voltage-dépendants. (**A**) Traces représentatives du courant sodique obtenu en appliquant une dépolarisation à -10 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV en condition contrôle ou en présence de TTX (300 nM ou 2 µM). (**B**) Quantification de l'effet de la TTX (300 nM ou 2µM) et de l'A-80 (0.5 µM) sur le pic de courant obtenu avec le protocole présenté en **A**. (**C**) Courbe d'inactivation du courant sodique en condition contrôle et après perfusion de 300 nM de TTX (n=6 pour chaque condition).

En conclusion, nos résultats révèlent l'existence d'un courant sodique TTX-résistant au sein des neurones cardiaques qui pourrait notamment être porté par le canal $Na_v1.5$.

Chapitre 2 : Etude d'une population spécifique de neurones intracardiaques : les neurones calbindine

Les résultats obtenus et présentés dans le chapitre 1 ont permis de mettre en évidence l'existence de différentes populations de neurones cardiaques, que ce soit sur des critères phénotypiques ou électrophysiologiques. A ce jour, aucune étude n'a encore permis d'identifier le rôle de ces différentes populations de neurones cardiaques. Les progrès réalisés en terme de modèles transgéniques offrent désormais la possibilité d'aller investiguer la fonction précise des différents composants du SNIC. Dans ce contexte, nous avons ainsi mis en place une approche de transduction virale *in vivo* combinée à la technologie Cre-Lox afin d'étudier une population neuronale intracardiaque précise.

Parmi les sept marqueurs neuronaux que nous avons mis en évidence chez la souris, il nous a paru judicieux de nous intéresser aux neurones exprimant la calbindine. Nos expériences d'immunomarquage suggèrent en effet que ces neurones sont capables d'établir de nombreux contacts synaptiques avec les neurones environnants, laissant à penser qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la mise en place des boucles de régulation locales. Parmi ces zones de contact, nous avons notamment observé de nombreuses varicosités périsomatiques **(figure 44)** délimitant certains corps cellulaires et rappelant les connexions typiques qu'établissent certains neurones inhibiteurs du système nerveux central (Veres et al., 2017).

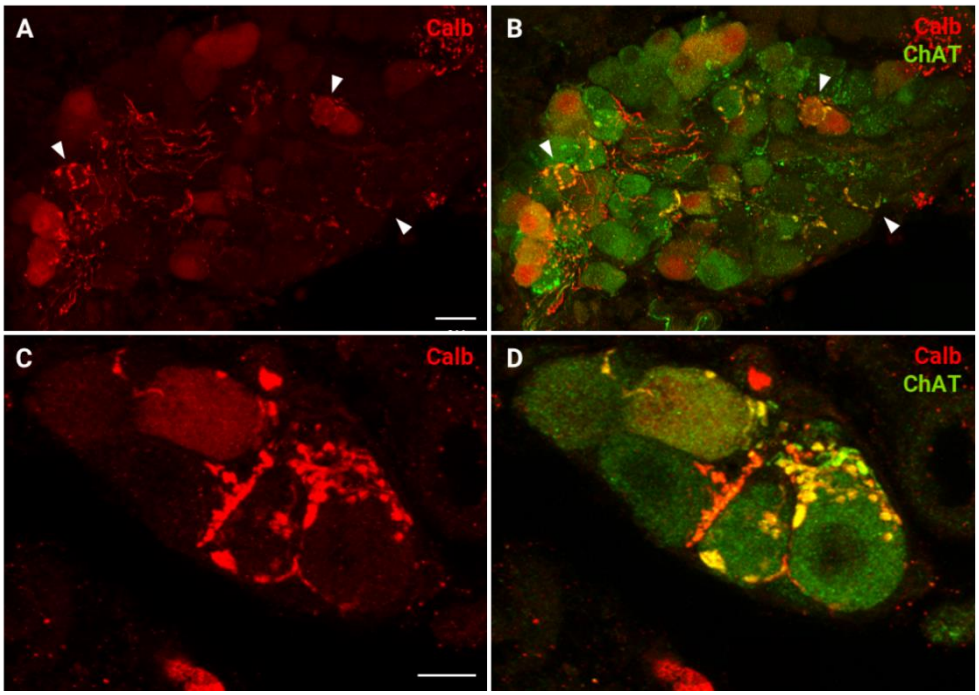


Figure 44 : Observation des varicosités périsomatiques immunoréactives pour la calbindine. Immunodétection de la calbindine (en rouge) et de la ChAT (en vert). Les neurones calbindine semblent établir des connexions étroites avec les neurones environnants. Les flèches blanches indiquent les zones de contact périsomatiques typiques établis par les fibres exprimant la calbindine. Barres d'échelle : 20 µm (A) et 10 µm (C).

La calbindine est également parfois utilisée pour discriminer certaines catégories fonctionnelles de neurones du système nerveux central et périphérique (Andressen et al., 1993; Heizmann, 1993; Baizer and Baker, 2005). Dans le contexte du SNIC, cette protéine a été très peu décrite, avec une seule étude mentionnant l'existence d'un tel phénotype chez le rat (Richardson et al., 2003). Aucune étude n'a donc encore déterminé si ce phénotype neurochimique correspondait à une fonctionnalité neuronale particulière.

Il apparait également important d'étudier le rôle de cette protéine au sein des neurones cardiaques. La calbindine appartient en effet à la famille des protéines liant le calcium (calcium-binding proteins) et l'homéostasie calcique intracellulaire régule d'importantes fonctions neuronales telles que la libération des neurotransmetteurs, la survie neuronale ou encore la croissance des neurites (Zündorf and Reiser, 2011). De par son affinité pour le calcium et ses propriétés cinétiques, la calbindine apparait comme un acteur clé de la régulation des concentrations calciques cytosoliques libres et pourrait ainsi participer à la régulation de nombreux processus cellulaires (Schmidt, 2012).

[1]. Validation du modèle d'étude

Afin d'étudier spécifiquement les neurones cardiaques exprimant la calbindine, nous avons développé une approche de transduction virale *in vivo*, couplée à la technologie Cre-Lox, afin d'induire l'expression d'un rapporteur fluorescent spécifiquement dans cette population neuronale. Cette stratégie permet ainsi de repérer facilement les neurones d'intérêt parmi l'ensemble des neurones intracardiaques.

L'efficacité de transduction virale est conditionnée par plusieurs paramètres tels que le sérotype, le promoteur et la concentration virale injectée. Plusieurs AAVs ont ainsi été testés afin de sélectionner l'outil optimal pour notre étude (**tableau 6** de la section matériels et méthodes). L'efficacité de transduction a été évaluée 5 à 6 semaines après injection des AAVs en estimant le pourcentage de neurones calbindine exprimant le rapporteur fluorescent par immunohistomarquage (**figure 45**). Nous avons ainsi pu déterminer que seuls les sérotypes 1 et 9 associés au promoteur CAG donnaient lieu à une transduction virale efficace des neurones cardiaques. Parmi les AAVs testés, l'AAV1-FLEX-tdTomato permet d'obtenir le meilleur rendement de transduction virale des neurones calbindine avec une efficacité de transduction de 59 ± 8 % (n=332).

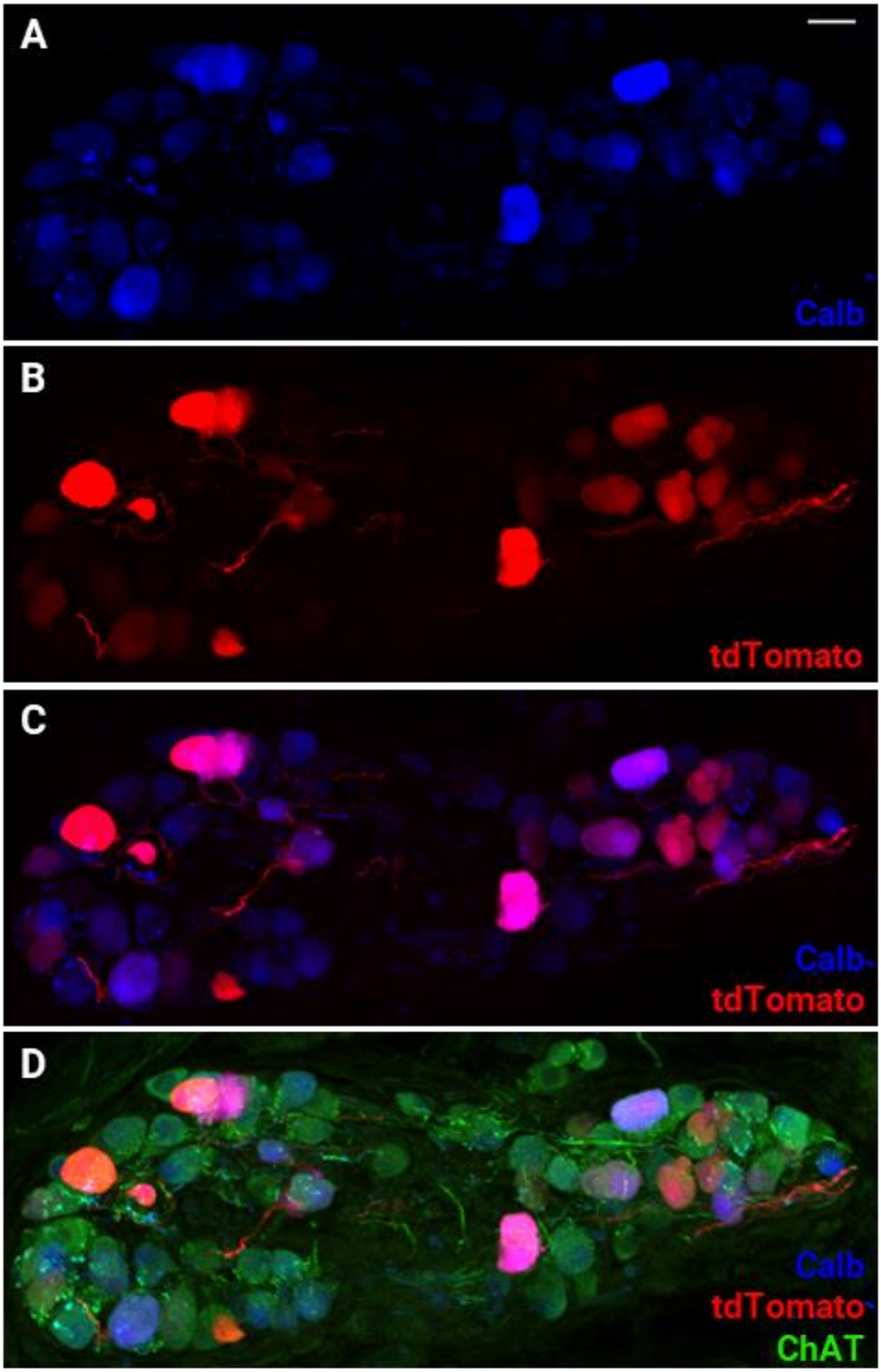


Figure 45 : Validation du modèle de transduction virale : expression de la tdTomato dans les neurones calbindine. Immunodétection de la calbindine (en bleu) et de la ChAT (en vert). La spécificité de la transduction virale est évaluée en déterminant le pourcentage de neurones calbindine positifs exprimant la tdTomato (en rouge). Barre d'échelle : 20 µm.

De plus, nous avons pu déterminer que l'expression du rapporteur fluorescent est visible dès l'âge de 4 semaines et que celle-ci perdurait au moins jusqu'à l'âge de 20 semaines.

Par la suite, l'ensemble des travaux visant à étudier les neurones calbindine ont donc été menés sur des souris infectées avec le vecteur AAV1-FLEX-tdTomato et âgées de 8 à 20 semaines.

[2]. Etude anatomique à l'échelle du cœur entier

La distribution anatomique des neurones calbindine et de leurs projections a été étudiée à l'échelle du cœur entier grâce à l'approche de transparisation cardiaque par la technique iDISCO. Nous avons ainsi pu observer qu'il n'existe pas de localisation préférentielle des neurones calbindine au sein du plexus ganglionnaire intracardiaque. En effet, ces neurones sont retrouvés dans la grande majorité des ganglions cardiaques (**figure 46 A**). Ces ganglions sont notamment reliés par de nombreuses fibres exprimant la calbindine ce qui démontre la participation des neurones calbindine dans la communication inter-ganglionnaire.

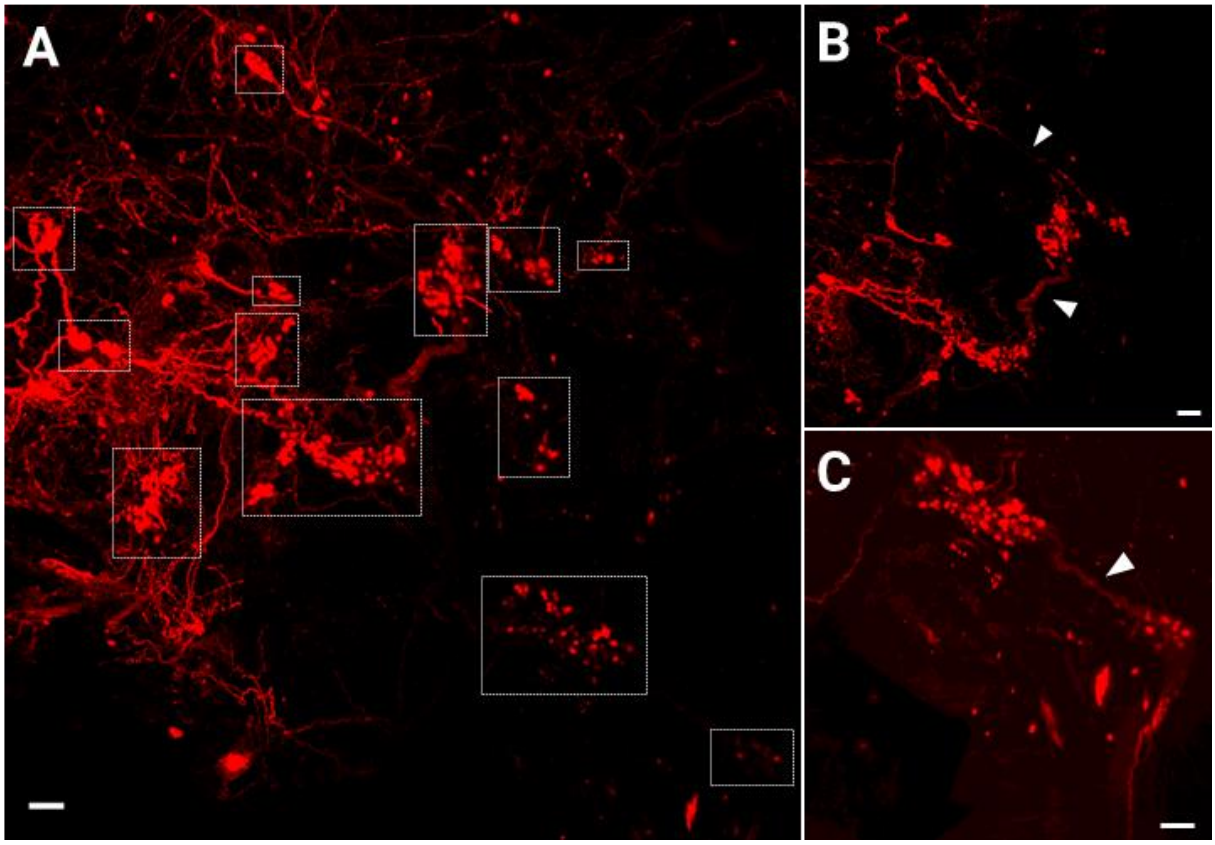


Figure 46 : Localisation des neurones calbindine. L'immunodétection de la tdTomato à partir d'un cœur transparisé permet d'étudier la localisation tridimensionnelle des neurones calbindine (en rouge). (**A**) projection d'intensité maximale (1926 µm) permettant d'observer l'ensemble des ganglions renfermant des neurones calbindine (les ganglions sont délimités par les rectangles blancs). (**B** et **C**) la majorité des ganglions sont connectés entre eux par des fibres exprimant la calbindine (flèches blanches). Barres d'échelle : 100 µm.

Mis à part les fibres inter-ganglionnaires, ces neurones semblent projeter sur de nombreuses régions du tissu cardiaque et notamment sur une région très localisée située au sein de l'oreillette droite (**figure 47 A et C**). Au niveau de l'oreillette gauche, cette innervation semble, en revanche, répartie de manière plus homogène sur l'ensemble du tissu auriculaire (**figure 47 B**).

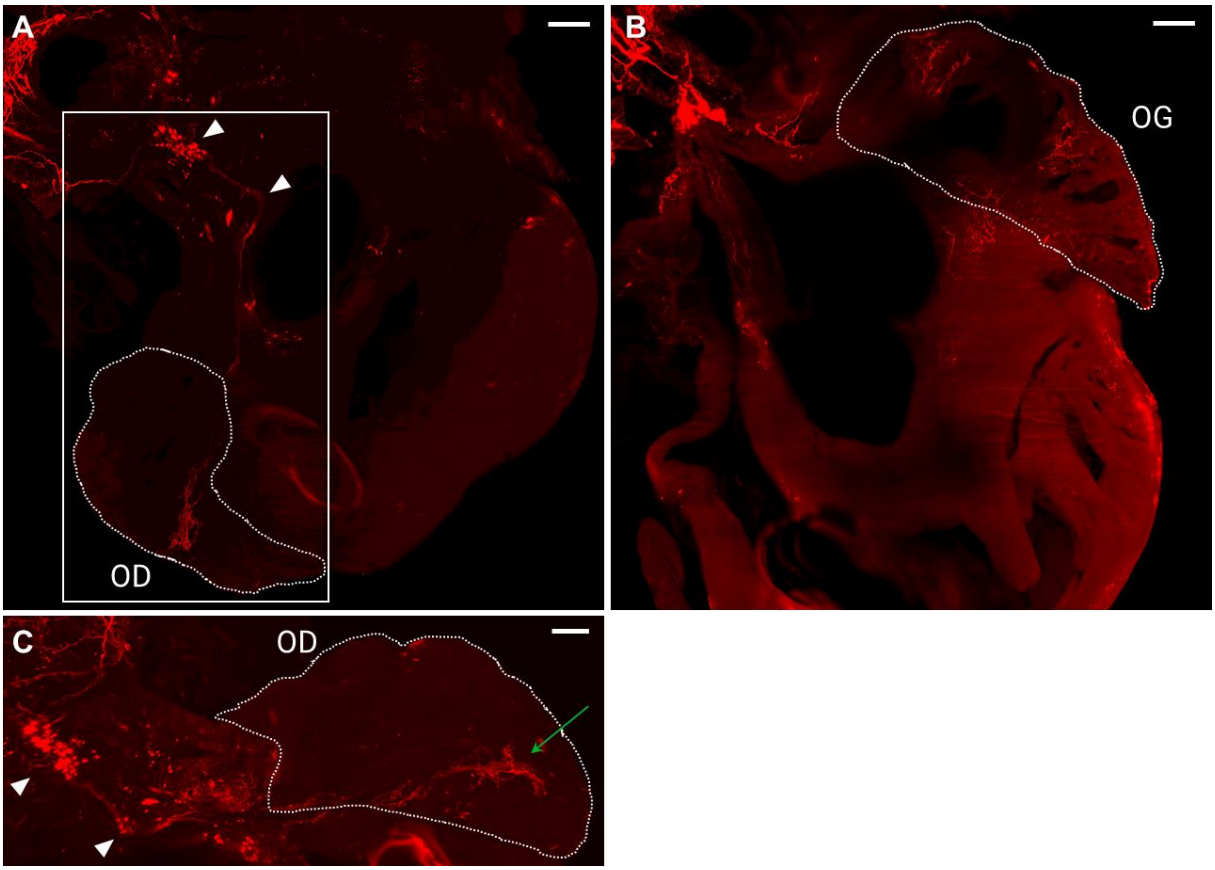


Figure 47 : Innervation du tissu auriculaire par les neurones calbindine. (**A** et **C**) Certains neurones calbindine projettent sur une petite région très localisée de l'oreillette droite (OD). Les flèches blanches permettent d'identifier les deux zones ganglionnaires à l'origine des projections sur l'oreillette droite, la flèche verte indique la région de l'oreillette droite innervée par les fibres calbindine (**B**) L'innervation de l'oreillette gauche (OG) est répartie de façon plus homogène sur l'ensemble du tissu auriculaire. Barres d'échelle : 300 µm (A et B) et 200 µm (C).

Les neurones calbindine forment un réseau relativement dense de projections innervant l'étage auriculaire. En revanche, le phénotype calbindine ne semble pas associé à une zone ganglionnaire particulière.

[3]. Phénotype neurochimique des neurones calbindine

Afin d'étudier plus précisément le phénotype des neurones calbindine, nous avons menés des expériences d'immunohistomarquage afin d'étudier le profil d'expression des différents marqueurs neuronaux au sein de la population calbindine.

Outre l'expression systématique du marqueur cholinergique ChAT, 37 % des neurones calbindine co-expriment également l'enzyme TH, suggérant leur aptitude à synthétiser des catécholamines. Plus de la moitié de ces neurones (57 %) expriment également le neuropeptide CART. La proportion d'expression de ces 2 marqueurs (CART et TH) est comparable à ce qui est retrouvé dans les neurones n'exprimant pas la calbindine. En revanche, là où près de 70 % des neurones n'exprimant pas la calbindine expriment le NPY, seul 30 % des neurones calbindine expriment ce neuropeptide (**figure 48**). Cette quantification n'a en revanche pas été possible pour le marqueur nNOS en raison de la proportion trop faible de neurones cardiaques exprimant cette enzyme.

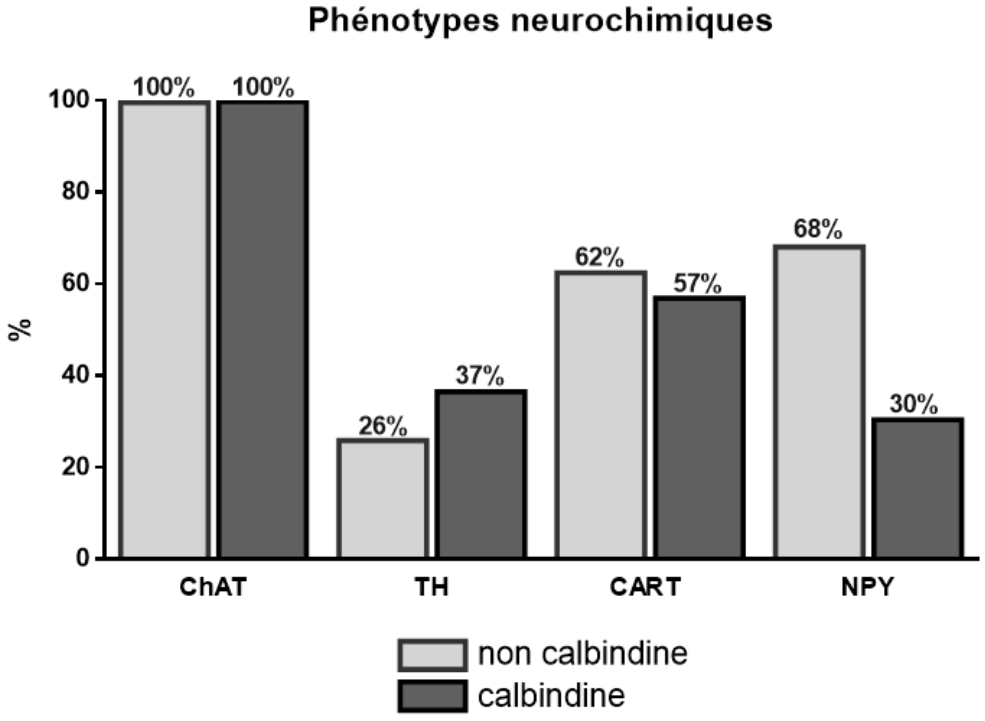


Figure 48 : Phénotypes neurochimiques des neurones calbindine. Nombre de neurones dénombrés : ChAT : n=1890 (1370 non calb et 520 calb) ; TH : n=873 (640 non calb et 233 calb) ; CART : n=950 (681 non calb et 269 calb) et NPY : n= 371 (279 non calb et 92 calb)

Les neurones calbindine ne forment donc pas une population homogène en terme de phénotype. Comme la plupart des neurones cardiaques, ils co-expriment de multiples marqueurs neuronaux. En revanche, ils se distinguent par une proportion plus faible de neurones exprimant le NPY.

[4]. Caractéristiques morphologiques

L'étude des neurones calbindine s'est ensuite poursuivie *in vitro*, après isolement des neurones cardiaques. D'un point de vue morphologique, nous avons observé que ces neurones présentent une taille de corps cellulaire supérieure à celle des autres neurones cardiaques. Cette quantification a été réalisée par deux approches différentes. Tout d'abord nous avons déterminer l'aire et le périmètre des corps cellulaires à partir d'une image de microscopie plein champ en transmission. Nos résultats suggèrent que ces deux paramètres sont plus élevés pour les neurones calbindine que pour les autres neurones (aire : 1305 ± 120 μm^2 (calbindine) *versus* 845 ± 77 μm^2 (non calbindine) $p<0.01$; périmètre : 84 ± 3 µm (calbindine) *versus* 66 ± 5 µm (non calbindine) $p<0.05$). Pour compléter ces mesures, nous avons également déterminé la surface membranaire par l'intermédiaire de la mesure de la capacité membranaire en patch-clamp. Les valeurs obtenues suggèrent également que les neurones calbindine présentent un corps cellulaire plus volumineux que celui des autres neurones (42.3 ± 2.7 pF (calbindine) *versus* 32.3 ± 2.3 pF (non calbindine) $p<0.01$). Ces différentes mesures permettent d'estimer que les neurones calbindine possèdent, en moyenne, une taille 1.4 fois supérieure à celle des autres neurones (**figure 49**).

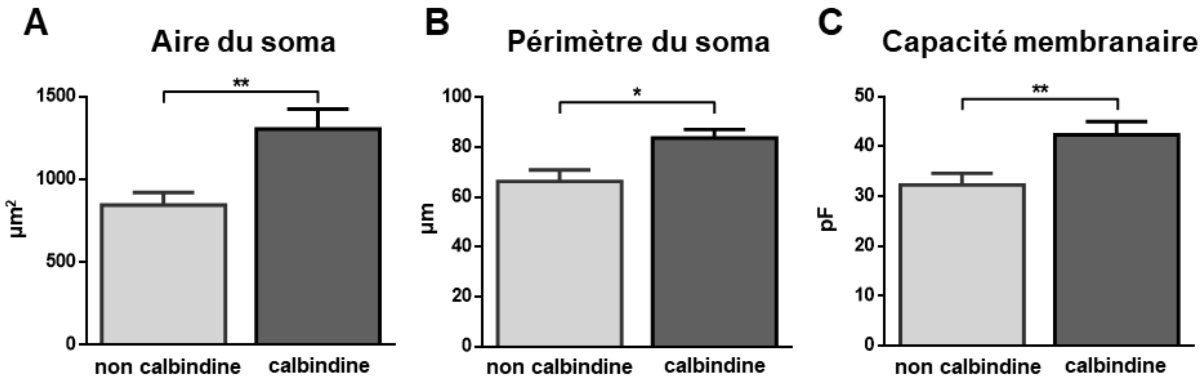


Figure 49 : Analyse de la taille des corps cellulaire. Détermination de l'aire (**A**) et du périmètre (**B**) du corps cellulaire ainsi que de la capacité membranaire des neurones (**C**). (*p<0.05 ; **p<0.01 (**A** et **B** : test de Mann-Whitney ; **C** : test t de student)) n=24 (non calbindine) ; n=27 (calbindine).

Nous nous sommes également intéressés aux capacités de croissance neuritique de ces neurones. Pour cela, les neurones ont été dissociés et cultivés pendant 24 heures avant d'être fixés. L'immunodétection de la β-tubuline III (β-tub III) permet d'identifier les prolongements neuronaux et leur quantification a été réalisée à l'aide du module filament tracer du logiciel imaris (**figure 50 A et B**). Nos résultats suggèrent qu'*in vitro*, les neurones calbindine présentent des capacités de croissance neuritique réduites par rapport aux autres neurones cardiaques. En effet, après 24 heures de culture, la longueur totale des neurites est

significativement inférieure chez les neurones exprimant la calbindine (1261 ± 120 µm (calbindine) *versus* 2175 ± 262 µm (non calbindine) ; p<0.001, **figure 50**).

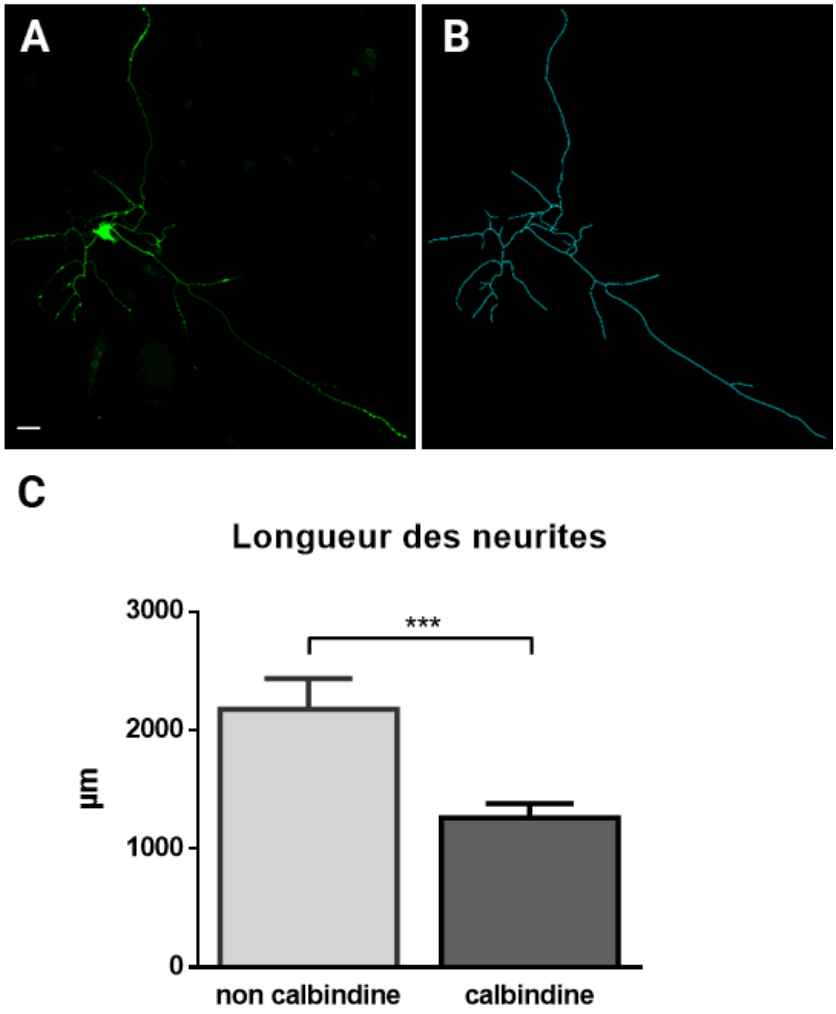


Figure 50 : Etude de la croissance des neurites *in vitro*. L'étude de la croissance neuritique est réalisée sur des neurones dissociés après 24 heures de culture. (**A**) Identification des neurites à l'aide du marquage β-tub III. (**B**) Le module filament tracer du logiciel imaris permet de reconstituer la longueur totale des neurites. (**C**) Quantification de la longueur totale des neurites en fonction de l'expression de la calbindine (***p<0.001, test de Mann-Whitney ; n = 31 (non calbindine) et n = 23 (calbindine)).

D'un point de vue morphologique, les neurones calbindine se distinguent par une taille de corps cellulaire supérieure et des capacités de croissance neuritique réduites par rapport aux autres neurones cardiaques.

[5]. Propriétés électrophysiologiques

L'étude électrophysiologique des neurones intracardiaques a révélé l'existence de différentes classes de neurones se distinguant notamment par des niveaux d'excitabilité et des potentiels d'action différents (**chapitre 1**). Nous avons donc poursuivi l'étude des neurones calbindine par la caractérisation de leurs propriétés électrophysiologiques par la technique de patch-clamp.

(i) Propriétés passives

Au repos, les neurones calbindine sont caractérisés par un potentiel membranaire de -60.5 ± 0.9 mV et une résistance membranaire de 1481 ± 126 MΩ. Ces valeurs sont similaires à celles mesurées chez les neurones n'exprimant pas la calbindine (**tableau 15**).

Paramètres	Non calbindine (n=24)	Calbindine (n=27)
Potentiel membranaire de repos	-60.1 ± 1.3 mV	-60.5 ± 0.9 mV
Résistance membranaire au repos	1520 ± 144 MΩ	1481 ± 126 MΩ

Tableau 15 : Propriétés membranaires passives.

(ii) Propriétés actives

a) Excitabilité

L'excitabilité des neurones a été évaluée en current-clamp en injectant un courant dépolarisant d'amplitude croissante pendant 500 ms. Ce protocole permet de déterminer (1) la capacité maximale de décharge en potentiel d'action ainsi que (2) le seuil minimal de courant nécessaire à l'obtention d'un potentiel d'action (rhéobase). Ces deux critères permettent de rendre compte du niveau d'excitabilité des neurones, un neurone étant d'autant plus excitable qu'il comporte une rheobase faible associée à une capacité de décharge élevée. Ce protocole permet également de déterminer la nature phasique (capable de décharger un maximum de 3 potentiels d'action) ou accomodante des neurones étudiés (**voir chapitre 1**).

Nos résultats indiquent que les neurones calbindine présentent une rhéobase plus élevée (86.7 ± 9.9 pA (calbindine) *versus* 56.3 ± 9.5 pA (non calbindine) ; $p<0.0001$) associée à une capacité de décharge en potentiel d'action réduite (nombre maximum de potentiel d'action : 2.2 ± 0.4 (calbindine) *versus* 3.1 ± 0.4 (non calbindine) ; $p<0.05$) par rapport aux autres neurones cardiaques (**figure 51**).

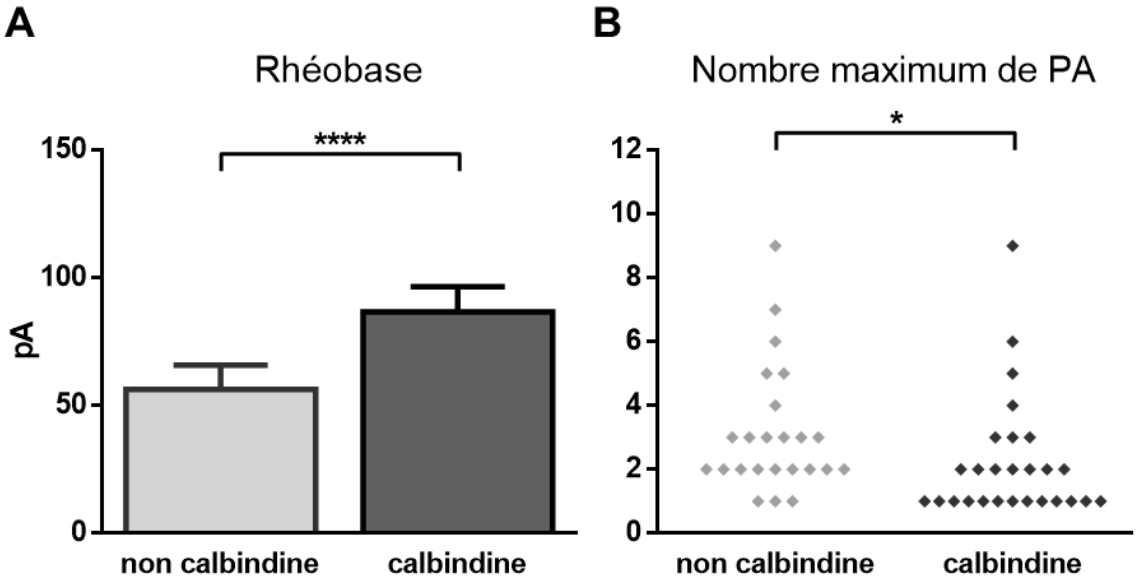


Figure 51 : Mesure de l'excitabilité neuronale. La rhéobase (**A**) et le nombre maximum de potentiels d'action (**B**) ont été déterminés en injectant des courants dépolarisants d'amplitudes croissantes (20 à 400 pA ; Δ20 pA) pendant 500 ms. (*p<0.05 ; ****p<0.0001 (test de Mann-Whitney) n=24 (non calbindine) ; n=27 (calbindine).

En revanche, cette faible excitabilité des neurones calbindine n'est pas associée à une proportion plus importante de neurones phasiques (calbindine : 85 % ; non calbindine : 75 % ; p=0.36 ; test du khi-deux).

b) Propriétés du potentiel d'action

Cette étude électrophysiologique s'est poursuivie par l'exploration des caractéristiques du potentiel d'action. Ces propriétés sont déterminées suite à l'injection d'un courant dépolarisant de 2 ms afin de limiter au maximum les interférences entre le courant injecté et la réponse membranaire. Concernant l'amplitude, la durée ainsi que les cinétiques de dépolarisation et de repolarisation du potentiel d'action, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes de neurones étudiés (**figure 52**).

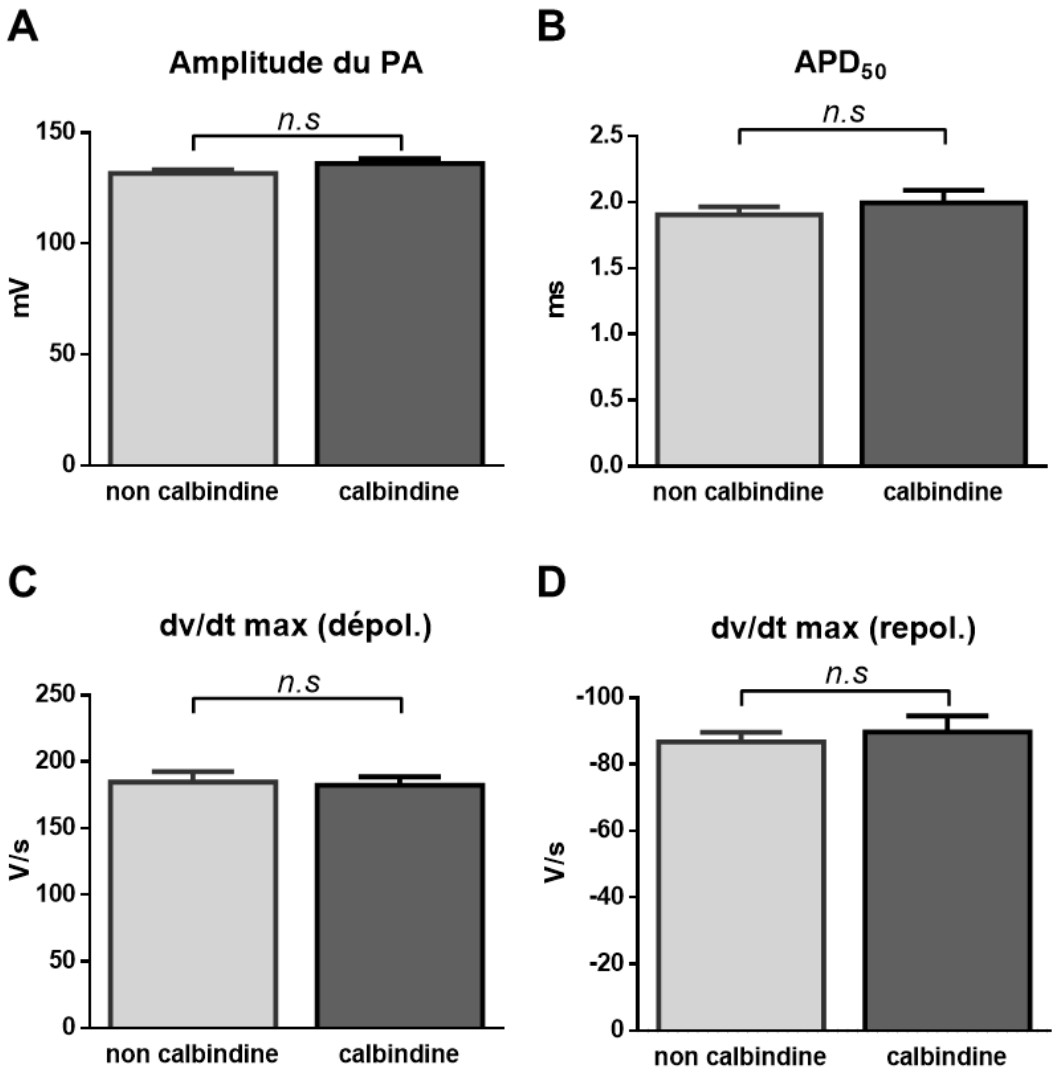


Figure 52 : Propriétés du potentiel d'action. L'étude du potentiel d'action a été réalisée en injectant un courant dépolarisant d'amplitude croissante (300 à 1500 pA ; Δ40 pA) pendant 2 ms. Les caractéristiques du potentiel d'action ont été déterminées à partir du deuxième potentiel d'action obtenu avec ce protocole (n.s : non significatif (**A et C** : test t de student) (**B et D** : test de Mann-Whitney)) n=24 (non calbindine) ; n=27 (calbindine).

En revanche, nos résultats indiquent que les neurones calbindine sont majoritairement composés de potentiels d'action ne présentant pas de phase d'hyperpolarisation (neurones sans AHP : 19/27 (calbindine) *versus* 10/24 (non calbindine)) (**figure 53 A**). Pour les neurones présentant une phase d'hyperpolarisation, la durée et l'amplitude de cette phase sont similaires pour les deux groupes de neurones étudiés (**figure 53 B et C**).

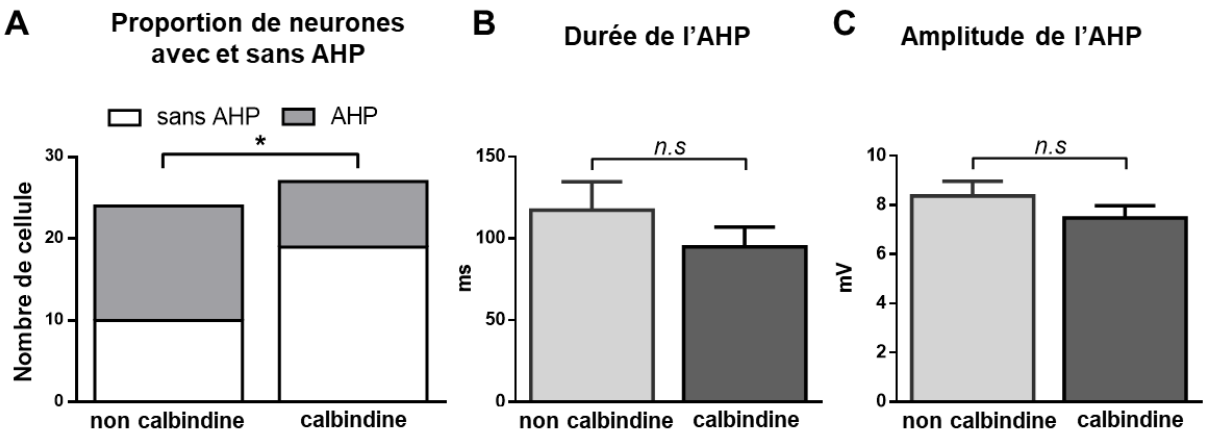


Figure 53 : Analyse de la phase d'hyperpolarisation. (**A**) Détermination de la proportion de neurones présentant ou non une phase d'hyperpolarisation. n=24 (non calbindine) ; n=27 (calbindine). Pour les neurones présentant une AHP (n=12 (non calbindine) ; n=7 (calbindine)), la durée (**B**) ainsi que l'amplitude (**C**) de l'AHP a été déterminée. (**A** :*p<0.05 (test du khi-deux) ; **B** : test de Mann-Whitney ; **C** : test t de student, n.s : non significatif).

En conclusion, ces résultats montrent que les neurones calbindine possèdent une signature électrophysiologique différente caractérisée par une excitabilité plus faible et une proportion réduite de potentiel d'action présentant une phase d'hyperpolarisation.

(iii) Etude des courants calciques en voltage-clamp

Les canaux calciques voltage-dépendants sont des acteurs clés de l'excitabilité neuronale (Xu and Adams, 1992b; Liu et al., 2012). Dans le contexte cardiaque, l'inhibition des canaux de type N entraine notamment une augmentation de la rhéobase associée à une réduction des capacités de décharge en potentiel d'action (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2018). Les neurones calbindine se distinguant des autres neurones cardiaques par leur faible excitabilité et leurs capacités de décharge réduites, il nous est donc apparu important d'étudier les courants calciques voltage-dépendants. Ces courants ont été étudiés en voltage-clamp et en utilisant le baryum comme porteur de charge.

Dans nos conditions, la dépolarisation des neurones cardiaques permet d'observer l'apparition d'un courant entrant à partir de -35 mV et qui atteint un maximum d'amplitude entre -20 et -15 mV. Cette densité de courant calcique apparait significativement réduite dans les neurones exprimant la calbindine pour des potentiels situés entre -30 et -20 mV (p<0.05, **figure 54**).

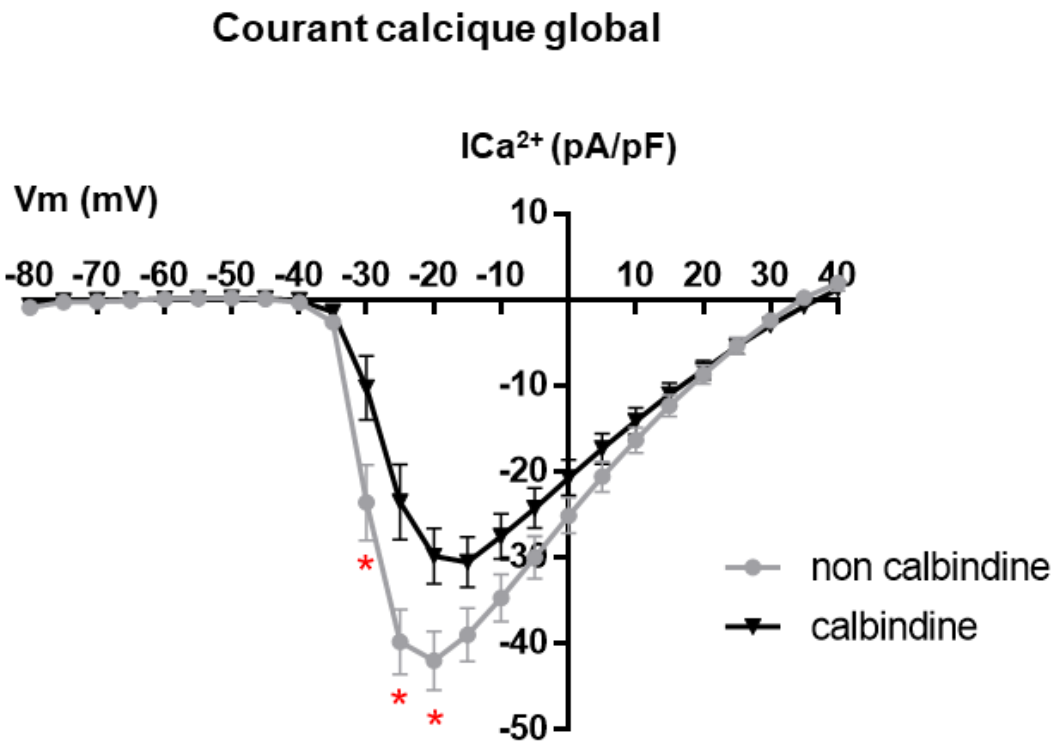


Figure 54 : Relation courant-potentiel du courant calcique global. Cette courbe a été obtenue en imposant une dépolarisation de -80 mV à +40 mV en 300 ms. n=12 (non calbindine) ; n=15 (calbindine). *p<0.05, test t de student.

Parmi les différents canaux calciques voltage-dépendants décrits au sein des neurones cardiaques, les canaux de type N apparaissent prédominants puisqu'ils seraient responsables de 70 % du courant calcique total chez le rat (Xu and Adams, 1992b). De plus, ces canaux joueraient un rôle déterminant en terme d'excitabilité puisque leur inhibition s'accompagne d'une importante réduction de celle-ci (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2018). Nous nous sommes donc par la suite intéressés à l'étude de ces canaux.

Le courant calcique de type N est obtenu en soustrayant le courant calcique global au courant calcique obtenu après perfusion de 1 µM d'oméga-conotoxine GVIA, inhibiteur spécifique des canaux calciques de type N (**figure 55**). De manière similaire à ce qui a été décrit chez le rat, la perfusion d'oméga-conotoxine s'accompagne d'une importante réduction de l'amplitude du courant calcique (à -25 mV : réduction de 55,3 ± 4.0 % de l'amplitude du courant), ce qui suggère que ce courant est également majoritaire dans les neurones cardiaques murins.

De plus, nos résultats suggèrent que la densité de courant calcique réduite observée chez les neurones calbindine pourrait notamment s'expliquer par une réduction de la densité de courant de type N chez ces neurones. En effet, pour des potentiels situés entre -30 et -25 mV, la densité de courant sensible à l'oméga-conotoxine apparait significativement inférieure chez les neurones calbindine (**figure 55 C et D**). Enfin, il est important de préciser que des courants

calciques autres que les courants de type N sont susceptibles d'être réduit chez les neurones calbindine. En effet, une fois le courant de type N bloqué, la densité de courant calcique reste significativement inférieure pour cette population neuronale à -20 mV (**figure 55 B**).

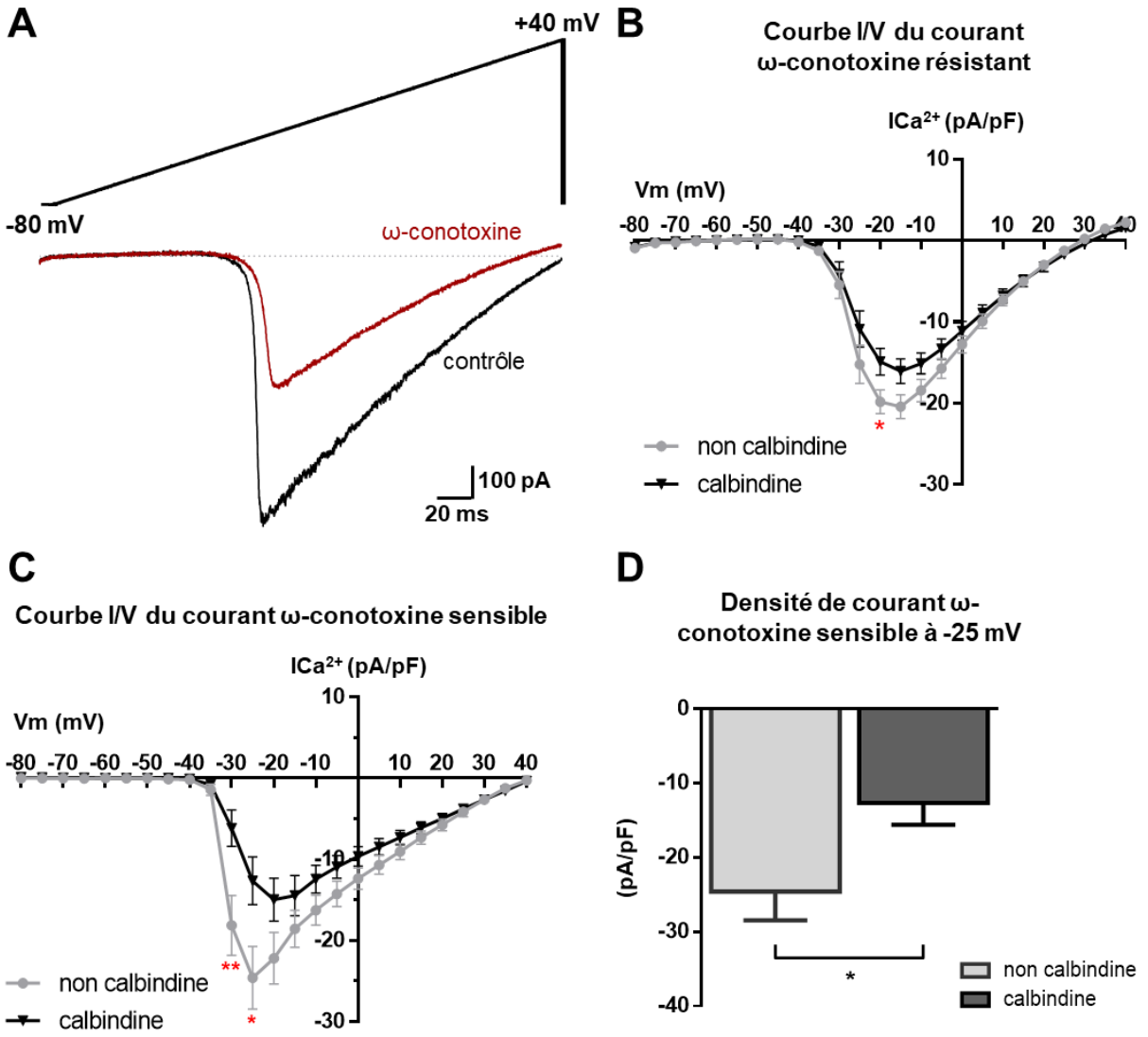


Figure 55 : Etude du courant calcique de type N. (**A**) Protocole de voltage-clamp utilisé pour l'étude de la relation courant-potentiel du courant calcique. L'oméga-conotoxine (1 µM) est utilisée pour inhiber spécifiquement le courant de type N. (**B**) Courbe courant-potentiel du courant calcique oméga-conotoxine résistant (**C**) Courbe courant-potentiel du courant calcique de type N. (**D**) Densité de courant de type N à -25 mV. *p<0.05, ** p<0.01 test t de student. n=12 (non calbindine) ; n=15 (calbindine).

Les neurones calbindine présentent une densité de courant calcique voltage-dépendant moins importante qui s'explique notamment par une densité de courant calcique de type N plus faible. Cette réduction pourrait expliquer la nature moins excitable de ces neurones.

En conclusion de ce chapitre, nos travaux démontrent que les neurones calbindine constituent une population neuronale intracardiaque caractérisée par des particularités morphologiques, phénotypiques et électrophysiologiques distinctes. Il est important de rappeler que les différences que nous avons mises en évidence sont très certainement sous-estimées en raison de notre efficacité de transduction virale qui ne permet d'aboutir à l'expression du rapporteur fluorescent que dans 60 % des neurones calbindine.

Chapitre 3 : Potentiel souche des acteurs ganglionnaires non neuronaux

Ce chapitre porte sur l'étude des cellules non neuronales composant les ganglions intracardiaques. Les nombreuses expériences d'immunomarquage que nous avons réalisées nous ont en effet permis d'observer que ces ganglions étaient composés d'un nombre très important de cellules n'exprimant pas de marqueurs neuronaux. Nous nous sommes donc intéressés aux cellules gliales, autres composants majoritaires du système nerveux périphérique. Outre leur rôle de soutien, de régulation de la communication neuronale et de la croissance des neurites, plusieurs études suggèrent que les cellules gliales pourraient participer à la production de cellules neuronales chez l'adulte (Laranjeira et al., 2011; Kulkarni et al., 2017; Zhang et al., 2019b). Les mécanismes de neurogenèse chez l'adulte sont principalement étudiés dans le système nerveux central, le dogme initial réfutant l'existence de tels mécanismes dans le système nerveux périphérique. Toutefois, depuis une dizaine d'années, plusieurs études menées sur le système nerveux entérique et les neurones des DRG tendent à suggérer que des mécanismes de neurogenèse pourraient avoir lieu en périphérie en condition physiologique ou physiopathologique (Laranjeira et al., 2011; Zhang et al., 2019b). A notre connaissance, cet aspect n'a pas encore été étudié dans le contexte du SNIC. A titre exploratoire, nous avons donc mis en place une approche expérimentale permettant d'évaluer l'existence de cellules possédant des propriétés souches au sein des ganglions intracardiaques. Les résultats présentés dans ce chapitre ne constituent que des travaux préliminaires qu'il conviendra de compléter par la suite.

[1]. Etude des acteurs ganglionnaires intracardiaques non neuronaux sur coupes de tissu cardiaque

Afin d'étudier la nature des cellules non neuronales composant les ganglions intracardiaques, nous avons mené plusieurs expériences d'immunohistomarquage en interrogeant des marqueurs de cellules gliales (GFAP (glial fibrillary acidic protein), glutamine synthetase) ainsi que des marqueurs de précurseurs neuronaux. Nous nous sommes également intéressés à l'expression du facteur de transcription Sox2, marqueur de cellules satellites gliales et de cellules souches neurales (Pevny and Nicolis, 2010; Zhang et al., 2019b).

Nous avons ainsi pu observer la présence de nombreuses structures immuno-réactives pour le marqueur glial GFAP. Ces structures sont aussi bien retrouvées dans les régions

intraganglionnaires, entourant les corps cellulaires des neurones, que dans le tissu cardiaque environnant. Au sein des ganglions, les marquages GFAP sont en étroite juxtaposition avec les fibres cholinergiques **(figure 56 a-b)**.

Au sein des ganglions intracardiaques, une grande partie des noyaux entourant les corps cellulaires neuronaux apparait marquée par le facteur de transcription Sox2 **(figure 56 c-d)**. L'expression de ce facteur de transcription n'est jamais retrouvée dans le noyau des neurones ni dans les autres cellules environnantes des ganglions cardiaques. L'expression du marqueur Sox2 et la localisation périsomatique de ces noyaux suggèrent fortement que ces cellules soient des cellules satellites gliales. Ces cellules sont également connues pour exprimer l'enzyme glutamine synthétase. Nous n'avons en revanche pas était capable de détecter l'expression de ce marqueur au sein des ganglions intracardiaques de souris.

Enfin, dans de rares cas, l'expression du marqueur de neuroblaste doublecortine (DCX) a été observée dans quelques corps cellulaires neuronaux **(figure 56 e-f)**. Ces neurones semblaient également caractérisés par un marquage MAP2 beaucoup moins intense, pouvant suggérer leur nature immature. Cet immunomarquage n'a en revanche était réalisé qu'une seule fois et nécessitera donc d'être confirmé de nouveau.

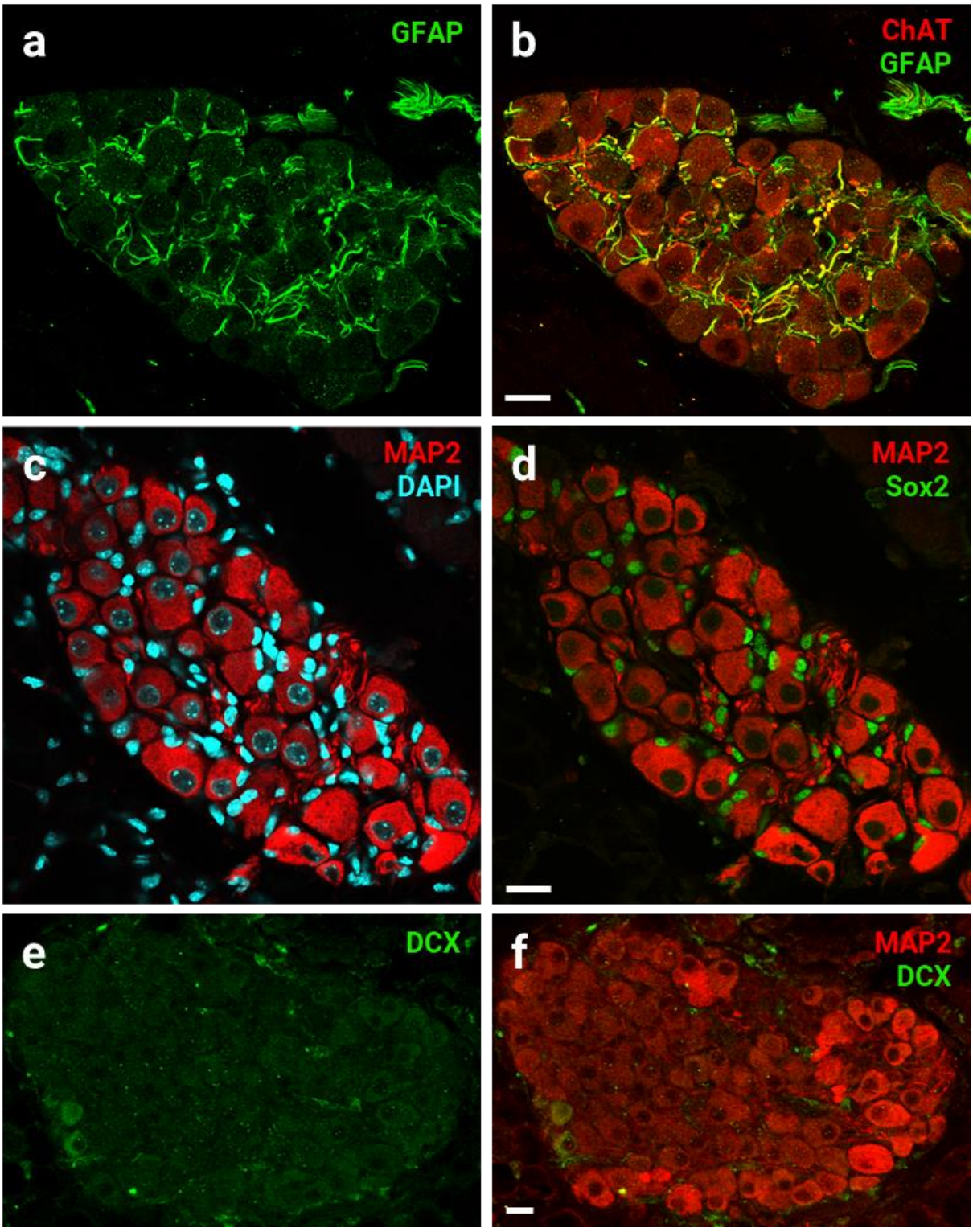


Figure 56 : Identification de phénotypes non neuronaux dans les ganglions intracardiaques murins. Immunodétection (en vert) de la GFAP (a-b), de Sox2 (**c-d)** et de la DCX (**e-f**) dans des ganglions intracardiaques par immunohistofluorescence. Les neurones (en rouge) sont marqués par MAP2 (**c-f**) et ChAT (**b**) et les noyaux avec du DAPI (en cyan). Toutes les images sont des projections d'intensité maximale en Z d'images confocales. Barre d'échelle : 20 µm.

Ces résultats montrent donc que les ganglions intracardiaques murins sont composés de nombreuses cellules non neuronales et notamment de cellules exprimant les marqueurs GFAP et Sox2.

Le facteur de transcription Sox2 participe activement au maintien des propriétés souches des cellules souches neurales et constitue ainsi un marqueur clé des principales aires de neurogenèse adulte du système nerveux central (Pevny and Nicolis, 2010). De plus, son expression est également retrouvée dans certaines cellules satellites gliales des DRG capables de former des neurosphères *in vitro* et participant à la production de nouveaux neurones (neurogenèse) en condition pathologique *in vivo* (Li et al., 2007; Zhang et al., 2019b). Nous nous sommes donc intéressés au comportement de ces cellules en culture après isolement.

[2]. Etude des cellules isolées à partir des ganglions intracardiaques : formation de sphères *in vitro*

Nous avons mis en place un protocole d'isolement et de culture cellulaire afin d'étudier le comportement des cellules intra-ganglionnaires cardiaques exprimant Sox2.

Après dissection de la zone ganglionnaire et dissociation enzymatique et mécanique des cellules, ce protocole permet d'obtenir une suspension cellulaire composée de neurones, identifiés par l'expression du marqueur neuronal β-tub III ainsi que des cellules Sox2-positives (**figure 57 a et c**). La détection du marqueur de prolifération Ki67 nous indique également qu'une petite proportion des cellules isolées est prolifératives (**figure 57 e)**.

Cette suspension cellulaire est alors filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire de 20 µm dans l'objectif d'éliminer les neurones ainsi que les agrégats cellulaires résiduels. Comme le montre **la figure 57**, cette étape de filtration permet d'éliminer la grande majorité des neurones tout en conservant les cellules exprimant Sox2 et marquées par Ki67. Après ensemencement, l'absence d'agrégats cellulaires a systématiquement été vérifiée avant le dépôt des boites de culture dans l'incubateur.

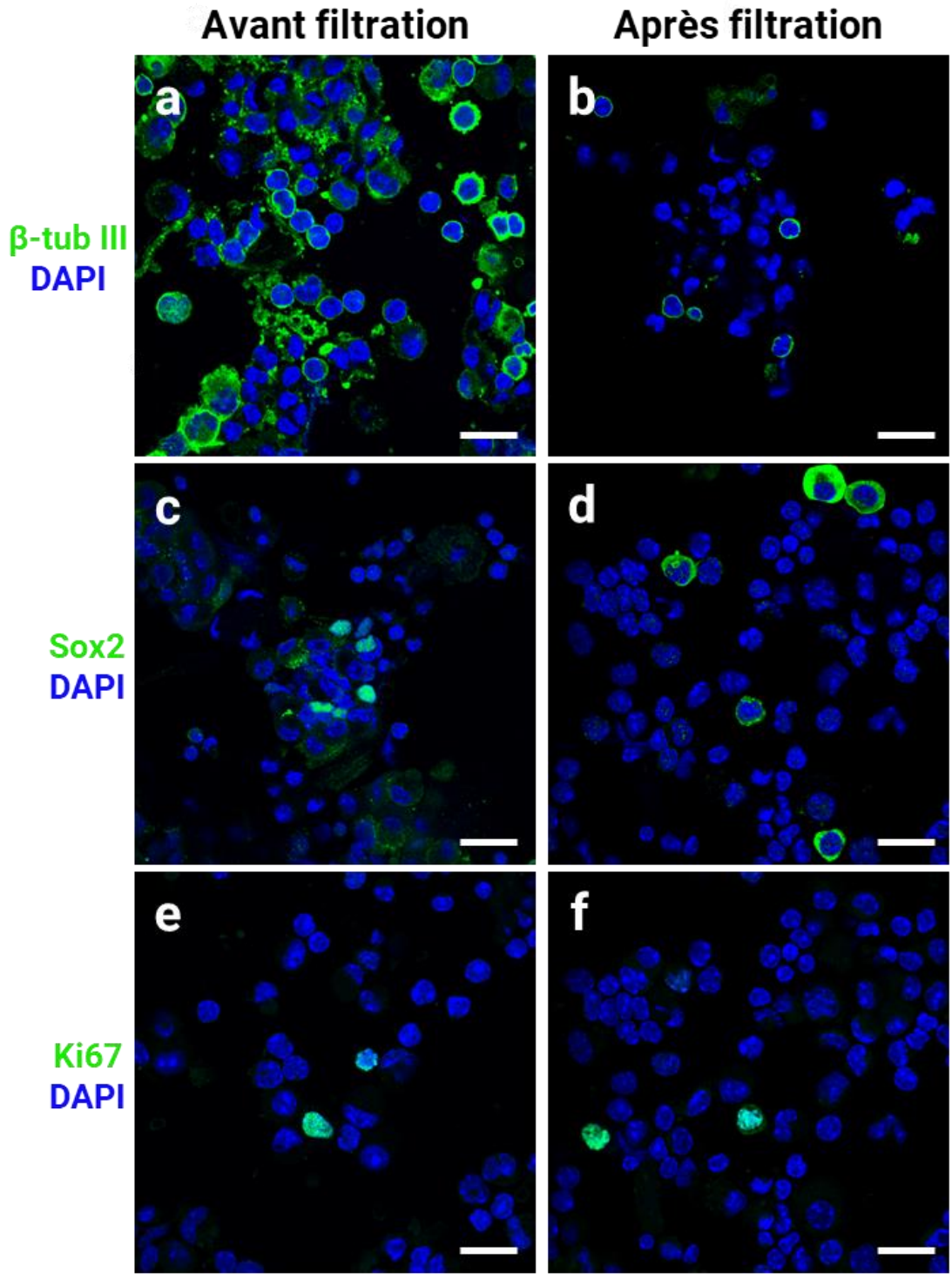


Figure 57 : Phénotype des cellules isolées et mises en culture. Immunodétection (en vert) de la β-tub III (**a-b**), de Sox2 (**c-d**) et de Ki67 (**e-f**) dans la suspension cellulaire issue de la zone ganglionnaire cardiaque. Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu). La dissociation enzymatique et mécanique de la zone ganglionnaire cardiaque permet d'obtenir une suspension cellulaire constituée de neurones et de cellules Sox2-positives (**a et c**). Une étape de filtration sur tamis cellulaire permet d'éliminer la majorité des cellules neuronales tout en conservant les cellules Sox2-positives (**b et d**). L'immuno-détection de Ki67 indique la présence de cellules prolifératives, conservées après filtration (**e-f**). Barre d'échelle : 20 µm.

Après ensemencement, l'observation quotidienne des cellules en culture a permis d'observer la formation de sphères non adhérentes dès la première semaine (**figure 58**). Ces sphères sont visibles dès le 4ème jour de culture et possèdent un diamètre variant de 100 à 400 µm, leur taille augmentant avec le temps. D'un point de vue phénotypique, les expériences d'immunomarquage permettent d'observer que ces sphères sont composées d'un grand nombre de cellules Sox2 positives ainsi que de cellules prolifératives identifiées par le marqueur Ki67. Une partie des cellules co-expriment ces deux marqueurs, suggérant la nature proliférative de certaines cellules Sox2. De nombreuses cellules exprimant le marqueur de cellules souches neurales Nestine ont également été identifiées au sein de ces sphères et certaines d'entre elles co-expriment également le marqueur prolifératif Ki67.

L'obtention de ces sphères a dans un premier temps été réalisée à partir de boites de culture recouvertes de poly-HEMA, traitement empêchant l'adhérence cellulaire. Ce revêtement étant également utilisé pour la formation de sphéroïdes en culture, le protocole a été reproduit en comparant systématiquement les résultats obtenus sur boite de culture standard avec ceux obtenus sur boite poly-HEMA. Ce contrôle permet de vérifier que la capacité à générer des sphères ainsi que le phénotype des cellules obtenues ne sont pas induits par le support utilisé. L'ensemencement des cellules sur support standard s'est également traduit par la formation de sphères après plusieurs jours de culture. Une partie de ces sphères adhèrent partiellement au support (**figure 58 a**) tandis que d'autres flottent dans le milieu de culture (**figure 58 a, encart**). Les phénotypes cellulaires observés sont également similaires à ceux obtenus sur support poly-HEMA, avec de nombreuses cellules marquées par Sox2, Ki67 et Nestine (**Figure 58 c et e**).

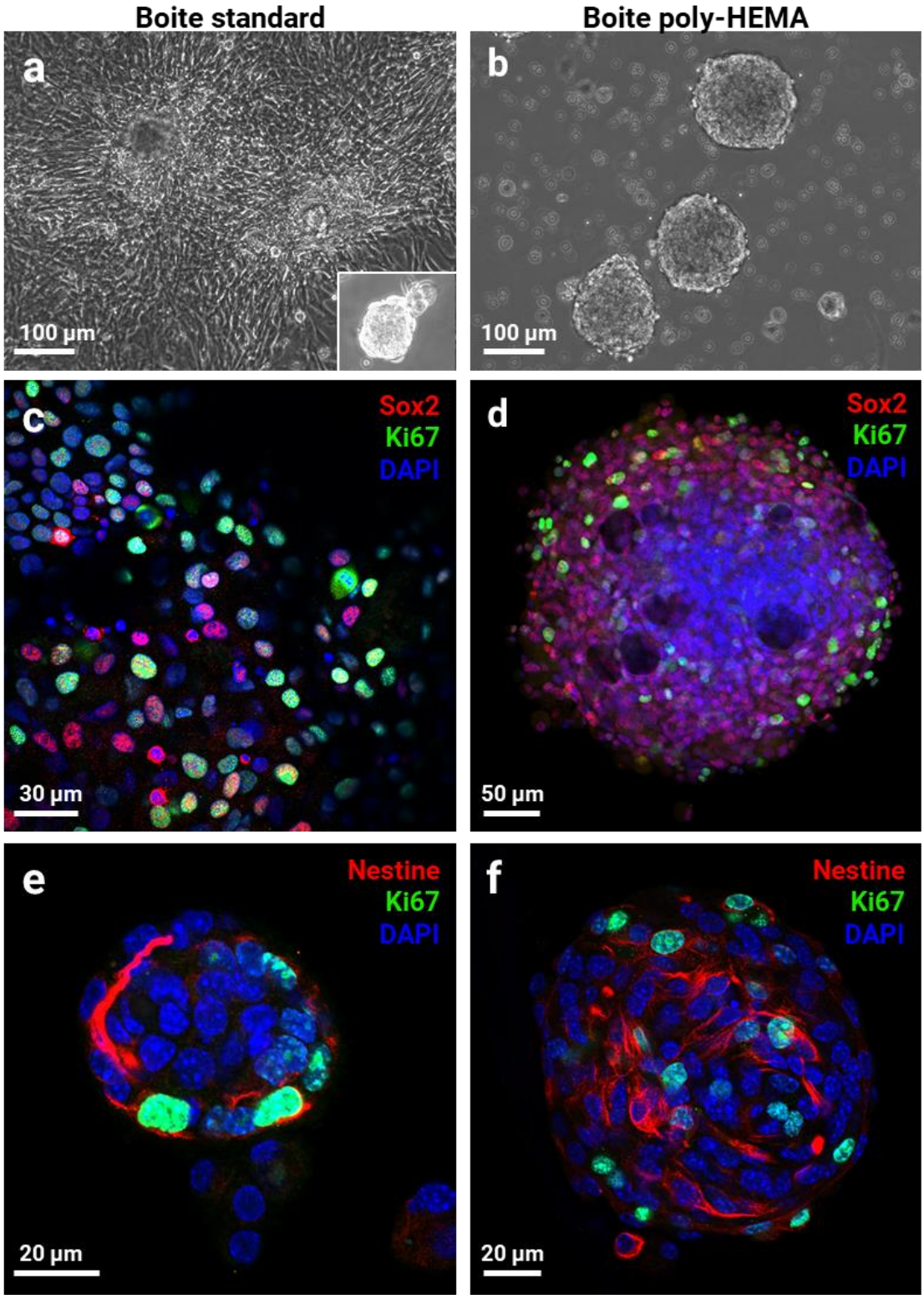


Figure 58 : Caractérisation des sphères obtenues en culture par immunofluorescence. Après plusieurs jours de culture, des sphères apparaissent sur support standard (gauche) et sur support poly-HEMA (droite). La nature des cellules composant ces sphères a ensuite été étudiée par immunofluorescence (**c-f**). Ces sphères sont formées de cellules immuno-réactives pour Sox2 (**c-d**), Ki67 (**c-f**) et Nestine (**e-f**), indépendamment du support de culture utilisé. Les noyaux sont marqués avec du DAPI en bleu.

L'obtention de sphères et de marqueurs souches neuronaux nous a ensuite amené à interroger les capacités d'auto-renouvellement des cellules ainsi isolées. Après dissociation mécanique des sphères primaires (sphères obtenues en premier lieu, après dissociation du tissu cardiaque), nous avons observé que ces cellules étaient capables de générer de nouvelles sphères (sphères II) sur support poly-HEMA. Ce protocole peut également être réitéré à partir de sphères secondaires et permettre l'obtention de sphères tertiaires (**tableau 16**).

	Sphère I (n=2)	**Sphère II (n=2)**	**Sphère III (n=1)**
Nombre de sphères générées à partir de 100 000 cellules	126	375	700

Tableau 16 : Capacité à former des sphères.

Tout comme les sphères primaires, ces sphères secondaires et tertiaires sont caractérisées par la présence de cellules exprimant Sox2, ki67 et nestine (**figure 59**).

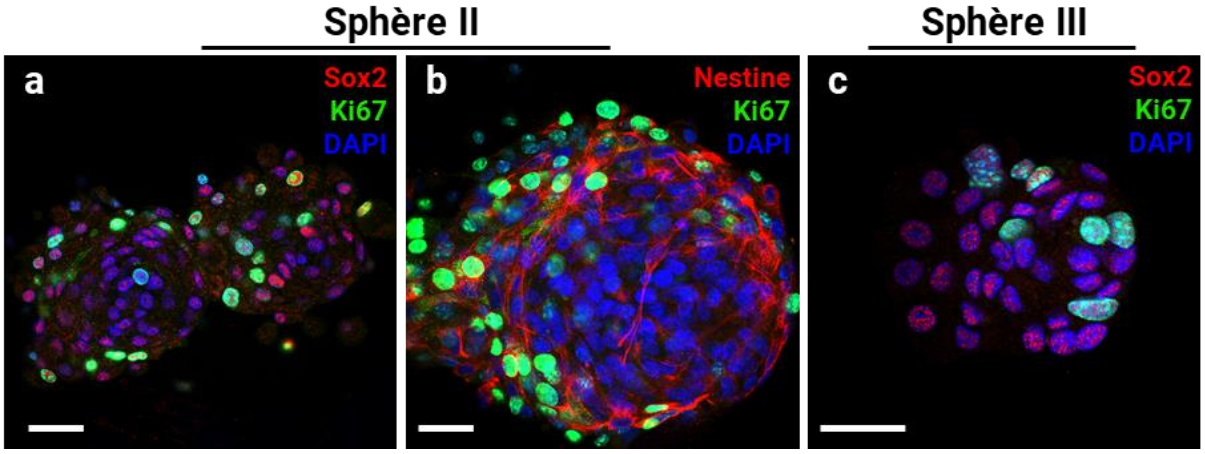


Figure 59 : Caractérisation des sphères secondaires et tertiaires obtenues sur support poly-HEMA par immunofluorescence. Immunodétection de Ki67 (en vert), de Sox2 (**a et c**) et de Nestine (**b**) (en rouge) au sein des sphères II et III. Les noyaux sont marqués avec du DAPI (en bleu). Barre d'échelle : 30 µm.

En revanche, l'obtention de ces sphères est exclusivement retrouvée pour le support poly-HEMA. Le repiquage des sphères sur support standard se traduit en effet par l'obtention de cellules adhérentes organisées en monocouche, au sein desquelles les marqueurs Ki67 et Sox2 sont conservés (**figure 60**). Quelques marquages Nestine ont également été observés après repiquage sur support standard **(figure 60 b**).

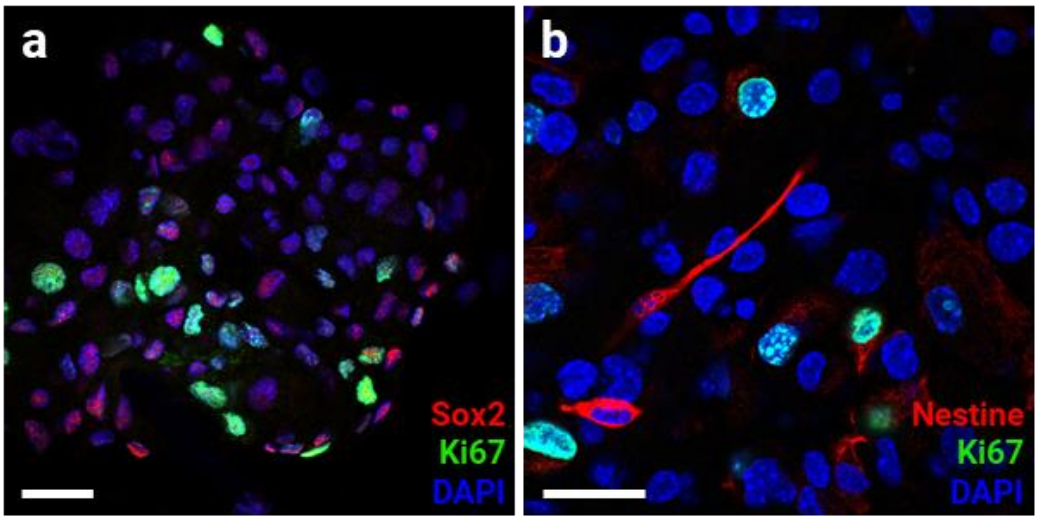


Figure 60 : Caractérisation des cellules obtenues après repiquage sur support standard. Immunodétection de Ki67 (en vert), de Sox2 (**a**) et de Nestine (**b**) (en rouge). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (en bleu). Barre d'échelle : 30 µm.

En conclusion, l'isolement et la mise en culture de cellules provenant de la zone ganglionnaire intracardiaque se traduit par l'obtention de sphères composées de cellules exprimant des marqueurs moléculaires de cellules souches neurales (Sox2, Ki67, Nestine) et capables de s'auto-renouveler pour générer des sphères secondaires et tertiaires.

[3]. Capacités de différenciation des sphères obtenues *in vitro*

L'obtention de cellules ayant des caractéristiques proches de celles des cellules souches neurales nous a ensuite conduit à nous intéresser à leurs capacités de différenciation et en particulier, à leur aptitude à générer de nouveaux neurones *in vitro*. Pour cela, les sphères ont été cultivées dans un milieu de différenciation après avoir été collectées sous microscope. La différenciation a été évaluée en testant trois combinaisons différentes de facteurs de croissance (FGF/BDNF ou FGF/NGF ou FGF/BDNF/NGF). De plus, l'incubation en milieu de différenciation a été précédée d'une incubation de 48 heures avec de la BrdU afin d'identifier les cellules nées en culture. En effet, la BrdU est uniquement incorporée à l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire, ce qui permet de certifier que les cellules BrdU-positives ont été générées *in vitro*.

En premier lieu, nous avons pu observer que cette étape de différenciation est associée à une perte d'expression du marqueur Sox2 (**figure 61)**.

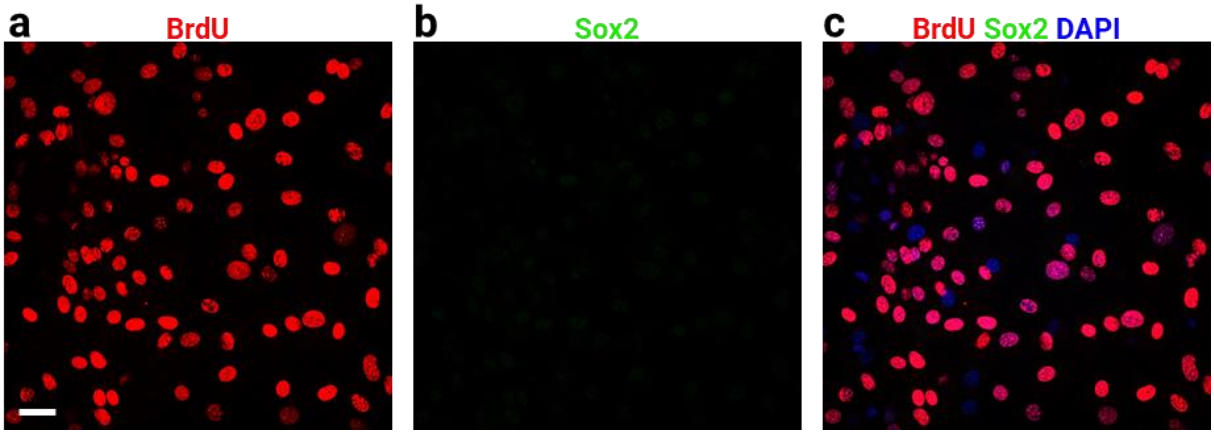


Figure 61 : Perte d'expression du facteur de transcription Sox2 après différenciation. Immunodétection de la BrdU (en rouge) et de Sox2 (en vert). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (en bleu). Barre d'échelle : 30 µm.

Des expériences d'immunomarquage ont ensuite été conduites afin d'identifier de potentiels marqueurs neuronaux.

Après différenciation, de rares cellules exprimant le marqueur de précurseur neuronal DCX ont pu être détectées. Certaines de ces cellules ont incorporé de la BrdU, ce qui signifie qu'elles sont apparues *in vitro* (**figure 62 a-c)**.

En revanche, on observe de nombreuses cellules exprimant le marqueur neuronal β-tub III. Ces cellules sont généralement formées d'un petit corps cellulaire à partir duquel émerge deux fins prolongements (**figure 62 d-f**). Certaines cellules β-tub III-positives sont également positives pour la BrdU (**figure 62 f (encart))**, démontrant qu'une partie de ces cellules sont nées en culture. Les cellules co-exprimant ces deux marqueurs sont généralement caractérisées par des prolongements moins importants pouvant suggérer une différenciation moins aboutie. Toutefois, il est important de préciser que la grande majorité des cellules immunomarquées par la β-tub III n'ont pas incorporé de BrdU. Cette absence de marquage n'exclut toutefois pas que ces cellules soient nées en culture.

Ces expériences de différenciation ont été conduites à partir de sphères primaires et secondaires et donnent lieu à des observations similaires. De même, la composition du milieu de différenciation en facteurs de croissance (FGF/BDNF ou FGF/NGF ou FGF/BDNF/NGF) ne semble pas grandement impacter les résultats obtenus. En revanche, nous avons constaté que la composition du milieu de culture utilisé influençait nettement la morphologie des cellules obtenues. En effet, le milieu DMEM F12 conduit à l'obtention de cellules β-tub III-positives dont les ramifications sont très limitées alors que le milieu neurobasal A, milieu spécifiquement adapté à la culture neuronale, permet d'obtenir des caractéristiques morphologiques typiques de neurones en culture (prolongements fins, longs et nombreux, présence de varicosités ; **figure 62 g-i**).

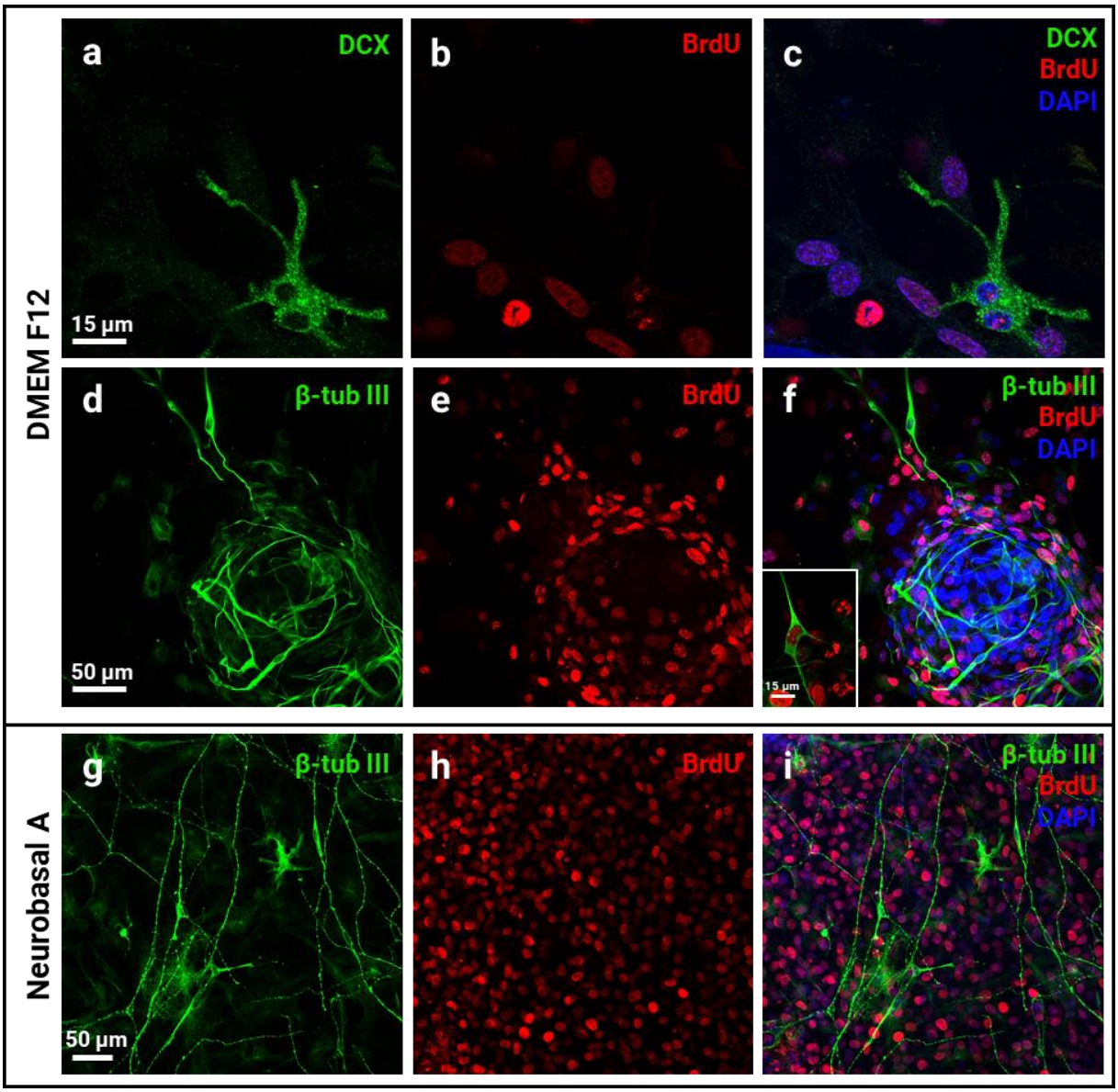


Figure 62 : Expression de marqueurs neuronaux après différenciation des sphères. L'aptitude des sphères à générer des neurones *in vitro* a été étudiée en cultivant les sphères primaires et secondaires dans un milieu de différenciation pendant deux semaines. Cette étape de différenciation a été précédée d'une incubation de 48 heures avec de la BrdU afin d'identifier les cellules nées en culture. La BrdU rentre dans l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire, ce qui permet de certifier que les cellules BrdU-positives ont été générées *in vitro.* Immunodétection (en vert) de la DCX (**a et c**) et de la β-tub III (**d-i**) ainsi que de la BrdU (en rouge). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu). L'encart de l'image f permet d'observer une cellule β-tub III-positive co-marquée par la BrdU.

Par la suite, nous avons cherché à identifier la nature des autres cellules présentes après différenciation. Pour cela nous avons conduit des expériences d'immunomarquage supplémentaires en interrogeant des marqueurs gliaux (GFAP, S100β), mésenchymateux (α-smooth muscle actin (α-SMA)) et endothéliaux (CD31). Dans de rare cas, nous avons ainsi pu observer des cellules exprimant les marqueurs gliaux GFAP et S100β (**figure 63 a-f**) ainsi que des cellules exprimant le marqueur endothéliale CD31 (**figure 63 g-i)**. Certaines des cellules

gliales présentaient également un marquage BrdU positif. Le marqueur de fibroblaste α-SMA n'a en revanche pas été retrouvé au sein de ces cultures.

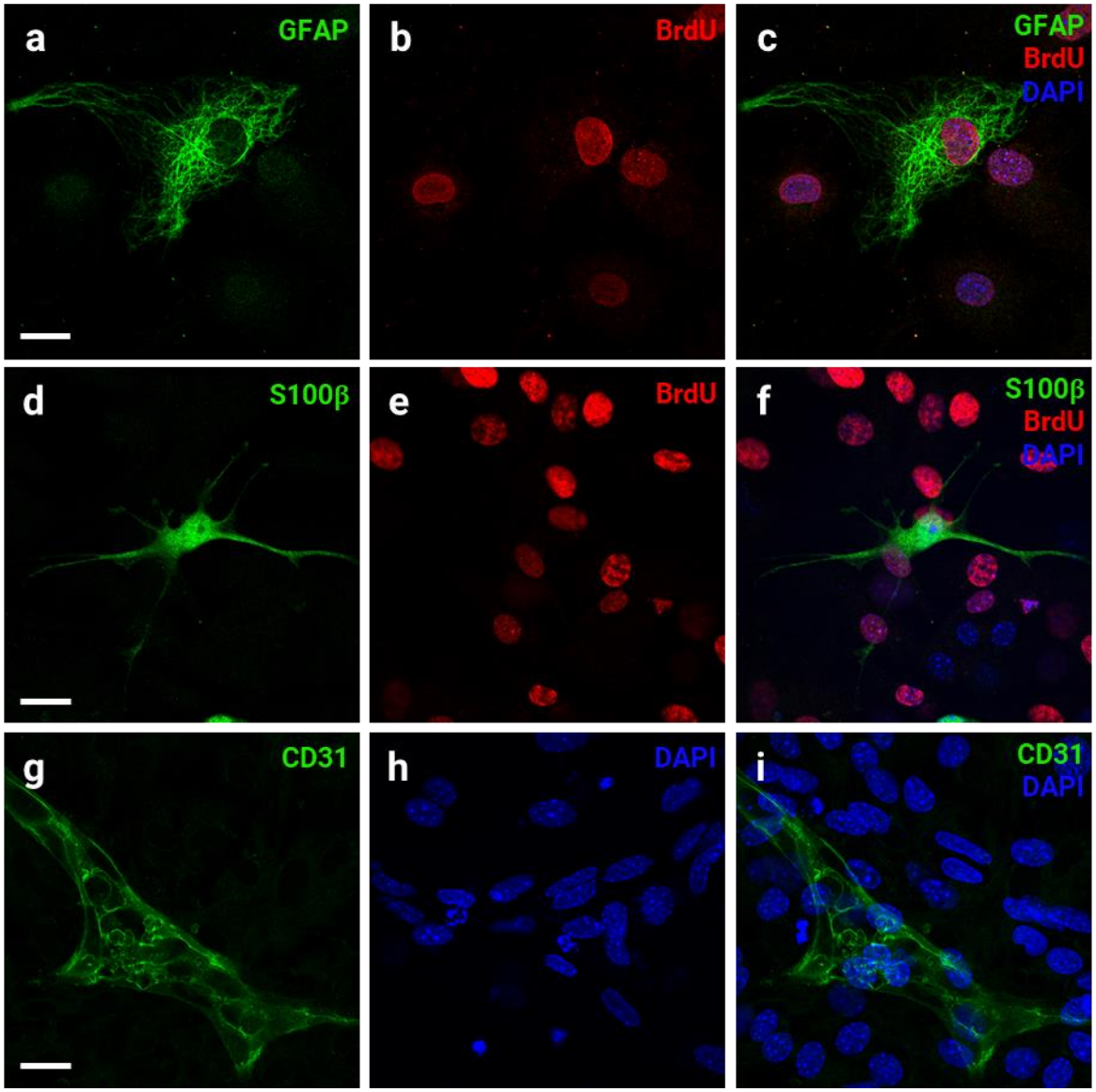


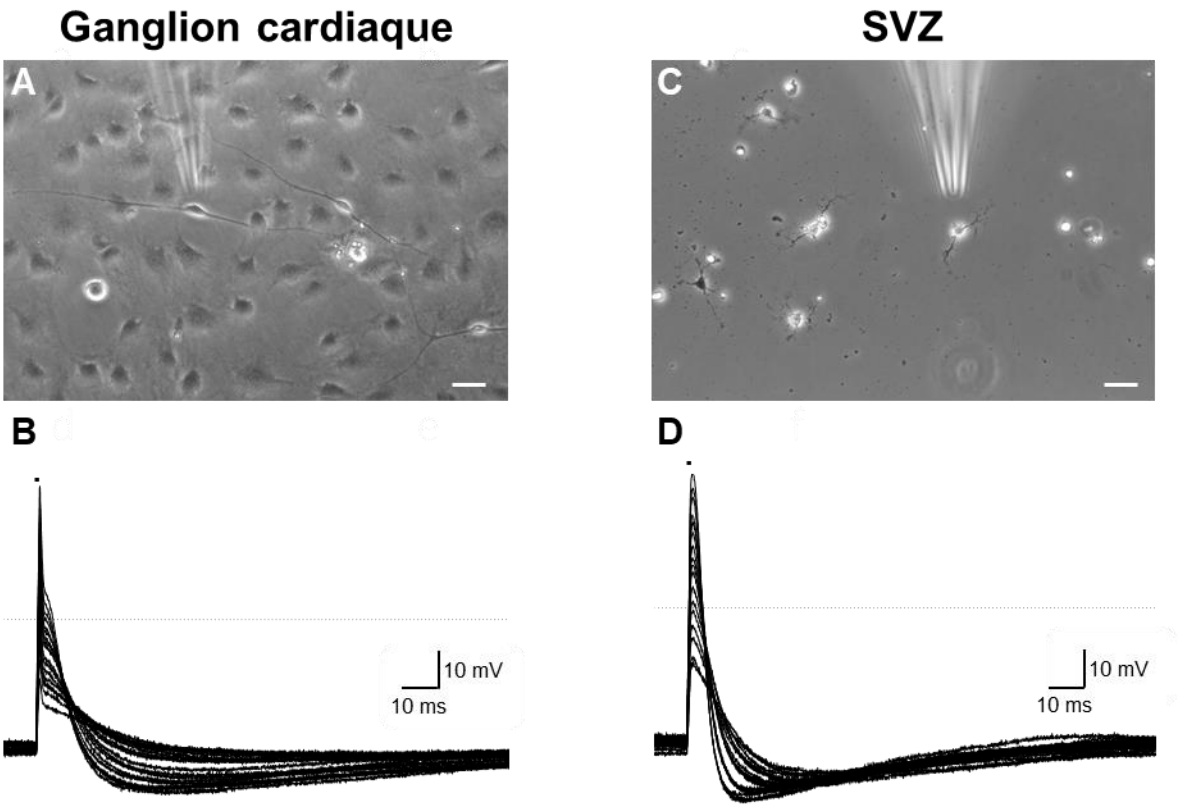
Figure 63 : Autres phénotypes cellulaires observés après différenciation des sphères. Immunodétection (en vert) de la GFAP (a et c), de S100β (**d-f**), de CD31 ainsi que du BrdU (en rouge). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle : 20 µm.

Ces résultats suggèrent que dans nos conditions de différenciation, les sphères dérivées de la zone ganglionnaire intracardiaque sont capables de générer des neurones qui expriment la β-tub III et présentent des caractéristiques morphologiques neuronales.

[4]. Caractéristiques électrophysiologiques des cellules obtenues après différenciation des sphères

Afin de poursuivre l'étude des cellules obtenues après différenciation, nous nous sommes finalement intéressés à leur fonctionnalité en étudiant leurs propriétés électriques grâce à la technique de patch-clamp. L'objectif de cette partie était de voir si l'expression de marqueurs neuronaux étaient également corrélée à l'acquisition d'un profil électrophysiologique neuronal.

Seules les cellules présentant une morphologie similaire à celle des cellules exprimant la β-tub III (petit corps cellulaire et fins prolongements, **figure 64 A)** ont été étudiées. Ces cellules possèdent un potentiel membranaire de -35,9 ± 1,2 mV et une capacité membranaire de 17 ± 1 pF. L'injection d'un courant dépolarisant ne permet pas d'initier un potentiel d'action. En revanche cette injection de courant se traduit par l'apparition d'une hyperpolarisation dont l'amplitude est proportionnelle à l'amplitude du courant injecté (**figure 64 B**). Ces propriétés électriques sont proches de celles enregistrées dans les mêmes conditions sur des cellules issues de la zone sous-ventriculaire (SVZ) (**figure 64)**.



E

	Capacité membranaire	Potentiel membranaire de repos
Ganglion intracardiaque (n=17)	17,1 ± 1,2 pF	-35,9 ± 1,2 mV
SVZ (n=3)	13,7 ± 2,7 pF	-38,0 ± 1,5 mV

Figure 64 : Propriétés électrophysiologiques des cellules différenciées. Les propriétés électriques des cellules différenciées ont été étudiées par la technique de patch-clamp, en configuration cellule-entière et en current-clamp. Les enregistrements réalisés sur les cellules issues de la zone ganglionnaire intracardiaque (gauche) ont été comparés à ceux obtenus à partir de cellules de la SVZ (droite) cultivées dans les mêmes conditions. (**A et C**) Photographies représentant la morphologie typique des cellules étudiées. Barre d'échelle : 20 µm (**B et D**) La capacité des cellules à initier un potentiel d'action a été évaluée en injectant des courants dépolarisants d'amplitudes croissantes (300 à 2000 pA ; Δ40 pA) pendant 2 ms. Le courant injecté est représenté par le trait noir. (**E**) Tableau récapitulatif des propriétés membranaires passives des cellules étudiées.

En voltage-clamp, ces cellules présentent un courant transitoire sortant voltage-dépendant qui s'active à partir de -20 mV. Lors d'une dépolarisation prolongée, ce courant s'inactive partiellement conduisant à la présence d'un courant persistant (**figure 65 A**). Ce courant sortant est probablement lié à l'activation d'un canal potassique voltage-dépendant. En effet, la perfusion de 4-AP (4 mM), bloqueur de canaux potassiques voltage-dépendants, se traduit par une réduction de 85 % de l'amplitude de courant enregistré à +10 mV (I=49.6±9.6 pA/pF (ctrl) *vs* I=7.2±3.5 pA/pF (4-AP)), démontrant le caractère 4-AP-sensible de ce courant (**figure 65 B**).

En current-clamp, la perfusion de 4-AP se traduit par une dépolarisation du potentiel membranaire de repos, un ralentissement de la phase de repolarisation ainsi qu'une réduction drastique de l'amplitude d'hyperpolarisation observée après injection d'un courant dépolarisant (**figure 65 C-E)**. Ces cellules expriment donc des canaux potassiques voltage-dépendants 4-AP sensibles responsables des phases de repolarisation et d'hyperpolarisation et qui semblent participer au potentiel membranaire de repos.

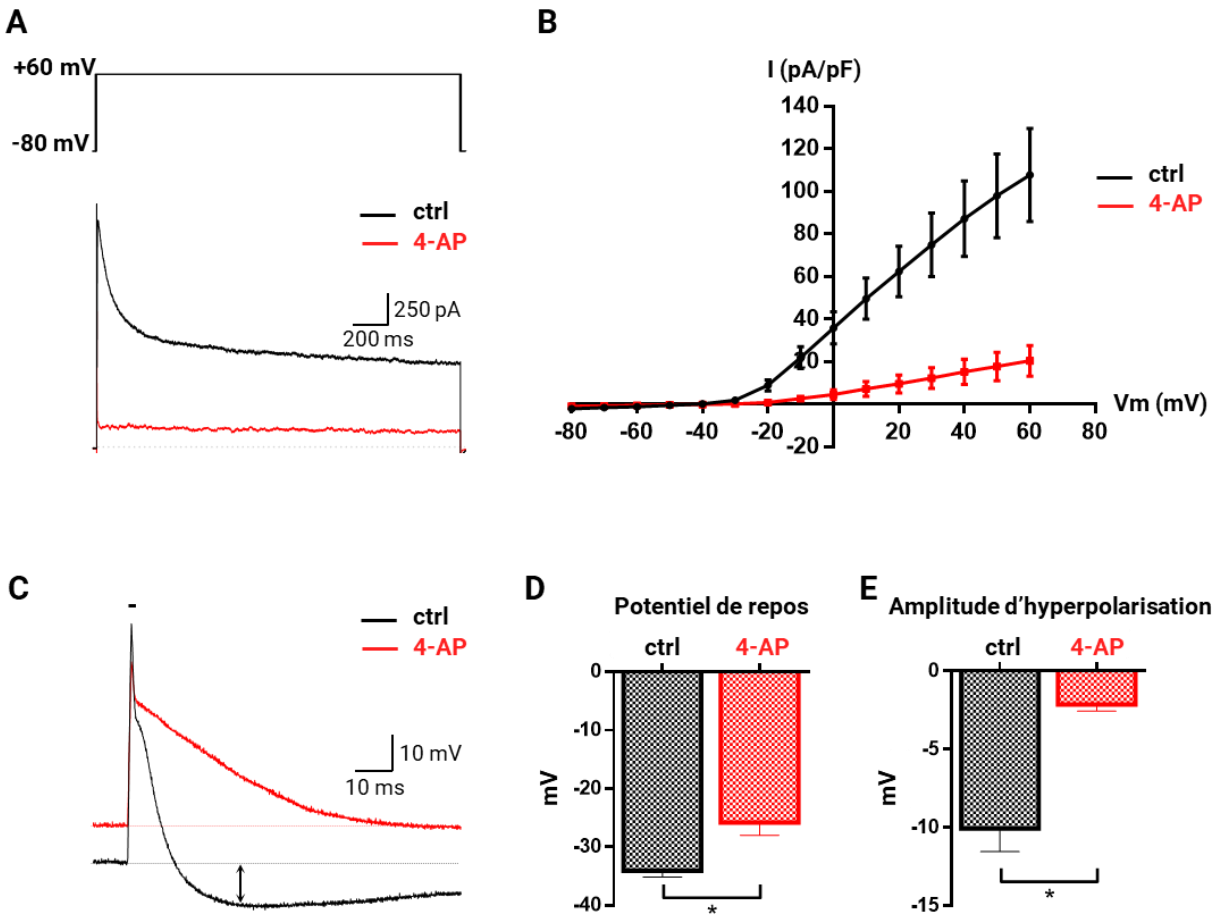


Figure 65 : Expression d'un courant sortant voltage-dépendant. (**A**) Traces représentatives du courant sortant enregistré lors d'une dépolarisation à +60 mV avant (noir) et après (rouge) perfusion de 4-AP (4 mM). (**B**) Relation courant-potentiel du courant sortant enregistré. n= 11 (ctrl) et n=7 (4-AP) (**C**) Traces représentatives du potentiel membranaire enregistré en réponse à l'injection d'un courant dépolarisant (900 pA, trait noir) avant (noir) et après (rouge) perfusion de 4-AP (4 mM). (**D**) Impact de la 4-AP sur le potentiel membranaire de repos. (**E**) Impact de la 4-AP sur l'amplitude d'hyperpolarisation. *p<0.05 ; test de Wilcoxon ; n=5.

Les cellules étudiées expriment un canal voltage-dépendant 4-AP sensible et présentent des propriétés électrophysiologiques similaires à celles des cellules issues de la SVZ. Ce profil électrophysiologique ne correspond pas à celui d'un neurone mature. D'un point de vue fonctionnel, le protocole de différenciation ne permet donc pas d'obtenir des cellules matures.

Discussion et perspectives

[1]. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système nerveux intracardiaque murin

Dans ce premier chapitre, nos résultats ont permis d'approfondir nos connaissances concernant la diversité et la complexité des neurones cardiaques de la souris, modèle expérimental offrant de multiples avantages pour l'amélioration de la compréhension du fonctionnement du SNIC mais toutefois très peu étudié jusque-là.

Nous avons tout d'abord montré que l'approche de transparisation d'organe iDISCO était applicable au tissu cardiaque, rendant possible l'étude globale de l'innervation cardiaque intrinsèque à l'échelle du cœur entier.

L'immunodétection de la ChAT nous a permis de visualiser la localisation exacte des ganglions intracardiaques chez la souris ainsi que de quantifier leur nombre et le volume total occupé par ces structures. Jusque-là, seule l'étude de Rysevaite et collaborateurs (2011) avait quantifié ces structures chez la souris, rapportant un nombre moyen de ganglions de 19 ± 3 par cœur (Rysevaite et al., 2011b), ce qui est en accord avec nos résultats. De plus, notre analyse volumique vient compléter ces résultats en indiquant que ces ganglions occupent un volume total proche de 0.2 mm^3. Il est important de préciser que cette valeur est nécessairement sous-estimée sur les cœurs transparisés du fait de la réduction de la taille de l'échantillon au cours du protocole iDISCO. Toutefois, nous avons pu déterminer que cette réduction n'était que de l'ordre de 15 % dans nos conditions. Le volume total occupé par les ganglions découlant directement de la taille des corps cellulaires et du nombre total de neurones présents, cette quantification pourrait représenter une approche intéressante pour l'étude du remodelage des structures nerveuses intracardiaques au cours du vieillissement ou en conditions pathologiques. Les travaux ayant étudié l'impact du vieillissement sur les neurones cardiaques sont par exemple contradictoires, ceux réalisés chez l'humain rapportant une diminution du nombre de neurones au cours de la vie (Pauza et al., 2000) et ceux menés chez le chien et le cobaye n'ayant pas observé d'évolution particulière (Pauza et al., 2002; Batulevicius et al., 2005). Une approche plus global de quantification à l'échelle de l'organe entier comme celle que nous avons développé permettrait donc de compléter ces travaux. Le remodelage des structures ganglionnaires peut également être associé à certaines pathologies cardiaques. Par exemple, plusieurs travaux ont montré que l'insuffisance cardiaque était associée à une hypertrophie des corps cellulaires neuronaux intracardiaques

(Singh et al., 2013). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact d'autres pathologies cardiaques sur les structures ganglionnaires intracardiaques. L'amylose cardiaque, pathologie caractérisée par une accumulation de plaques amyloïdes dans le tissu cardiaque, est par exemple associée à un déséquilibre de la balance autonome. Il pourrait donc être intéressant d'étudier les structures nerveuses intracardiaques dans ce contexte pathologique (Yamada et al., 2020).

Nous avons également développé une macro sous ImageJ permettant de quantifier la longueur totale des fibres nerveuses innervant le myocarde. Bien que cette approche ne permette pas de quantifier les structures les plus fines, cette méthode de quantification automatique pourrait représenter un moyen rapide pour l'identification d'anomalies de l'innervation cardiaque. En effet, de nombreuses pathologies cardiaques telles que l'infarctus du myocarde ou bien la FA font état d'une modification de l'innervation pouvant se traduire par des régions cardiaques présentant un déficit d'innervation (e.g. zone myocardique ischémique) ou bien par des zones présentant une innervation anormalement dense (e.g. hyper-innervation sympathique auriculaire chez les patients atteints de FA) (Gould et al., 2006; Yokoyama et al., 2017). Ainsi, notre méthode d'analyse pourrait permettre d'identifier efficacement de telles anomalies dans d'autres contextes pathologiques (e.g. fibrose cardiaque, amylose cardiaque).

D'un point de vue phénotypique, les neurones cardiaques murins présentent une diversité neurochimique semblable à celle des autres espèces (Richardson et al., 2003, 2006; Hoover et al., 2009).

Outre l'expression de la ChAT que nous avons retrouvé dans la quasi-totalité des neurones, nos résultats indiquent que 28 % des neurones expriment aussi la TH, ce qui suggère leur capacité à synthétiser des catécholamines. Jusque-là, l'expression de marqueurs catécholaminergiques dans le SNIC de la souris n'avait été rapportée que par deux études menées par le groupe de Rysevaite et de Hoard (Hoard et al., 2008; Rysevaite et al., 2011b). Le groupe de Rysevaite a retrouvé l'expression de la TH dans seulement 18 % des neurones, nos résultats sont donc plus proches de ceux de Hoard qui rapportent l'expression de ce marqueur dans 30 % des neurones. Le fait qu'un même neurone exprime à la fois des marqueurs cholinergiques et catécholaminergiques n'est pas surprenant puisque cela a été observé dans les neurones cardiaques de nombreuses autres espèces. En revanche, l'aptitude de ces neurones à libérer les catécholamines ainsi synthétisées est quelque peu remise en question par les travaux suggérant l'absence d'expression du transporteur vésiculaire VMAT2 (Weihe et al., 2005; Hoard et al., 2008). Certains suggèrent que ces libérations pourraient alors être médiées par le transporteur NET mais cette possibilité n'a pas

encore été investiguée. Il serait donc intéressant de venir réellement démontrer l'aptitude de ces neurones à libérer des catécholamines. A cette fin, le traceur fluorescent FFN 200 (fluorescent false neurotransmitter) récemment développé pour le marquage et le suivi des libérations synaptiques de noradrénaline pourrait par exemple être utilisé (Dunn et al., 2018). Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier le rôle physiologique d'une telle catégorie de neurone, capable de libérer deux neurotransmetteurs aux effets complétement antagonistes. Il est toutefois possible que ces deux neurotransmetteurs ne soient pas systématiquement co-libérés. En effet, dans certains neurones, les différents neurotransmetteurs peuvent être stockées dans différentes catégories de vésicule synaptique et c'est la fréquence ou la durée de stimulation qui détermine le type de vésicule, et par conséquent le type de neurotransmetteur, libéré (Svensson et al., 2019).

Nous avons également observé la présence d'une petite population de neurones nitrergiques caractérisés par l'expression de l'enzyme nNOS. Il est intéressant de mentionner que l'importance de ce phénotype semble considérablement varier d'une espèce à l'autre, l'expression de cette enzyme étant retrouvée dans la quasi-totalité des neurones cardiaques humains et dans seulement 4 % de ceux du rat (Klimaschewski et al., 1992; Hoover et al., 2009). Chez la souris, seule l'équipe de Maifrino avait rapporté jusque-là l'existence d'un tel phénotype, représentant 10 % des neurones cardiaques (Maifrino et al., 2006). Nos résultats sont donc quelque peu différents de ceux obtenus par cette équipe car nous avons détecté l'expression de nNOS dans moins de 2 % des neurones étudiés. Cette discordance peut toutefois s'expliquer par la différence de méthode utilisée, l'équipe de Maifrino ayant utilisé une approche histochimique de détection de l'activité NADPH-diaphorase, méthode alternative utilisée pour la détection des neurones nitrergiques (Hope et al., 1991). Le NO produit par ces neurones nitrergiques peut avoir des effets tant pré-synaptiques que post-synaptiques. En effet, il serait impliqué dans une réduction des libérations sympathiques de noradrénaline et une augmentation des libérations parasympathiques d'acétylcholine (Paton et al., 2002). Au niveau post-synaptique, le NO génère des effets chronotropes positifs qui découleraient notamment de la modulation de l'activité du canal HCN des cellules nodales (Musiałek, 2002). De plus, le NO est largement connu pour ses effets vasodilateurs au niveau vasculaire (Ahmad et al., 2018). Les travaux menés par le groupe de Brack suggèrent également que le NO pourrait médier des effets protecteurs anti-arythmiques, notamment au niveau ventriculaire où il réduirait la susceptibilité aux fibrillations ventriculaires (Brack et al., 2007). Bien que nos résultats indiquent une très faible proportion de neurones nitrergiques dans le SNIC de la souris, il serait intéressant d'étudier davantage le rôle de ces neurones dans le contexte cardiaque.

En dehors de ces phénotypes qui avaient déjà été mentionnés chez la souris, nos résultats ont permis d'identifier la présence de quatre autres marqueurs neuronaux (NPY, CART, calbindine et VGLUT2) encore jamais décrits dans le SNIC de cette espèce. La présence du NPY n'est pas surprenante puisque ce peptide est connu pour être exprimé au sein du système nerveux autonome et que son expression a été rapportée dans les neurones cardiaques du rat et du cobaye (Horackova et al., 1999; Richardson et al., 2003). Ce peptide étant capable d'exercer des effets tant au niveau neuronal qu'au niveau musculaire, il joue très certainement un rôle important dans la régulation des fonctions cardiaques par le SNIC.

Nos résultats indiquent également la présence du peptide CART dans 61 % des neurones cardiaques de la souris. Cette proportion est encore supérieure à ce qui avait été retrouvé chez le rat (46 %) (Richardson et al., 2006). Bien que l'expression de ce peptide ait été rapportée dans de nombreux réseaux neuronaux, notamment au niveau du système nerveux entérique, sa fonction biologique tout comme la nature de ses récepteurs restent encore inconnues. Devant l'importante proportion de neurones cardiaques exprimant ce neuropeptide, il serait donc intéressant d'étudier sa fonction dans le contexte cardiaque. Bien que le ou les récepteurs de CART n'aient pas encore été clonés, plusieurs études suggèrent que ce peptide agirait par l'intermédiaire de RCPG couplés à une protéine $G_{i/0}$ (Ahmadian-Moghadam et al., 2018). La voie de l'adénylate cyclase étant cruciale dans les mécanismes de régulation cardiaque, ce peptide pourrait avoir d'importants effets cardiovasculaires. L'injection systémique de ce peptide a notamment été corrélée à une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Matsumura et al., 2001; Hwang et al., 2004; Ivanova et al., 2007). En revanche, ces effets semblent principalement médiés par des actions sur le système nerveux centrale et non par des effets directs sur les cellules du système cardiovasculaire. Néanmoins, l'impact du peptide CART sur les fonctions cardiaques ayant très peu été étudié, il semble important d'explorer davantage cette voie à l'avenir.

En dehors de ces neuropeptides, nous avons également détecté l'expression de la protéine de liaison au calcium calbindine dans près de la moitié des neurones étudiés. Jusque-là, l'expression de cette protéine dans le SNIC n'avait été rapportée que par une seule étude menée chez le rat et dans laquelle seule 7 % des neurones étaient marqués (Richardson et al., 2003). Dans notre étude, ces neurones semblent établir de nombreuses connexions avec les autres neurones environnants puisque de nombreuses varicosités périsomatiques immunoréactives pour la calbindine ont été observées au sein des ganglions. Ces observations nous ont d'ailleurs amené à étudier spécifiquement cette population neuronale (**voir chapitre 2 de la section résultats**) et sera discuté dans la partie suivante.

Enfin, notre approche d'immunomarquage nous ayant amené à observer quelques neurones immunoréactifs pour VGLUT2, il est possible que certains neurones cardiaques soient capables de synthétiser du glutamate. En revanche, ces résultats sont très éloignés de ceux de Wang et Miller qui rapportent l'expression de nombreux marqueurs glutamatergiques (VGLUT1, VGLUT2 et glutaminase) dans une proportion non négligeable de neurones cardiaques (Wang and Miller, 2016).

L'étude des propriétés électrophysiologiques de ces neurones en current-clamp nous a également permis d'identifier différents groupes de neurones.

En s'intéressant aux capacités de décharge de ces neurones, nous avons ainsi identifié des neurones phasiques, caractérisés par une faible activité de décharge (3 potentiels d'action maximum) ainsi que des neurones accommodant, affichant des capacités de décharge supérieures. Au-delà de ces propriétés, nous avons montré que le profil phasique était également associé à une rhéobase plus élevée, et par conséquent, un niveau d'excitabilité plus faible ainsi qu'à une AHP plus longue. L'ensemble de ces éléments suggèrent donc que ces deux groupes de neurones n'expriment pas les mêmes canaux ioniques ou du moins pas dans les mêmes proportions. Il serait donc intéressant de venir interroger les différents canaux ioniques exprimés par ces deux catégories de neurones. Les canaux sodiques sont par exemple très importants pour l'excitabilité neuronale ; l'expression différentielle de ces canaux pourrait donc expliquer l'existence de ces deux classes de neurones. Le canal calcique de type N est quant à lui un régulateur crucial de la fréquence de décharge et de la rhéobase (Liu et al., 2012), on peut par exemple émettre l'hypothèse que son expression soit réduite au sein des neurones phasiques. De même, les canaux HCN et KCa participent à la durée de l'AHP ainsi qu'à la fréquence de décharge en potentiels d'action (Edwards et al., 1995; Hogg et al., 2001; Rimmer and Harper, 2006). Il est donc possible que l'expression de ces canaux soit différente entre ces deux groupes de neurones.

L'étude des propriétés du potentiel d'action nous a aussi amené à observer deux autres types de neurones, certains présentant une AHP et d'autres non. En plus de cela, les neurones possédant une AHP présentent un potentiel de repos plus dépolarisé associé à une amplitude de potentiel d'action et une vitesse de dépolarisation réduites. Les canaux potassiques étant très importants pour le potentiel membranaire de repos et la phase d'AHP, il serait intéressant de venir les étudier dans ces deux groupes de neurones.

Nous n'avons observé aucune corrélation entre le profil phasique ou accommodant et la présence ou non d'une AHP. Ainsi, nos travaux ont permis d'identifier quatre classes de neurones : des neurones phasiques présentant ou non une AHP ainsi que des neurones accommodant avec ou sans AHP (**figure 66**).

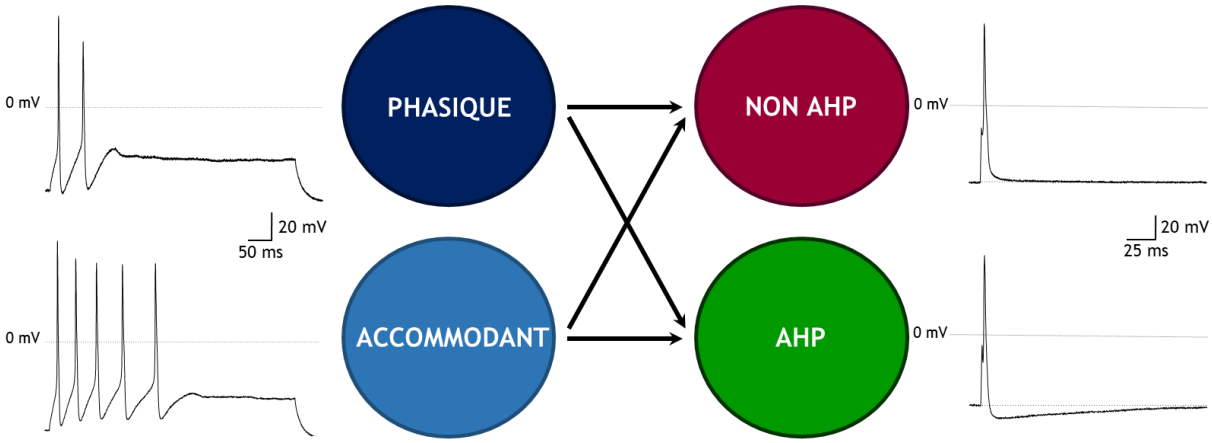


Figure 66 : Les neurones murins sont répartis en 4 classes distinctes selon leurs propriétés électrophysiologiques.

Nous avons également montré que les neurones cardiaques murins étaient capables de répondre à différentes substances neuro-modulatrices puisqu'ils ont montré une réponse membranaire à la perfusion d'acétylcholine, d'ATP et de BK. Ainsi, la perfusion d'acétylcholine s'est traduit par l'activation d'un courant entrant rapide, reflétant très probablement l'activation des récepteurs nicotiniques, et suffisant pour initier des potentiels d'action. De même, l'application d'ATP a conduit à l'activation rapide d'un courant entrant typique du courant médié par les récepteurs P2X. Il est intéressant de mentionner que les différentes classes de neurones que nous avons identifiées présentent une sensibilité différente à ces deux molécules pharmacologiques. En effet, l'amplitude du courant médié par l'acétylcholine et l'ATP est significativement inférieure dans les neurones présentant une AHP. Ainsi, au-delà de présenter des potentiels d'actions distincts, ces deux classes de neurones présentent également des réponses pharmacologiques différentes.

Il est possible que les réponses pharmacologiques que nous avons observées aient été partiellement impactées par notre approche d'enregistrement en cellule-entière. En effet, les études pharmacologiques menées sur les neurones cardiaques ont montré qu'un grand nombre de substances exerçaient leurs effets par l'intermédiaire de RCPG. Par exemple, l'acétylcholine est capable de médier des effets tant par sa fixation sur ses récepteurs nicotiniques que par sa fixation sur les récepteurs muscariniques (Hirayama et al., 2015). De même, les réponses purinergiques peuvent découler des récepteurs P2X comme des récepteurs P2Y (Liu et al., 2000; Ma et al., 2005). La configuration cellule-entière n'est toutefois pas la configuration la plus appropriée pour l'enregistrement des réponses dépendantes des RCPG puisque la dilution du milieu intracellulaire qu'elle provoque est généralement associée à une interruption des voies de signalisation dépendantes des RCPG (Linley, 2013). Ceci pourrait notamment expliquer que la perfusion de BK n'ait conduit qu'à une très faible

dépolarisation membranaire dans notre étude alors qu'elle se traduit par des effets excitateurs beaucoup plus importants (survenue de trains de potentiels d'action) dans les travaux publiés par Arichi et collaborateurs (Arichi et al., 2019). A l'avenir il serait donc intéressant d'étudier la réponse pharmacologique des neurones cardiaques murins en patch perforé, approche préservant l'intégrité du milieu intracellulaire, et ainsi, les réponses médiées par les seconds messagers intracellulaires.

Enfin, en étudiant les courants sodiques voltage-dépendants de ces neurones, nous avons montré que les neurones cardiaques murins exprimaient à la fois des canaux sodiques TTX-sensibles (92 % du courant total) et TTX-résistants (8 % du courant total). Nos résultats sont très similaires à ceux obtenus chez le chien par le groupe de Scornik qui indiquent une part TTX-résistante représentant 9 % du courant sodique total (Scornik et al., 2006). Chez la souris, le groupe de Verkerk a suggéré que les neurones cardiaques exprimaient le canal TTX-résistant $Na_v1.8$ (Verkerk Arie O. et al., 2012). Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas été en mesure de détecter la présence de ce canal puisque la perfusion de 0.5 µM d'A-803467 ne s'est pas traduite pas une réduction de l'amplitude du courant sodique. En revanche, nous suggérons que la part TTX-résistante pourrait être portée par le canal $Na_v1.5$. En effet, la perfusion d'une solution de TTX à 2 µM, valeur correspondant à l'IC_{50} de $Na_v1.5$ et éloignée de l'IC_{50} de $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ (~45 µM), s'est traduite par une réduction de près de la moitié du courant TTX-résistant. A l'avenir, il serait donc intéressant de venir confirmer l'expression de cette isoforme par des approches de biologie moléculaire (e.g. single-cell RT-PCR). L'expression de $Na_v1.5$ dans les neurones cardiaques pourrait en effet apporter une dimension nouvelle dans la compréhension et la prise en charge des pathologies cardiaques associées à la mutation de ce canal. Par exemple, le syndrome de Brugada, pathologie associée à une perte de fonction du canal $Na_v1.5$, serait parfois associé à un déséquilibre de la balance autonome (Maury et al., 2021) ce qui favoriserait la survenue d'arythmies et le risque de mort subite. Il est donc possible que ces atteintes nerveuses s'expliquent par l'expression de l'isoforme $Na_v1.5$ dans les neurones cardiaques.

[2]. Etude d'une population spécifique de neurones intracardiaques : les neurones calbindine

Les résultats obtenus dans le **chapitre 1** nous ont permis d'identifier différentes catégories de neurones cardiaques sur la base de leurs phénotypes neurochimiques ou bien de leurs propriétés électrophysiologiques. En revanche, aucun élément ne nous permettait jusque-là d'établir un lien entre phénotype et comportement électrophysiologique. En d'autres termes, nous n'étions pas en mesure de dire si un phénotype neuronal était associé à un profil

électrophysiologique particulier. Afin d'investiguer ce lien, nous nous sommes donc appuyés sur la technologie Cre-Lox pour pouvoir spécifiquement étudier les propriétés d'une catégorie particulière de neurones. Au-delà de l'étude des propriétés électrophysiologiques d'une catégorie précise de neurones, notre objectif était également de venir décrypter le rôle joué par ces neurones dans le contexte cardiaque. En effet, bien que plusieurs travaux suggèrent la présence de différentes catégories fonctionnelles de neurones cardiaques (Ardell et al., 1991; Rajendran et al., 2016), la nature exacte de ces neurones n'a pas encore été déterminée.

Parmi les différents phénotypes identifiés, notre attention s'est portée sur l'étude des neurones calbindine. Deux principaux éléments nous ont amené à étudier cette population. Premièrement, nous avons pu observer que ces neurones étaient capables d'établir de nombreuses connexions avec les neurones environnants, suggérant leur participation aux boucles de régulations intracardiaques locales. De plus, l'expression de la calbindine est parfois utilisée pour discriminer différentes catégories fonctionnelles de neurone. Par exemple, son expression est retrouvée dans certains neurones inhibiteurs du système nerveux central (Andressen et al., 1993) et en périphérie, cette protéine constitue un marqueur de neurones sensoriels au sein du système nerveux entérique (Furness et al., 1990; Song et al., 1991). Cette protéine ayant encore très peu été décrite dans le SNIC, aucune étude ne s'est donc encore penchée sur la fonction de ces neurones.

Afin d'identifier facilement cette population neuronale, nous avons mis en place une approche (transduction virale combinée à la technologie Cre-Lox) pour induire l'expression d'un rapporteur fluorescent uniquement dans les neurones exprimant la calbindine. Toutefois, notre efficacité de transduction n'étant que de 60 %, les différences que nous avons mises en évidence entre nos deux groupes d'étude (neurone calbindine et neurone non calbindine) sont nécessairement sous-estimées.

Notre approche d'imagerie en trois dimensions nous a permis d'observer que ces neurones calbindine n'occupaient pas de localisation préférentielle au sein du plexus ganglionnaire mais qu'au contraire, ce phénotype était retrouvé dans la grande majorité des ganglions cardiaques. L'étude des zones innervées par ces neurones nous a également permis de voir que ces neurones projetaient de manière importante au niveau auriculaire mais dans une bien moindre mesure au niveau ventriculaire (seules quelques fibres ont été observées dans la région des ventricules). Afin de préciser la nature des régions auriculaires innervées par les neurones calbindine, il serait intéressant d'utiliser des marqueurs permettant d'identifier certaines régions tissulaires cardiaques d'intérêt tels que le nœud sinusal ou le nœud auriculoventriculaire. Des anticorps dirigés contre la connexine 30.2 ou encore le canal HCN4

pourrait par exemple être utilisés pour identifier ces deux régions cardiaques (Bhattacharyya et al., 2019; Rajendran et al., 2019).

L'étude immunohistochimique des neurones calbindine indique que cette population n'est pas homogène d'un point de vue phénotypique mais qu'elle comporte différents profils neurochimiques. Au sein de cette population, la proportion des marqueurs ChAT, TH et CART est similaire à ce qui est retrouvé dans les neurones n'exprimant pas la calbindine. La seule exception concerne le NPY, peptide beaucoup moins retrouvé chez les neurones calbindine que dans les autres neurones. Mis à part l'expression de la calbindine et du NPY, ces neurones ne semblent donc pas se distinguer réellement des autres d'un point de vue phénotypique.

En revanche, d'un point de vue électrophysiologique, les neurones calbindine se distinguent par une signature électrophysiologique propre. En effet, bien que ces neurones ne présentent pas de propriétés membranaires passives différentes (potentiel membranaire et résistance membranaire au repos), ces cellules présentent une rhéobase supérieure, traduisant une excitabilité plus faible, des capacités de décharge en potentiel d'action moins importante ainsi que des potentiels d'action majoritairement dénués d'AHP. Ces neurones présentent également une densité de courant calcique voltage-dépendant inférieure qui s'explique notamment par une réduction de la densité de courant calcique de type N. Plusieurs travaux ont montré que ce canal était un acteur clé de l'excitabilité neuronale, son inhibition se traduisant par une augmentation de rhéobase et par une diminution des capacités de décharge des neurones cardiaques (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2018). Ainsi la réduction de densité de courant calcique de type N observée dans les neurones calbindine pourrait expliquer les différences observées en terme de rhéobase et de capacité de décharge. Il est également possible que d'autres courants calciques voltage-dépendants soient réduits chez les neurones calbindine. En effet, une fois la part calcique de type N inhibée, le courant calcique mesuré était toujours significativement inférieur chez les neurones calbindine à -20 mV. Il serait donc intéressant d'investiguer les autres courants calciques dans ces neurones. De même, il est possible que le caractère moins excitable des neurones calbindine s'explique par la nature des canaux sodiques et/ou l'amplitude des courants associés à ces canaux.

Il serait également intéressant de déterminer les acteurs moléculaires qui participent à la proportion supérieure de potentiel d'action sans AHP chez les neurones calbindine. Il est possible que la diminution de densité de courant calcique des neurones calbindine participe aussi à cette caractéristique. En effet, les canaux KCa sont d'importants acteurs de la phase d'AHP des neurones cardiaques (Franciolini et al., 2001; Rimmer and Harper, 2006). Ainsi, une réduction des entrées calciques pourrait indirectement se traduire par une diminution de l'amplitude et/ou de la durée d'AHP par l'intermédiaire des canaux KCa. Dans les neurones

spinaux, les travaux de Wikström ont notamment montré que les canaux calciques de type N participaient à la phase d'AHP. Leurs résultats montrent en effet que l'inhibition de ces canaux se traduit par une forte réduction de l'amplitude et de la durée de l'AHP dans les neurones spinaux (Wikström and Manira, 1998). Il faudrait toutefois également étudier la participation d'autre canaux potassiques ainsi que des canaux HCN, acteurs pouvant aussi expliquer cette absence d'AHP (Edwards et al., 1995).

La calbindine appartient à la famille des protéines de liaison au calcium (calcium-binding proteins) et sa principale fonction est de tamponner le calcium intracellulaire. De par ses propriétés cinétiques et son affinité de liaison pour le calcium, la calbindine constitue ainsi un acteur clé régulant les concentrations calciques libres cytosoliques (Schmidt, 2012). De plus, de façon dépendante ou indépendante de la fixation de calcium, la calbindine participe à la régulation de certains processus cellulaires puisqu'elle est capable d'interagir et de moduler l'activité de différentes protéines (Lutz et al., 2003; Bobay et al., 2012; Schmidt, 2012). Il est donc possible que cette calci-protéine régule plusieurs processus biologiques au sein des neurones cardiaques et que certaines des caractéristiques des neurones calbindine découlent directement des fonctions de cette calci-protéine. La fonction tampon exercée par la calbindine pourrait par exemple limiter l'activité des canaux KCa et ainsi expliquer l'absence d'AHP dans les neurones calbindine. D'un point de vue morphologique, nous avons montré que les neurones calbindine se distinguaient par un corps cellulaire plus volumineux ainsi qu'une longueur de neurites réduite par rapport aux autres neurones. Il est intéressant de mentionner que l'équipe de Smolilo a également constaté que les neurones exprimant la calbindine présentait un corps cellulaire plus volumineux dans le système nerveux entérique (Smolilo et al., 2018). Il est donc possible que cette différence de taille soit liée à la présence de la calbindine. L'extension des neurites est quant à elle un processus finement régulé par les concentrations calciques intracellulaires, certains travaux suggérant qu'elle ne serait permise que dans une gamme de concentration calcique précise (Connor, 1986; Mattson and Kater, 1987). On peut donc supposer que la différence de croissance neuritique que nous avons observé découle des fonctions tampons exercées par la calbindine. En dehors de son action directe sur les concentrations calciques libres, la calbindine pourrait également jouer sur la croissance neuritique par l'intermédiaire de la petite GTPase RanBPM. Il a en effet été montré que la calbindine était capable d'interagir avec RanBPM (Lutz et al., 2003) ; et dans les neurones des DRG, cette protéine inhibe la croissance des neurites (Togashi et al., 2006).

Nos résultats ayant montré une amplitude de courant calcique diminuée et la calbindine exerçant une fonction de tampon calcique, il serait pertinent d'étudier la réponse calcique de ces neurones à différents stimuli (approche pharmacologique, électrique ou optogénétique). En conduisant quelques expériences préliminaires, nous avons notamment montré que la

sonde Fura-2 permettait d'étudier les variations calciques intracellulaires en réponse à la dépolarisation membranaire (**figure 67**) ou à la perfusion d'acétylcholine ou d'ATP dans nos neurones cardiaques. A l'avenir, il serait donc intéressant de venir comparer l'amplitude et la cinétique de ces réponses calciques en fonction de l'expression de la calbindine.

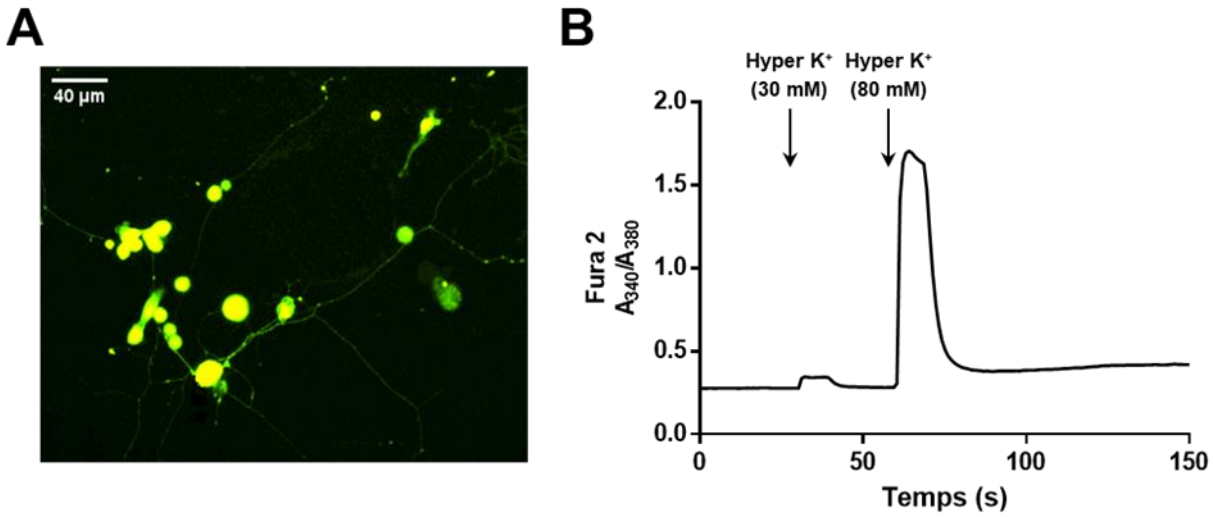


Figure 67 : Réponse calcique des neurones cardiaques à la dépolarisation membranaire. (**A**) Image de fluorescence d'un neurone cardiaque chargé avec la sonde Fura-2 AM. (**B**) Tracé représentant la mesure de fluorescence de la sonde Fura-2 en réponse à la dépolarisation membranaire induite par la perfusion d'une solution extracellulaire riche en potassium (30 ou 80 mM) dans un neurone cardiaque.

Enfin, dans le contexte neuronal, la calbindine est connue pour exercer un rôle neuro-protecteur et anti-apoptotique, en limitant l'importance des augmentations calciques intracellulaires et en inhibant l'activité de la protéine pro-apoptotique caspase-3 par interaction directe (Bobay et al., 2012). Ainsi, l'étude de la sensibilité des neurones cardiaques à l'apoptose en fonction de l'expression de la calbindine semble être une voie intéressante pour de futures investigations.

Le rôle physiologique exercé par les neurones calbindine dans le contexte cardiaque reste toutefois encore inconnue. Dans ce sens, l'optogénétique représente une technique particulièrement adaptée à l'étude des fonctions exercées par ces neurones (Deisseroth, 2015). En effet, couplée à la technologie Cre-Lox, cette technique offre la possibilité de moduler spécifiquement l'activité des neurones calbindine par l'utilisation d'outils moléculaires photo-activables tels que le canal rhodopsine (activateur) ou l'halorhodopsine (inhibiteur). Combinée à la mesure des paramètres cardiaques (e.g. enregistrement ECG), cette approche permettra donc d'évaluer précisément l'impact de ces neurones sur les fonctions cardiaques. Malgré nos efforts pour mettre en place de telles investigations, des difficultés techniques (e.g.

efficacité de transduction virale des outils optogénétiques insuffisante) nous ont malheureusement empêché jusque-là d'étudier la fonctionnalité de ces neurones. Néanmoins, nous espérons réussir à mettre en place cette approche à l'avenir.

D'un point de vue physiopathologique, il est intéressant de mentionner que dans l'insuffisance cardiaque et le diabète de type deux, plusieurs études ont observé une réduction de l'expression du canal calcique de type N, ainsi que de l'excitabilité des neurones cardiaques (Liu et al., 2012; Tu et al., 2014) ; deux éléments rappelant les propriétés des neurones calbindine. Il serait donc intéressant d'étudier la proportion de neurones exprimant la calbindine dans ces situations pathologiques. On peut en effet supposer que cette réduction d'excitabilité découle d'une augmentation de la proportion de neurone calbindine dans le SNIC.

[3]. Potentiel souche des acteurs ganglionnaires non neuronaux

Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes intéressés aux cellules non neuronales retrouvées au sein des ganglions cardiaques. Nous avons ainsi mis en évidence la présence de nombreuses cellules étroitement accolées aux corps cellulaires neuronaux et immunoréactives pour le facteur de transcription Sox2. La proximité de ces cellules ainsi que l'expression de Sox2 suggèrent fortement que ces cellules soient des cellules satellites gliales (Koike et al., 2014; Huang et al., 2021), cellules connues pour exprimer d'autres marqueurs tels que le canal potassique Kir4.1, le marqueur gliale GFAP ou encore la glutamine synthetase (Huang et al., 2021). D'après nos résultats dans les ganglions cardiaques murins, ces cellules ne semblent en revanche pas caractérisées par l'expression de la glutamine synthetase ni de la GFAP, le premier marqueur n'ayant pas été détecté dans ces ganglions, et le deuxième ne semblant pas particulièrement associé aux cellules exprimant Sox2. L'absence d'expression de la GFAP par les cellules Sox2-positives n'est pas aberrante puisqu'elle n'apparait pas systématiquement exprimée par les cellules satellites gliales (Hanani, 2010). En revanche, à notre connaissance, l'absence d'expression de la glutamine synthetase n'a encore jamais été rapportée ; il serait donc préférable de confirmer ces résultats en utilisant un autre anticorps anti-glutamine synthetase.

Les cellules satellites gliales semblent exercer de nombreuses fonctions dans les ganglions périphériques, régulant la composition du microenvironnement neuronal, la croissance neuritique, ou encore l'excitabilité neuronale (Hanani and Spray, 2020). En revanche, la fonction exacte de ces cellules dans le contexte cardiaque n'a encore jamais été étudiée. De manière intéressante, la réduction du nombre de cellules satellites gliales s'accompagne d'une

augmentation de l'activité sympathique et de la fréquence cardiaque dans un modèle de souris transgénique (Mapps et al., 2022). Il serait donc intéressant d'étudier les conséquences de cette réduction du nombre de cellules satellites gliales sur le fonctionnement neuronal intracardiaque dans ce modèle.

Le marqueur Sox2 est un marqueur de multipotence caractéristique des cellules souches telles que les cellules souches neurales de la SVZ (Pevny and Nicolis, 2010). L'expression de ce marqueur dans nos cellules soulève donc quelques interrogations quant aux possibles propriétés souches de ces cellules et leurs éventuelles capacités de neurogenèse. L'existence de mécanismes de neurogenèse dans le système nerveux périphérique est, en effet, de plus en plus suggérée. Par exemple, suite à l'injection de capsaïcine, responsable de la destruction de près de la moitié des neurones sensoriels, il existe une récupération progressive du nombre initial de neurones dans les ganglions sensoriels (Gallaher et al., 2011, 2014). Dans les DRG, plusieurs travaux menés *in vitro* et *in vivo*, suggèrent qu'en conditions pathologiques, les cellules satellites gliales seraient capables de conduire à la néo-formation de neurones. L'étude de Zhang et collaborateurs a par exemple montré que la douleur chronique se traduisait par l'activation des cellules satellites gliales exprimant Sox2, celles-ci se mettant à proliférer, à exprimer des marqueurs de progéniteurs neuronaux (Nestine et Sox10) et à se différencier en neurones sensoriels (Zhang et al., 2019b). L'équipe de Li a quant à elle montré qu'*in vitro*, les cellules satellites gliales issues de DRG étaient capables de proliférer sous la forme de sphères et de se différencier en cellules gliales et neuronales (Li et al., 2007). Dans notre étude, les cellules issues de la zone ganglionnaire intracardiaque sont capables de former des sphères au sein desquelles sont retrouvés des marqueurs prolifératifs (Ki67) ainsi que des marqueurs de progéniteurs tels que Sox2. Après incubation en milieu de différenciation, la détection de cellules immunoréactives pour la β-tub III, la DCX et la nestine suggère que ces cellules pourraient s'engager dans un lignage neural. De plus, certaines de ces cellules ayant incorporé de la BrdU, cela indique d'autant plus qu'elles ont été néo-formées *in vitro*. En revanche, d'un point de vue électrophysiologique nous n'avons pas été en mesure de confirmer la présence de neurones fonctionnels (e.g. absence de potentiel d'action). Néanmoins, ces cellules présentent des propriétés électrophysiologiques similaires à celles des cellules souches issues de la SVZ cultivées dans les mêmes conditions. Notamment, elles présentent un courant voltage-dépendant 4-AP-sensible qui participe à leur polarité membranaire de repos, à la repolarisation et à l'hyperpolarisation suivant l'injection d'un courant dépolarisant et qui a précédémment été observé dans les cellules souches de la SVZ (Lai et al., 2010). Il est possible que notre protocole de différenciation ne soit pas adapté (en terme de durée ou de composition du milieu) pour l'obtention de neurones fonctionnels. L'équipe de Wang a par exemple montré que l'ajout d'acide valproïque, inhibiteur d'histone

déacétylase, permettait d'augmenter de manière importante le nombre de neurones obtenu à partir de cellules satellites gliales (Wang et al., 2021). De plus, il serait pertinent de vérifier la présence des marqueurs neuronaux dans les cellules que nous avons patché. En effet, la sélection des cellules étudiées a uniquement été déterminée à partir de critères morphologiques, la détection des marqueurs neuronaux n'étant possible qu'à partir de cellules fixées. Il serait donc intéressant de trouver un marqueur neuronal fluorescent compatible avec le patch-clamp afin de confirmer le phénotype des cellules étudiées par cette approche.

Néanmoins, la présence de cellules exprimant des marqueurs tels que Sox2 et la Nestine et l'apparition de cellules exprimant des marqueurs neuronaux en culture sont des éléments encourageants qui suggèrent que, de manière similaire à ce qui a été décrit dans les neurones des DRG, des mécanismes de neurogenèse pourraient avoir lieu au sein du SNIC. Il serait pertinent de venir étudier la présence des marqueurs Nestine et Ki67 *in situ*, en réalisant des immunomarquages sur coupe de tissu en condition physiologique et pathologique. D'un point de vue pathologique, il a été montré que les cellules satellites gliales étaient activées par l'inflammation (Hanani and Spray, 2020), il pourrait donc être intéressant d'étudier le comportement de ces cellules dans un contexte de myocardite. De même, l'impact de l'ablation des zones ganglionnaires dans le contexte de la FA sur ces cellules satellites et les éventuels évènements de neurogenèse qui pourraient en découler est une voie qu'il apparait intéressant d'investiguer. Enfin, plusieurs pathologies cardiaques (e.g insuffisance cardiaque) sont associées à un remodelage du SNIC, il serait donc important d'investiguer l'existence de mécanismes de neurogenèse dans ce contexte.

Conclusion générale

En conclusion, ces travaux montrent que le SNIC murin présente une complexité similaire à celle des autres espèces. D'un point de vue phénotypique, le SNIC murin regroupe des neurones qui se distinguent par l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de différentes classes de neurotransmetteurs (acétylcholine, catécholamines et NO) mais également par l'expression de différents neuropeptides (CART et NPY) ou encore de la calci-protéine calbindine. L'étude des propriétés électrophysiologiques de ces neurones a également permis d'identifier différentes classes de neurones sur la base de leurs capacités de décharge ou des caractéristiques de leur potentiel d'action. De plus, l'étude spécifique d'une sous-catégorie de neurones cardiaques a permis d'établir, pour la première fois, un lien entre phénotype et électrophysiologie (**figure 68**). En effet, les neurones calbindine présentent une signature électrophysiologique propre caractérisée par des neurones moins excitables et des potentiels d'action majoritairement dénués d'AHP.

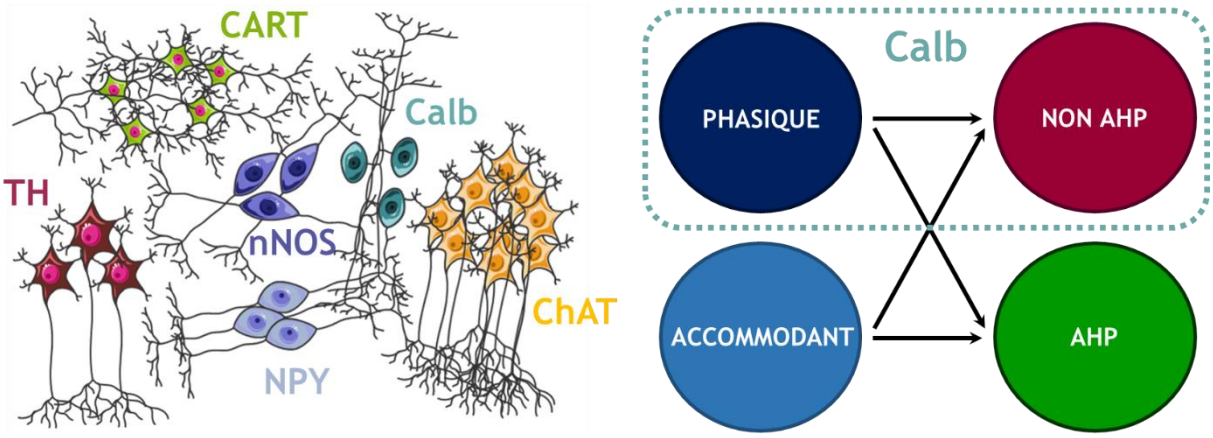


Figure 68 : Schéma bilan concernant la diversité neurochimique et électrophysiologique des neurones cardiaques murins. Les neurones cardiaques présentent une certaine complexité notamment au travers de l'existence de différentes classes phénotypiques et électrophysiologiques. Nos travaux ont également permis d'établir un lien entre phénotype et propriétés électrophysiologiques en démontrant que les neurones calbindine (calb) présentaient une signature électrophysiologique propre.

A l'avenir, il apparait important d'investiguer la fonction de ces différentes classes de neurones afin d'améliorer la compréhension de ce système. Pour cela, l'optogénétique couplée à la technologie Cre-Lox, représente une formidable approche pour décrypter le rôle des différentes populations neuronales intracardiaques dans la régulation des fonctions cardiaques mais également leur éventuelle implication dans la survenue ou l'entretien de pathologies cardiaques telles que les arythmies. En effet, cette approche offre la possibilité de moduler spécifiquement l'activité des neurones par l'utilisation d'outils moléculaires photo-

activables tels que le canal rhodopsine (activateur) ou l'halorhodopsine (inhibiteur). Combinée à la mesure des paramètres cardiaques (e.g. enregistrement ECG), cette approche permettra donc d'évaluer précisément l'impact de ces neurones sur les fonctions cardiaques (**figure 69**).

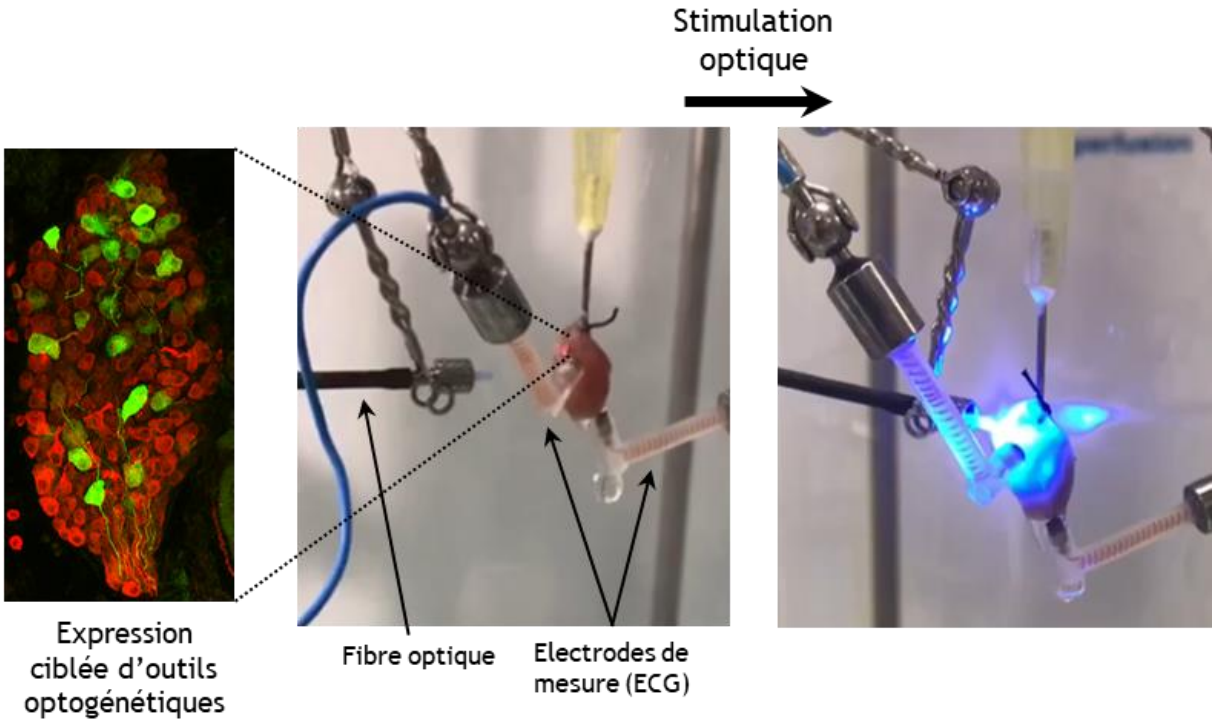


Figure 69 : Approche expérimentale pour l'étude de la fonction des différentes classes de neurones intracardiaques. La technologie Cre-Lox permet de conduire à l'expression ciblée d'outils optogénétiques dans une population neuronale d'intérêt. Ainsi, l'activité de cette population de neurone peut être spécifiquement modulée par la lumière. L'impact de cette modulation sur le fonctionnement cardiaque peut être évalué en réalisant la mesure des paramètres ECG en Langendorff.

Enfin, les cellules non-neuronales participent très certainement à la complexité des structures ganglionnaires intracardiaques. Nos travaux suggèrent notamment que ces cellules pourraient présenter des propriétés souches et conduire à la néo-formation de neurones *in vitro*. Il semble donc crucial d'étudier davantage la fonction de ces cellules en condition physiologique et pathologique. La technologie Cre-Lox pourrait là encore s'avérer utile pour l'étude de ces cellules. On pourrait par exemple cibler l'expression de molécules fluorescentes dans les cellules exprimant Sox2 afin d'assurer leur traçabilité en culture et ainsi démontrer leur aptitude à former des neurones.

BIBLIOGRAPHIE

Adams DJ, Harper AA, Hogg RC (2002) Neural control of the heart: developmental changes in ionic conductances in mammalian intrinsic cardiac neurons. Auton Neurosci 98(1–2): 75–78.

Agulhon C, Boyt KM, Xie AX, Friocourt F, Roth BL, McCarthy KD (2013) Modulation of the autonomic nervous system and behaviour by acute glial cell Gq protein-coupled receptor activation in vivo. J Physiol 591(22): 5599–5609.

Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li P-L, Ritter JK (2018) Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. Int J Mol Sci 19(9): 2605.

Ahmadian-Moghadam H, Sadat-Shirazi M-S, Zarrindast M-R (2018) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. Peptides 110: 56–77.

Allen E, Coote JH, Grubb BD, Batten TFC, Pauza DH, Ng GA, Brack KE (2018) Electrophysiological effects of nicotinic and electrical stimulation of intrinsic cardiac ganglia in the absence of extrinsic autonomic nerves in the rabbit heart. Heart Rhythm 15(11): 1698–1707.

Allen TG, Burnstock G (1987) Intracellular studies of the electrophysiological properties of cultured intracardiac neurones of the guinea-pig. J Physiol 388: 349–366.

Allen TG, Burnstock G (1990a) M1 and M2 muscarinic receptors mediate excitation and inhibition of guinea-pig intracardiac neurones in culture. The Journal of Physiology 422(1): 463–480.

Allen TG, Burnstock G (1990b) The actions of adenosine 5'-triphosphate on guinea-pig intracardiac neurones in culture. Br J Pharmacol 100(2): 269–276.

Andressen C, Blümcke I, Celio MR (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. Cell Tissue Res 271(2): 181–208.

Ardell JL, Armour JA (2016) Neurocardiology: Structure-Based Function. Compr Physiol 6(4): 1635–1653.

Ardell JL, Butler CK, Smith FM, Hopkins DA, Armour JA (1991) Activity of in vivo atrial and ventricular neurons in chronically decentralized canine hearts. Am J Physiol 260(3 Pt 2): H713-721.

Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C (2010) 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. Microsc Res Tech 73(11): 1019–1029.

Arichi S, Sasaki-Hamada S, Kadoya Y, Ogata M, Ishibashi H (2019) Excitatory effect of bradykinin on intrinsic neurons of the rat heart. Neuropeptides 75: 65–74.

Ariel P (2017) A beginner's guide to tissue clearing. Int J Biochem Cell Biol 84: 35–39.

Armour JA (1983) Synaptic transmission in the chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of the dog. Can J Physiol Pharmacol 61(10): 1149–1155.

Armour JA (1997) Intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation possess alpha 1-, alpha 2-, beta 1- and beta 2-adrenoceptors. Can J Cardiol 13(3): 277–284.

Armour JA (2007) The little brain on the heart. Cleve Clin J Med 74 Suppl 1: S48-51.

Armour JA (2008) Potential clinical relevance of the “little brain” on the mammalian heart. Exp Physiol 93(2): 165–176.

Armour JA, Ardell JL (2004) Basic and Clinical Neurocardiology. Oxford University Press, .

Armour JA, Collier K, Kember G, Ardell JL (1998) Differential selectivity of cardiac neurons in separate intrathoracic autonomic ganglia. Am J Physiol 274(4): R939-949.

Armour JA, Hopkins DA (1990a) Activity of in vivo canine ventricular neurons. Am J Physiol 258(2 Pt 2): H326-336.

Armour JA, Hopkins DA (1990b) Activity of canine in situ left atrial ganglion neurons. Am J Physiol 259(4 Pt 2): H1207-1215.

Armour JA, Huang MH, Pelleg A, Sylvén C (1994) Responsiveness of in situ canine nodose ganglion afferent neurones to epicardial mechanical or chemical stimuli. Cardiovasc Res 28(8): 1218–1225.

Armour JA, Huang MH, Smith FM (1993) Peptidergic modulation of in situ canine intrinsic cardiac neurons. Peptides 14(2): 191–202.

Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA (1997) Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. Anat Rec 247(2): 289–298.

Avazzadeh S, McBride S, O’Brien B, Coffey K, Elahi A, O’Halloran M, Soo A, Quinlan LR (2020) Ganglionated Plexi Ablation for the Treatment of Atrial Fibrillation. J Clin Med 9(10): E3081.

Baizer JS, Baker JF (2005) Immunoreactivity for calcium-binding proteins defines subregions of the vestibular nuclear complex of the cat. Exp Brain Res 164(1): 78–91.

Baker DG, Coleridge HM, Coleridge JC, Nerdrum T (1980) Search for a cardiac nociceptor: stimulation by bradykinin of sympathetic afferent nerve endings in the heart of the cat. J Physiol 306: 519–536.

Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH (2005) Architecture and age-related analysis of the neuronal number of the guinea pig intrinsic cardiac nerve plexus. Ann Anat 187(3): 225–243.

Beaumont E, Salavatian S, Southerland EM, Vinet A, Jacquemet V, Armour JA, Ardell JL (2013) Network interactions within the canine intrinsic cardiac nervous system: implications for reflex control of regional cardiac function. J Physiol (Lond) 591(18): 4515–4533.

Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P, Chédotal A (2017) Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. Cell 169(1): 161-173.e12.

Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW (1999) Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. Circ Res 84(8): 921–928.

Bestel J, Clairambault J, Médigue C, Monti A, Sorine M (2000) Le système cardio-vasculaire et sa régulation par le système nerveux autonome : modélisation et mesures. ESAIM: Proc 9: 65–92.

Bhattacharyya S, Duan J, Wang L, Li B, Bhakta M, Fernandez-Perez A, Hon GC, Munshi NV (2019) Using Gjd3-CreEGFP mice to examine atrioventricular node morphology and composition. Sci Rep 9: 2106.

Bibevski S, Dunlap ME (1999) Ganglionic mechanisms contribute to diminished vagal control in heart failure. Circulation 99(22): 2958–2963.

Bobay BG, Stewart AL, Tucker AT, Thompson RJ, Varney KM, Cavanagh J (2012) Structural insights into the calcium-dependent interaction between calbindin-D28K and caspase-3. FEBS Lett 586(20): 3582–3589.

Bosnjak ZJ, Kampine JP (1989) Cardiac sympathetic afferent cell bodies are located in the peripheral nervous system of the cat. Circ Res 64(3): 554–562.

Braas KM, May V, Harakall SA, Hardwick JC, Parsons RL (1998) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Expression and Modulation of Neuronal Excitability in Guinea Pig Cardiac Ganglia. J Neurosci 18(23): 9766–9779.

Brack KE, Patel VH, Coote JH, Ng GA (2007) Nitric oxide mediates the vagal protective effect on ventricular fibrillation via effects on action potential duration restitution in the rabbit heart. J Physiol 583(Pt 2): 695–704.

Bryant SM, Hart G (1996) Effects of neuropeptide Y on L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. Br J Pharmacol 118(6): 1455–1460.

Buckley U, Rajendran PS, Shivkumar K (2017) Ganglionated plexus ablation for atrial fibrillation: Just because we can, does that mean we should? Heart Rhythm 14(1): 133–134.

Burnstock G (2017) Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circulation Research 120(1): 207–228.

Butler CK, Smith FM, Cardinal R, Murphy DA, Hopkins DA, Armour JA (1990) Cardiac responses to electrical stimulation of discrete loci in canine atrial and ventricular ganglionated plexi. Am J Physiol 259(5 Pt 2): H1365-1373.

Calupca MA, Locknar SA, Zhang L, Harrison TA, Hoover DB, Parsons RL (2001) Distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the guinea pig intrinsic cardiac nervous system and colocalization with neuropeptides or transmitter synthetic enzymes. J Comp Neurol 439(1): 73–86.

Calupca MA, Vizzard MA, Parsons RL (2000a) Origin of neuronal nitric oxide synthase (NOS)-immunoreactive fibers in guinea pig parasympathetic cardiac ganglia. J Comp Neurol 426(3): 493–504.

Calupca MA, Vizzard MA, Parsons RL (2000b) Origin of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive fibers innervating guinea pig parasympathetic cardiac ganglia. Journal of Comparative Neurology 423(1): 26–39.

Chang CM, Wu TJ, Zhou S, Doshi RN, Lee MH, Ohara T, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS, Chen LS (2001) Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. Circulation 103(1): 22–25.

Chang F, Yu H, Cohen IS (1994) Actions of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y on the pacemaker current in canine Purkinje fibers. Circ Res 74(1): 157–162.

Charlemagne A, Blacher J, Cohen A, Collet J-P, Diévart F, Groote P de, Hanon O, Leenhardt A, Pinel J-F, Pisica-Donose G, Le Heuzey J-Y (2011) Epidemiology of atrial fibrillation in France: Extrapolation of international epidemiological data to France and analysis of French hospitalization data. Archives of Cardiovascular Diseases 104(2): 115–124.

Chen X, Yu L, Shi S, Jiang H, Huang C, Desai M, Li Y, Barajas-Martinez H, Hu D (2016) Neuronal Nav1.8 Channels as a Novel Therapeutic Target of Acute Atrial Fibrillation Prevention. J Am Heart Assoc 5(11): e004050.

Choi E-K, Shen MJ, Han S, Kim D, Hwang S, Sayfo S, Piccirillo G, Frick K, Fishbein MC, Hwang C, Lin S-F, Chen P-S (2010) Intrinsic cardiac nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmia in ambulatory dogs. Circulation 121(24): 2615–2623.

Connor JA (1986) Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single, mammalian central nervous system cells. Proc Natl Acad Sci U S A 83(16): 6179–6183.

Coote JH (2013) Myths and realities of the cardiac vagus. J Physiol 591(Pt 17): 4073–4085.

Coote JH, Chauhan RA (2016) The sympathetic innervation of the heart: Important new insights. Auton Neurosci 199: 17–23.

Corbett EKA, Sinfield JK, McWilliam PN, Deuchars J, Batten TFC (2005) Differential expression of vesicular glutamate transporters by vagal afferent terminals in rat nucleus of the solitary tract: Projections from the heart preferentially express vesicular glutamate transporter 1. Neuroscience 135(1): 133–145.

Coumel P (1996) Autonomic influences in atrial tachyarrhythmias. J Cardiovasc Electrophysiol 7(10): 999–1007.

Coumel P, Attuel P, Lavallée J, Flammang D, Leclercq JF, Slama R (1978) [The atrial arrhythmia syndrome of vagal origin]. Arch Mal Coeur Vaiss 71(6): 645–656.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. European Journal of Pharmacology 429(1): 161–176.

Cuevas J, Adams DJ (1997) M4 muscarinic receptor activation modulates calcium channel currents in rat intracardiac neurons. J Neurophysiol 78(4): 1903–1912.

Cuevas J, Adams DJ (2000) Substance P preferentially inhibits large conductance nicotinic ACh receptor channels in rat intracardiac ganglion neurons. J Neurophysiol 84(4): 1961–1970.

Cuevas J, Berg DK (1998) Mammalian nicotinic receptors with alpha7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. J Neurosci 18(24): 10335–10344.

Cuevas J, Harper AA, Trequattrini C, Adams DJ (1997) Passive and active membrane properties of isolated rat intracardiac neurons: regulation by H- and M-currents. J Neurophysiol 78(4): 1890–1902.

Dalsgaard C-J, Franco-Cereceda A, Saria A, Lundberg JM, Theodorsson-Norheim E, Hökfelt T (1986) Distribution and origin of substance P and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea-pig heart. Cell Tissue Res 243(3): 477–485.

DeHaven WI, Cuevas J (2002) Heterogeneity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat intrinsic cardiac neurons. Neurosci Lett 328(1): 45–49.

DeHaven WI, Cuevas J (2004) VPAC receptor modulation of neuroexcitability in intracardiac neurons: dependence on intracellular calcium mobilization and synergistic enhancement by PAC1 receptor activation. J Biol Chem 279(39): 40609–40621.

Deisseroth K (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. Nat Neurosci 18(9): 1213–1225.

Dunn M, Henke A, Clark S, Kovalyova Y, Kempadoo KA, Karpowicz RJ, Kandel ER, Sulzer D, Sames D (2018) Designing a norepinephrine optical tracer for imaging individual noradrenergic synapses and their activity in vivo. Nat Commun 9(1): 2838.

Edwards FR, Hirst GD, Klemm MF, Steele PA (1995) Different types of ganglion cell in the cardiac plexus of guinea-pigs. J Physiol 486(Pt 2): 453–471.

Ekblad E (2006) CART in the enteric nervous system. Peptides 27(8): 2024–2030.

Fallen EL (2005) Vagal afferent stimulation as a cardioprotective strategy? Introducing the concept. Ann Noninvasive Electrocardiol 10(4): 441–446.

Fedele L, Brand T (2020) The Intrinsic Cardiac Nervous System and Its Role in Cardiac Pacemaking and Conduction. Journal of Cardiovascular Development and Disease 7(4): 54.

Feldman-Goriachnik R, Wu B, Hanani M (2018) Cholinergic responses of satellite glial cells in the superior cervical ganglia. Neuroscience Letters 671: 19–24.

Fieber LA, Adams DJ (1991a) Acetylcholine-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. J Physiol 434: 215–237.

Fieber LA, Adams DJ (1991b) Adenosine triphosphate-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. J Physiol 434: 239–256.

Forssmann WG, Triepel J, Daffner C, Heym C, Cuevas P, Noble MI, Yanaihara N (1988) Vasoactive intestinal peptide in the heart. Ann N Y Acad Sci 527: 405–420.

Franciolini F, Hogg R, Catacuzzeno L, Petris A, Trequattrini C, Adams DJ (2001) Large-conductance calcium-activated potassium channels in neonatal rat intracardiac ganglion neurons. Pflugers Arch 441(5): 629–638.

Fregoso SP, Hoover DB (2012) Development of cardiac parasympathetic neurons, glial cells, and regional cholinergic innervation of the mouse heart. Neuroscience 221: 28–36.

Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, Horie M (2016) Novel SCN10A variants associated with Brugada syndrome. Europace 18(6): 905–911.

Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M (1989) Chemical Coding of Neurons and Plurichemical Transmission. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 29(1): 289–306.

Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Smith TK (1990) Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. Cell Tissue Res 260(2): 261–272.

Gabella G, Trigg P, McPhail H (1988) Quantitative cytology of ganglion neurons and satellite glial cells in the superior cervical ganglion of the sheep. Relationship with ganglion neuron size. J Neurocytol 17(6): 753–769.

Gagliardi M, Randall WC, Bieger D, Wurster RD, Hopkins DA, Armour JA (1988) Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 255(4): H789–H800.

Gallaher ZR, Johnston ST, Czaja K (2014) Neural proliferation in the dorsal root ganglia of the adult rat following capsaicin-induced neuronal death. Journal of Comparative Neurology 522(14): 3295–3307.

Gallaher ZR, Ryu V, Larios RM, Sprunger LK, Czaja K (2011) Neural proliferation and restoration of neurochemical phenotypes and compromised functions following capsaicin-induced neuronal damage in the nodose ganglion of the adult rat. Front Neurosci 5: 12.

Geis GS, Wurster RD (1980) Horseradish peroxidase localization of cardiac vagal preganglionic somata. Brain Research 182(1): 19–30.

Gibbons DD, Southerland EM, Hoover DB, Beaumont E, Armour JA, Ardell JL (2012) Neuromodulation targets intrinsic cardiac neurons to attenuate neuronally mediated atrial arrhythmias. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 302(3): R357–R364.

Gill SS, Pulido OM, Mueller RW, McGuire PF (1998) Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. Brain Research Bulletin 46(5): 429–434.

Gill SS, Pulido OM, Mueller RW, McGuire PF (1999) Immunochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart. Brain Res Bull 48(2): 143–146.

Girard P, Forget B (2011) Microscopie de fluorescence à feuille de lumière - La face cachée de l'échantillon enfin dévoilée.

Girasole AE, Palmer CP, Corrado SL, Marie Southerland E, Ardell JL, Hardwick JC (2011) Angiotensin II potentiates adrenergic and muscarinic modulation of guinea pig intracardiac neurons. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301(5): R1391-1399.

Gould PA, Yii M, Mclean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM (2006) Evidence for Increased Atrial Sympathetic Innervation in Persistent Human Atrial Fibrillation. Pacing and Clinical Electrophysiology 29(8): 821–829.

Groen JL, Andrade A, Ritz K, Jalalzadeh H, Haagmans M, Bradley TEJ, Jongejan A, Verbeek DS, Nürnberg P, Denome S, Hennekam RCM, Lipscombe D, et al. (2015) CACNA1B mutation is linked to unique myoclonus-dystonia syndrome. Hum Mol Genet 24(4): 987–993.

Haberberger R, Kummer W (1996) β2-Adrenoreceptor immunoreactivity in cardiac ganglia of the guinea pig. Histochem J 28(11): 827–833.

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J (1998) Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins. New England Journal of Medicine 339(10): 659–666.

Hanani M (2010) Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. Brain Res Rev 64(2): 304–327.

Hanani M, Spray DC (2020) Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. Nat Rev Neurosci 21(9): 485–498.

Hardwick JC, Mawe GM, Parsons RL (1995) Evidence for afferent fiber innervation of parasympathetic neurons of the guinea-pig cardiac ganglion. Journal of the Autonomic Nervous System 53(2): 166–174.

Hardwick JC, Mawe GM, Parsons RL (1997) Tachykinin-induced activation of non-specific cation conductance via nk3 neurokinin receptors in guinea-pig intracardiac neurones. The Journal of Physiology 504(1): 65–74.

Hardwick JC, Ryan SE, Beaumont E, Ardell JL, Southerland EM (2014) Dynamic remodeling of the guinea pig intrinsic cardiac plexus induced by chronic myocardial infarction. Auton Neurosci 181: 4–12.

Hardwick JC, Ryan SE, Powers EN, Southerland EM, Ardell JL (2015) Angiotensin receptors alter myocardial infarction-induced remodeling of the guinea pig cardiac plexus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 309(2): R179-188.

Hardwick JC, Southerland EM, Ardell JL (2008) Chronic myocardial infarction induces phenotypic and functional remodeling in the guinea pig cardiac plexus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295(6): R1926-1933.

Harper AA, Adams DJ (2021) Electrical properties and synaptic transmission in mouse intracardiac ganglion neurons in situ. Physiol Rep 9(18): e15056.

Harvey RD (2012) Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. Handb Exp Pharmacol (208): 299–316.

Harvey RD, Belevych AE (2003) Muscarinic regulation of cardiac ion channels. Br J Pharmacol 139(6): 1074–1084.

Hasan W (2013) Autonomic cardiac innervation. Organogenesis 9(3): 176–193.

Hassall CJ, Buckley NJ, Burnstock G (1987) Autoradiographic localisation of muscarinic receptors on guinea pig intracardiac neurones and atrial myocytes in culture. Neurosci Lett 74(2): 145–150.

Hassall CJ, Stanford SC, Burnstock G, Buckley NJ (1993) Co-expression of four muscarinic receptor genes by the intrinsic neurons of the rat and guinea-pig heart. Neuroscience 56(4): 1041–1048.

Hatta E, Yasuda K, Levi R (1997) Activation of histamine H3 receptors inhibits carrier-mediated norepinephrine release in a human model of protracted myocardial ischemia. J Pharmacol Exp Ther 283(2): 494–500.

Haunstetter A, Haass M, Yi X, Krüger C, Kübler W (1994) Muscarinic inhibition of cardiac norepinephrine and neuropeptide Y release during ischemia and reperfusion. Am J Physiol 267(6 Pt 2): R1552-1558.

He B, Lu Z, He W, Huang B, Yu L, Wu L, Cui B, Hu X, Jiang H (2013) The effects of atrial ganglionated plexi stimulation on ventricular electrophysiology in a normal canine heart. J Interv Card Electrophysiol 37(1): 1–8.

Heizmann CW (1993) Calcium signaling in the brain. Acta Neurobiol Exp (Wars) 53(1): 15–23.

Heredia MP, Fernández-Velasco M, Benito G, Delgado C (2002) Neuropeptide Y increases 4-aminopyridine-sensitive transient outward potassium current in rat ventricular myocytes. Br J Pharmacol 135(7): 1701–1706.

Herring N, Cranley J, Lokale MN, Li D, Shanks J, Alston EN, Girard BM, Carter E, Parsons RL, Habecker BA, Paterson DJ (2012) The cardiac sympathetic co-transmitter galanin reduces acetylcholine release and vagal bradycardia: implications for neural control of cardiac excitability. J Mol Cell Cardiol 52(3): 667–676.

Herring N, Golding S, Paterson DJ (2000) Pre-synaptic NO-cGMP Pathway Modulates Vagal Control of Heart Rate in Isolated Adult Guinea Pig Atria. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 32(10): 1795–1804.

Herring N, Lokale MN, Danson EJ, Heaton DA, Paterson DJ (2008) Neuropeptide Y reduces acetylcholine release and vagal bradycardia via a Y2 receptor-mediated, protein kinase C-dependent pathway. J Mol Cell Cardiol 44(3): 477–485.

Hirayama M, Ogata M, Kawamata T, Ishibashi H (2015) Muscarinic receptor-mediated excitation of rat intracardiac ganglion neurons. Neuropharmacology 95: 395–404.

Hoard JL, Hoover DB, Mabe AM, Blakely RD, Feng N, Paolocci N (2008) Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors TrkA and p75. Neuroscience 156(1): 129–142.

Hoard JL, Hoover DB, Wondergem R (2007) Phenotypic properties of adult mouse intrinsic cardiac neurons maintained in culture. American Journal of Physiology-Cell Physiology 293(6): C1875–C1883.

Hogg RC, Adams DJ (2001) An ATP-sensitive K(+) conductance in dissociated neurones from adult rat intracardiac ganglia. J Physiol 534(Pt 3): 713–720.

Hogg RC, Harper AA, Adams DJ (2001) Developmental changes in hyperpolarization-activated currents I(h) and I(K(IR)) in isolated rat intracardiac neurons. J Neurophysiol 86(1): 312–320.

Hoover DB, Baisden RH, Xi-Moy SX (1994) Localization of muscarinic receptor mRNAs in rat heart and intrinsic cardiac ganglia by in situ hybridization. Circ Res 75(5): 813–820.

Hoover DB, Isaacs ER, Jacques F, Hoard JL, Pagé P, Armour JA (2009) Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. Neuroscience 164(3): 1170–1179.

Hoover DB, Shepherd AV, Southerland EM, Armour JA, Ardell JL (2008) Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from dog ventricular myocardium. Auton Neurosci 141(1–2): 38–45.

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 88(7): 2811–2814.

Hopkins DA, Armour JA (1982) Medullary cells of origin of physiologically identified cardiac nerves in the dog. Brain Res Bull 8(4): 359–365.

Hopkins DA, Armour JA (1984) Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. J Comp Neurol 229(2): 186–198.

Hopkins DA, Armour JA (1989) Ganglionic distribution of afferent neurons innervating the canine heart and cardiopulmonary nerves. J Auton Nerv Syst 26(3): 213–222.

Hopkins DA, Armour JA (1998) Brainstem cells of origin of physiologically identified cardiopulmonary nerves in the rhesus monkey (Macaca mulatta). J Auton Nerv Syst 68(1–2): 21–32.

Hopkins DA, Macdonald SE, Murphy DA, Armour JA (2000) Pathology of intrinsic cardiac neurons from ischemic human hearts. The Anatomical Record 259(4): 424–436.

Horackova M, Armour JA, Byczko Z (1999) Distribution of intrinsic cardiac neurons in whole-mount guinea pig atria identified by multiple neurochemical coding. A confocal microscope study. Cell Tissue Res 297(3): 409–421.

Horackova M, Slavikova J, Byczko Z (2000) Postnatal development of the rat intrinsic cardiac nervous system: a confocal laser scanning microscopy study in whole-mount atria. Tissue and Cell 32(5): 377–388.

Huang B, Zdora I, Buhr N de, Lehmbecker A, Baumgärtner W, Leitzen E (2021) Phenotypical peculiarities and species-specific differences of canine and murine satellite glial cells of spinal ganglia. J Cell Mol Med 25(14): 6909–6924.

Huang MH, Horackova M, Negoescu RM, Wolf S, Armour JA (1996) Polysensory response characteristics of dorsal root ganglion neurones that may serve sensory functions during myocardial ischaemia. Cardiovasc Res 32(3): 503–515.

Huang MH, Smith FM, Armour JA (1993) Amino acids modify activity of canine intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation. Am J Physiol 264(4 Pt 2): H1275-1282.

Huang MH, Sylvén C, Horackova M, Armour JA (1995) Ventricular sensory neurons in canine dorsal root ganglia: effects of adenosine and substance P. Am J Physiol 269(2 Pt 2): R318-324.

Huang MH, Wolf SG, Armour JA (1994) Ventricular arrhythmias induced by chemically modified intrinsic cardiac neurones. Cardiovasc Res 28(5): 636–642.

Humphries ESA, Dart C (2015) Neuronal and Cardiovascular Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets. J Biomol Screen 20(9): 1055–1073.

Hwang L-L, Chen C-T, Li T-L, Chiu C-Z, Chi S-F (2004) Central pressor effects of CART peptides in anesthetized rats. Neuropeptides 38(2–3): 69–76.

Irisawa H, Brown HF, Giles W (1993) Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. Physiological Reviews 73(1): 197–227.

Ishibashi H, Umezu M, Jang I-S, Ito Y, Akaike N (2003) Alpha 1-adrenoceptor-activated cation currents in neurones acutely isolated from rat cardiac parasympathetic ganglia. J Physiol 548(Pt 1): 111–120.

Ivanova IV, Schubert R, Duridanova DB, Bolton TB, Lubomirov LT, Gagov HS (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide as an in vivo regulator of cardiac function in Rana ridibunda frog. Exp Physiol 92(6): 1037–1046.

J Boogers M, E Veltman C, J Bax J (2011) Cardiac autonomic nervous system in heart failure: imaging technique and clinical implications. Curr Cardiol Rev 7(1): 35–42.

Jabbari J, Olesen MS, Yuan L, Nielsen JB, Liang B, Macri V, Christophersen IE, Nielsen N, Sajadieh A, Ellinor PT, Grunnet M, Haunsø S, et al. (2015) Common and Rare Variants in SCN10A Modulate the Risk of Atrial Fibrillation. Circ Cardiovasc Genet 8(1): 64–73.

Jarvis MF, Honore P, Shieh C-C, Chapman M, Joshi S, Zhang X-F, Kort M, Carroll W, Marron B, Atkinson R, Thomas J, Liu D, et al. (2007) A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 104(20): 8520–8525.

Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE (2000) Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. Circulation 101(10): 1185–1191.

Jeong SW, Ikeda SR, Wurster RD (1999) Activation of various G-protein coupled receptors modulates Ca2+ channel currents via PTX-sensitive and voltage-dependent pathways in rat intracardiac neurons. J Auton Nerv Syst 76(1): 68–74.

Jeong SW, Wurster RD (1997) Calcium channel currents in acutely dissociated intracardiac neurons from adult rats. J Neurophysiol 77(4): 1769–1778.

Jungen C, Scherschel K, Eickholt C, Kuklik P, Klatt N, Bork N, Salzbrunn T, Alken F, Angendohr S, Klene C, Mester J, Klöcker N, et al. (2017) Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias. Nature Communications 8: 14155.

Katritsis DG, Giazitzoglou E, Zografos T, Pokushalov E, Po SS, Camm AJ (2011) Rapid pulmonary vein isolation combined with autonomic ganglia modification: a randomized study. Heart Rhythm 8(5): 672–678.

Kishi T (2012) Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. J Cardiol 59(2): 117–122.

Klimaschewski L, Kummer W, Mayer B, Couraud JY, Preissler U, Philippin B, Heym C (1992) Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. Circ Res 71(6): 1533–1537.

Koike T, Kioke T, Wakabayashi T, Mori T, Takamori Y, Hirahara Y, Yamada H (2014) Sox2 in the adult rat sensory nervous system. Histochem Cell Biol 141(3): 301–309.

Koninck PD, Carbonetto S, Cooper E (1993) NGF induces neonatal rat sensory neurons to extend dendrites in culture after removal of satellite cells. J Neurosci 13(2): 577–585.

Kulkarni S, Micci M-A, Leser J, Shin C, Tang S-C, Fu Y-Y, Liu L, Li Q, Saha M, Li C, Enikolopov G, Becker L, et al. (2017) Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 114(18): E3709–E3718.

Kuncová J, Slavíková J, Reischig J (2003) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat heart: effect of guanethidine and capsaicin. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger 185(2): 153–161.

Lai B, Mao XO, Xie L, Chang S-Y, Xiong Z-G, Jin K, Greenberg DA (2010) Electrophysiological properties of subventricular zone cells in adult mouse brain. Brain Res 1340: 96–105.

Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N, Richardson W, Potocnik A, Vanden Berghe P, Pachnis V (2011) Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. J Clin Invest 121(9): 3412–3424.

Lera Ruiz M de, Kraus RL (2015) Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. J Med Chem 58(18): 7093–7118.

Li H-Y, Say EHM, Zhou X-F (2007) Isolation and Characterization of Neural Crest Progenitors from Adult Dorsal Root Ganglia. STEM CELLS 25(8): 2053–2065.

Li L, Hatcher JT, Hoover DB, Gu H, Wurster RD, Cheng Z (Jack) (2014) Distribution and morphology of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive axons in the whole-mount atria of mice. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 181: 37–48.

Lim PB, Malcolme-Lawes LC, Stuber T, Wright I, Francis DP, Davies DW, Peters NS, Kanagaratnam P (2011) Intrinsic cardiac autonomic stimulation induces pulmonary vein ectopy and triggers atrial fibrillation in humans. J Cardiovasc Electrophysiol 22(6): 638–646.

Linley JE (2013) Perforated Whole-Cell Patch-Clamp Recording. In: Ion Channels: Methods and Protocols (Gamper N, Ed.). Humana Press, Totowa, NJ, p. 149–157.

Liu D-M, Katnik C, Stafford M, Adams DJ (2000) P2Y purinoceptor activation mobilizes intracellular Ca2+ and induces a membrane current in rat intracardiac neurones. The Journal of Physiology 526(2): 287–298.

Liu J, Tu H, Zheng H, Zhang L, Tran TP, Muelleman RL, Li Y-L (2012) Alterations of calcium channels and cell excitability in intracardiac ganglion neurons from type 2 diabetic rats. Am J Physiol Cell Physiol 302(8): C1119–C1127.

Lizot G, Pasqualin C, Tissot A, Pagès S, Faivre J-F, Chatelier A (2022) Molecular and functional characterization of the mouse intrinsic cardiac nervous system. Heart Rhythm : S1547- 5271(22)01898–7.

Löffelholz K, Pappano AJ (1985) The parasympathetic neuroeffector junction of the heart. Pharmacol Rev 37(1): 1–24.

Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hua X, Hökfelt T, Fischer JA (1985) Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. Eur J Pharmacol 108(3): 315–319.

Lutz W, Frank EM, Craig TA, Thompson R, Venters RA, Kojetin D, Cavanagh J, Kumar R (2003) Calbindin D28K interacts with Ran-binding protein M: identification of interacting domains by NMR spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun 303(4): 1186–1192.

Ma B, Ruan H-Z, Burnstock G, Dunn PM (2005) Differential expression of P2X receptors on neurons from different parasympathetic ganglia. Neuropharmacology 48(5): 766–777.

Maifrino LBM, Liberti EA, Castelucci P, De Souza RR (2006) NADPH- Diaphorase positive cardiac neurons in the atria of mice. A morphoquantitative study. BMC Neurosci 7: 10.

Malet M, Brumovsky PR (2015) VGLUTs and Glutamate Synthesis-Focus on DRG Neurons and Pain. Biomolecules 5(4): 3416–3437.

Mapps AA, Boehm E, Beier C, Keenan WT, Langel J, Liu M, Thomsen MB, Hattar S, Zhao H, Tampakakis E, Kuruvilla R (2022) Satellite glia modulate sympathetic neuron survival, activity, and autonomic function. eLife 11: e74295.

Martin P (1977) The influence of the parasympathetic nervous system on atrioventricular conduction. Circ Res 41(5): 593–599.

Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I (2001) Central human cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 increases arterial pressure in conscious rabbits. Hypertension 38(5): 1096–1100.

Matthews MR (1989) Small, intensely fluorescent cells and the paraneuron concept. J Electron Microsc Tech 12(4): 408–416.

Mattson MP, Kater SB (1987) Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. J Neurosci 7(12): 4034–4043.

Maury P, Delasnerie H, Beneyto M, Rollin A (2021) Autonomic cardiac innervation: impact on the evolution of arrhythmias in inherited cardiac arrhythmia syndromes. Herzschrittmacherther Elektrophysiol 32(3): 308–314.

Mawe GM, Talmage EK, Lee KP, Parsons RL (1996) Expression of choline acetyltransferase immunoreactivity in guinea pig cardiac ganglia. Cell Tissue Res 285(2): 281–286.

McAllen RM, Salo LM, Paton JFR, Pickering AE (2011) Processing of central and reflex vagal drives by rat cardiac ganglion neurones: an intracellular analysis. J Physiol 589(Pt 23): 5801–5818.

McAllen RM, Spyer KM (1976) The location of cardiac vagal preganglionic motoneurones in the medulla of the cat. J Physiol 258(1): 187–204.

Merriam LA, Baran CN, Girard BM, Hardwick JC, May V, Parsons RL (2013) Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. J Neurosci 33(10): 4614–4622.

Merriam LA, Barstow KL, Parsons RL (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances the hyperpolarization-activated nonselective cationic conductance, Ih, in dissociated guinea pig intracardiac neurons. Regul Pept 123(1–3): 123–133.

Mifflin SW, Spyer KM, Withington-Wray DJ (1988) Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: postsynaptic actions and the influence of respiration. J Physiol 399: 349–367.

Moravec M, Moravec J, Forsgren S (1990) Catecholaminergic and peptidergic nerve components of intramural ganglia in the rat heart. An immunohistochemical study. Cell Tissue Res 262(2): 315–327.

Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E (2021) Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. Annales d'Endocrinologie 82(3): 193–197.

Musiałek P (2002) Nitric oxide stimulation of cardiac pacemaking in the sino-atrial node through the activation of a novel signalling pathway: overview of in vitro and in vivo evidence for a new basic mechanism in the control of heart rate. Przegl Lek 59(9): 691–694.

Myagmar B-E, Flynn JM, Cowley PM, Swigart PM, Montgomery MD, Thai K, Nair D, Gupta R, Deng DX, Hosoda C, Melov S, Baker AJ, et al. (2017) Adrenergic Receptors in Individual Ventricular Myocytes: The Beta-1 and Alpha-1B Are in All Cells, the Alpha-1A Is in a Subpopulation, and the Beta-2 and Beta-3 Are Mostly Absent. Circ Res 120(7): 1103–1115.

Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis 26(2): 99–109.

Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260(5554): 799–802.

Ng GA (2014) Vagal modulation of cardiac ventricular arrhythmia. Experimental Physiology 99(2): 295–299.

O'Connell TD, Jensen BC, Baker AJ, Simpson PC (2014) Cardiac Alpha1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance. Pharmacol Rev 66(1): 308–333.

Osman F, Kundu S, Tuan J, Jeilan M, Stafford PJ, Ng GA (2010) Ganglionic plexus ablation during pulmonary vein isolation--predisposing to ventricular arrhythmias? Indian Pacing Electrophysiol J 10(2): 104–107.

Papka RE, Urban L (1987) Distribution, origin and sensitivity to capsaicin of primary afferent substance P-immunoreactive nerves in the heart. Acta Physiol Hung 69(3–4): 459–468.

Parratt JR, Vegh A, Papp JGy (1995) Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning–a brief review of the evidence. Can J Physiol Pharmacol 73(7): 837–842.

Parsons RL (2004) Mammalian Cardiac Ganglia as Local Integration Centers: Histochemical and Electrophysiological Evidence. In: Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation (Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, Eds.). Springer US, Boston, MA, p. 335–356.

Parsons RL, Locknar SA, Young BA, Hoard JL, Hoover DB (2006) Presence and co-localization of vasoactive intestinal polypeptide with neuronal nitric oxide synthase in cells and nerve fibers within guinea pig intrinsic cardiac ganglia and cardiac tissue. Cell Tissue Res 323(2): 197–209.

Paton JFR, Kasparov S, Paterson DJ (2002) Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. Trends Neurosci 25(12): 626–631.

Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R (2005) Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. Heart Rhythm 2(6): 624–631.

Pauza DH, Skripka V, Pauziene N (2002) Morphology of the intrinsic cardiac nervous system in the dog: a whole-mount study employing histochemical staining with acetylcholinesterase. Cells Tissues Organs 172(4): 297–320.

Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R (2000) Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. Anat Rec 259(4): 353–382.

Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza AG, Inokaitis H, Masaityte A, Rudokaite G, Saburkina I, Plisiene J, Pauza DH (2016) Innervation of the rabbit cardiac ventricles. J Anat 228(1): 26–46.

Pauziene N, Pauza DH (2003) Electron microscopic study of intrinsic cardiac ganglia in the adult human. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger 185(2): 135–148.

Pérez GJ, Desai M, Anderson S, Scornik FS (2013) Large-conductance calcium-activated potassium current modulates excitability in isolated canine intracardiac neurons. Am J Physiol Cell Physiol 304(3): C280–C286.

Pevny LH, Nicolis SK (2010) Sox2 roles in neural stem cells. Int J Biochem Cell Biol 42(3): 421–424.

Poth K, Nutter TJ, Cuevas J, Parker MJ, Adams DJ, Luetje CW (1997) Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. J Neurosci 17(2): 586–596.

Qi B, Wei Y, Chen S, Zhou G, Li H, Xu J, Ding Y, Lu X, Zhao L, Zhang F, Chen G, Zhao J, et al. (2014) Nav1.8 channels in ganglionated plexi modulate atrial fibrillation inducibility. Cardiovasc Res 102(3): 480–486.

Rajendran PS, Challis RC, Fowlkes CC, Hanna P, Tompkins JD, Jordan MC, Hiyari S, Gabris-Weber BA, Greenbaum A, Chan KY, Deverman BE, Münzberg H, et al. (2019) Identification of peripheral neural circuits that regulate heart rate using optogenetic and viral vector strategies. Nature Communications 10(1): 1944.

Rajendran PS, Nakamura K, Ajijola OA, Vaseghi M, Armour JA, Ardell JL, Shivkumar K (2016) Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. J Physiol 594(2): 321–341.

Renganathan M, Dib-Hajj S, Waxman SG (2002) Nav1.5 underlies the 'third TTX-R sodium current' in rat small DRG neurons. Molecular Brain Research 106(1): 70–82.

Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Venkataraju KU, Zhou Y, Wang VX, Tang CY, et al. (2016) Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell 165(7): 1789–1802.

Richardson DS, Lichtman JW (2015) Clarifying Tissue Clearing. Cell 162(2): 246–257.

Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. Cell Tissue Res 314(3): 337–350.

Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR (2006) Cocaine- and amphetamine-related transcript peptide and somatostatin in rat intracardiac ganglia. Cell Tissue Res 324(1): 17–24.

Richardt D, Dendorfer A, Tölg R, Dominiak P, Richardt G (2006) Inhibition of nonexocytotic norepinephrine release by desipramine reduces myocardial infarction size. Can J Physiol Pharmacol 84(11): 1185–1189.

Rigel DF, Grupp IL, Balasubramaniam A, Grupp G (1989) Contractile effects of cardiac neuropeptides in isolated canine atrial and ventricular muscles. Am J Physiol 257(4 Pt 2): H1082-1087.

Rimmer K, Harper AA (2006) Developmental changes in electrophysiological properties and synaptic transmission in rat intracardiac ganglion neurons. J Neurophysiol 95(6): 3543–3552.

Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH (2011a) Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. Heart Rhythm 8(3): 448–454.

Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH (2011b) IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE INTRINSIC CARDIAC NEURAL PLEXUS IN WHOLE-MOUNT MOUSE HEART PREPARATIONS. Heart Rhythm 8(5): 731–738.

Sahoo PK, Soltani S, Wong AKC (1988) A survey of thresholding techniques. Computer Vision, Graphics, and Image Processing 41(2): 233–260.

Scherschel K, Bräuninger H, Mölders A, Erlenhardt N, Amin E, Jungen C, Pape U, Lindner D, Chetkovich DM, Klöcker N, Meyer C (2021) Characterization of the HCN Interaction Partner TRIP8b/PEX5R in the Intracardiac Nervous System of TRIP8b-Deficient and Wild-Type Mice. Int J Mol Sci 22(9): 4772.

Schmidt H (2012) Three functional facets of calbindin D-28k. Front Mol Neurosci 5.

Scornik FS, Desai M, Brugada R, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C, Pérez GJ (2006) Functional expression of “cardiac-type” Nav1.5 sodium channel in canine intracardiac ganglia. Heart Rhythm 3(7): 842–850.

Seebeck J, Schmidt WE, Kilbinger H, Neumann J, Zimmermann N, Herzig S (1996) PACAP induces bradycardia in guinea-pig heart by stimulation of atrial cholinergic neurones. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 354(4): 424–430.

Selga E, Pérez-Serra A, Moreno-Asso A, Anderson S, Thomas K, Desai M, Brugada R, Pérez GJ, Scornik FS (2013) Molecular heterogeneity of large-conductance calcium-activated potassium channels in canine intracardiac ganglia. Channels 7(4): 322–328.

Selyanko AA (1992) Membrane properties and firing characteristics of rat cardiac neurones in vitro. Journal of the Autonomic Nervous System 39(3): 181–189.

Sexton A, McDonald M, Cayla C, Thiemermann C, Ahluwalia A (2007) 12-Lipoxygenase-derived eicosanoids protect against myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of neuronal TRPV1. FASEB J 21(11): 2695–2703.

Sharifov OF, Fedorov VV, Beloshapko GG, Glukhov AV, Yushmanova AV, Rosenshtraukh LV (2004) Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. J Am Coll Cardiol 43(3): 483–490.

Shen MJ, Choi E-K, Tan AY, Lin S-F, Fishbein MC, Chen LS, Chen P-S (2011) Neural mechanisms of atrial arrhythmias. Nat Rev Cardiol 9(1): 30–39.

Simms BA, Zamponi GW (2014) Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. Neuron 82(1): 24–45.

Singh S, Sayers S, Walter JS, Thomas D, Dieter RS, Nee LM, Wurster RD (2013) Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor. J Am Heart Assoc 2(4): e000210.

Slavíková J, Kuncová J, Reischig J, Dvoráková M (2003) Catecholaminergic neurons in the rat intrinsic cardiac nervous system. Neurochem Res 28(3–4): 593–598.

Smith FM (1999) Extrinsic inputs to intrinsic neurons in the porcine heart in vitro. Am J Physiol 276(2): R455-467.

Smith NC, Levi R (1999) LLC-PK(1) cells stably expressing the human norepinephrine transporter: A functional model of carrier-mediated norepinephrine release in protracted myocardial ischemia. J Pharmacol Exp Ther 291(2): 456–463.

Smolilo DJ, Costa M, Hibberd TJ, Wattchow DA, Spencer NJ (2018) Morphological evidence for novel enteric neuronal circuitry in guinea pig distal colon. J Comp Neurol 526(10): 1662–1672.

Song ZM, Brookes SJ, Costa M (1991) Identification of myenteric neurons which project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. Neurosci Lett 129(2): 294–298.

Spencer NJ, Hu H (2020) Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 17(6): 338–351.

Stavrakis S, Nakagawa H, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R, Jackman WM (2015) The role of the autonomic ganglia in atrial fibrillation. JACC Clin Electrophysiol 1(1–2): 1–13.

Steele PA, Gibbins IL, Morris JL, Mayer B (1994) Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart. Neuroscience 62(1): 241–250.

Svensson E, Apergis-Schoute J, Burnstock G, Nusbaum MP, Parker D, Schiöth HB (2019) General Principles of Neuronal Co-transmission: Insights From Multiple Model Systems. Front Neural Circuits 12: 117.

Tan AY, Chen P-S, Chen LS, Fishbein MC (2007) Autonomic nerves in pulmonary veins. Heart Rhythm 4(3 Suppl): S57–S60.

Tan CMJ, Green P, Tapoulal N, Lewandowski AJ, Leeson P, Herring N (2018) The Role of Neuropeptide Y in Cardiovascular Health and Disease. Front Physiol 9.

Tanaka K, Chiba T (1998) The vagal origin of preganglionic fibers containing nitric oxide synthase in the guinea-pig heart. Neurosci Lett 252(2): 135–138.

Tay SS, Wong WC (1997) The effects of bilateral vagotomy on substance P-like immunoreactive nerves in the cardiac ganglia of the monkey (Macaca fascicularis). J Hirnforsch 38(1): 125–132.

Tay SS, Wong WC, Ling EA (1984) An ultrastructural study of the non-neuronal cells in the cardiac ganglia of the monkey (Macaca fascicularis) following unilateral vagotomy. J Anat 138 (Pt 3): 411–422.

Ten Eick R, Nawrath H, McDonald TF, Trautwein W (1976) On the mechanism of the negative inotropic effect of acetylcholine. Pflugers Arch 361(3): 207–213.

Thompson GW, Collier K, Ardell JL, Kember G, Armour JA (2000a) Functional interdependence of neurons in a single canine intrinsic cardiac ganglionated plexus. J Physiol 528(Pt 3): 561–571.

Thompson GW, Hoover DB, Ardell JL, Armour JA (1998) Canine intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation possess NK1, NK2, and NK3 receptors. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 275(5): R1683–R1689.

Thompson GW, Horackova M, Armour JA (2000b) Chemotransduction properties of nodose ganglion cardiac afferent neurons in guinea pigs. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279(2): R433-439.

Thompson GW, Horackova M, Armour JA (2002) Role of P1 purinergic receptors in myocardial ischemia sensory transduction. Cardiovascular Research 53(4): 888–901.

Tiaho F, Nerbonne JM (1996) VIP and secretin augment cardiac L-type calcium channel currents in isolated adult rat ventricular myocytes. Pflügers Arch 432(5): 821–830.

Togashi H, Schmidt EF, Strittmatter SM (2006) RanBPM Contributes to Semaphorin3A Signaling through Plexin-A Receptors. J Neurosci 26(18): 4961–4969.

Tompkins JD, Ardell JL, Hoover DB, Parsons RL (2007) Neurally released pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances guinea pig intrinsic cardiac neurone excitability. J Physiol 582(Pt 1): 87–93.

Tompkins JD, Clason TA, Hardwick JC, Girard BM, Merriam LA, May V, Parsons RL (2016) Activation of MEK/ERK signaling contributes to the PACAP-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. American Journal of Physiology-Cell Physiology 311(4): C643–C651.

Tompkins JD, Hardwick JC, Locknar SA, Merriam LA, Parsons RL (2006) Ca2+ Influx, But Not Ca2+ Release From Internal Stores, Is Required for the PACAP-Induced Increase in Excitability in Guinea Pig Intracardiac Neurons. Journal of Neurophysiology 95(4): 2134–2142.

Tompkins JD, Merriam LA, Girard BM, May V, Parsons RL (2015) Nickel suppresses the PACAP-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. American Journal of Physiology-Cell Physiology 308(11): C857–C866.

Tu H, Liu J, Zhang D, Zheng H, Patel KP, Cornish KG, Wang W-Z, Muelleman RL, Li Y-L (2014) Heart failure-induced changes of voltage-gated Ca2+ channels and cell excitability in rat cardiac postganglionic neurons. Am J Physiol Cell Physiol 306(2): C132-142.

Vance WH, Bowker RC (1983) Spinal origins of cardiac afferents from the region of the left anterior descending artery. Brain Res 258(1): 96–100.

Vaseghi M, Salavatian S, Rajendran PS, Yagishita D, Woodward WR, Hamon D, Yamakawa K, Irie T, Habecker BA, Shivkumar K (2017) Parasympathetic dysfunction and antiarrhythmic effect of vagal nerve stimulation following myocardial infarction. JCI Insight 2(16).

Végh AMD, Duim SN, Smits AM, Poelmann RE, Ten Harkel ADJ, DeRuiter MC, Goumans MJ, Jongbloed MRM (2016) Part and Parcel of the Cardiac Autonomic Nerve System: Unravelling Its Cellular Building Blocks during Development. Journal of Cardiovascular Development and Disease 3(3): 28.

Veres JM, Nagy GA, Hájos N (2017) Perisomatic GABAergic synapses of basket cells effectively control principal neuron activity in amygdala networks. eLife 6: e20721.

Verkerk Arie O., Remme Carol Ann, Schumacher Cees A., Scicluna Brendon P., Wolswinkel Rianne, de Jonge Berend, Bezzina Connie R., Veldkamp Marieke W. (2012) Functional NaV1.8 Channels in Intracardiac Neurons. Circulation Research 111(3): 333–343.

Voigt FF, Kirschenbaum D, Platonova E, Pagès S, Campbell RAA, Kastli R, Schaettin M, Egolf L, Bourg A van der, Bethge P, Haenraets K, Frézel N, et al. (2019) The mesoSPIM initiative: open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue. Nat Methods 16(11): 1105–1108.

Wake E, Brack K (2016) Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. Auton Neurosci 199: 3–16.

Wang D, Lu J, Xu X, Yuan Y, Zhang Y, Xu J, Chen H, Liu J, Shen Y, Zhang H (2021) Satellite Glial Cells Give Rise to Nociceptive Sensory Neurons. Stem Cell Rev Rep 17(3): 999–1013.

Wang T, Miller KE (2016) Characterization of Glutamatergic Neurons in the Rat Atrial Intrinsic Cardiac Ganglia that Project to the Cardiac Ventricular Wall. Neuroscience 329: 134–150.

Wegner M (2017) Neural Crest Diversification and Specification: Transcriptional Control of Schwann Cell Differentiation☆. In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology Elsevier,.

Weihe E, Schütz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schäfer MK, Eiden LE (2005) Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. J Comp Neurol 492(3): 370–379.

Wikström, Manira AE (1998) Calcium influx through N- and P/Q-type channels activate apamin-sensitive calcium-dependent potassium channels generating the late afterhyperpolarization in lamprey spinal neurons. European Journal of Neuroscience 10(4): 1528–1532.

Wink J, Delft R van, Notenboom RGE, Wouters PF, DeRuiter MC, Plevier JWM, Jongbloed MRM (2020) Human adult cardiac autonomic innervation: Controversies in anatomical knowledge and relevance for cardiac neuromodulation. Autonomic Neuroscience 227: 102674.

Wu L, Lu Y, Yao Y, Zheng L, Chen G, Ding L, Hou B, Qiao Y, Sun W, Zhang S (2016) New-onset ventricular arrhythmias post radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation. Medicine (Baltimore) 95(36): e4648.

Xi X, Randall WC, Wurster RD (1994) Electrophysiological properties of canine cardiac ganglion cell types. J Auton Nerv Syst 47(1–2): 69–74.

Xi Y, Wu G, Ai T, Cheng N, Kalisnik JM, Sun J, Abbasi S, Yang D, Fan C, Yuan X, Wang S, Elayda M, et al. (2013) Ionic Mechanisms Underlying the Effects of Vasoactive Intestinal Polypeptide on Canine Atrial Myocardium. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 6(5): 976–983.

Xie AX, Lee JJ, McCarthy KD (2017) Ganglionic GFAP + glial Gq-GPCR signaling enhances heart functions in vivo. JCI Insight 2(2): e90565.

Xi-Moy SX, Dun NJ (1995) Potassium currents in adult rat intracardiac neurones. J Physiol 486 (Pt 1): 15–31.

Xu ZJ, Adams DJ (1992a) Resting membrane potential and potassium currents in cultured parasympathetic neurones from rat intracardiac ganglia. J Physiol 456: 405–424.

Xu ZJ, Adams DJ (1992b) Voltage-dependent sodium and calcium currents in cultured parasympathetic neurones from rat intracardiac ganglia. J Physiol 456: 425–441.

Xu ZJ, Adams DJ (1993) Alpha-adrenergic modulation of ionic currents in cultured parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. J Neurophysiol 69(4): 1060–1070.

Yamada S, Yoshihisa A, Hijioka N, Kamioka M, Kaneshiro T, Yokokawa T, Misaka T, Ishida T, Takeishi Y (2020) Autonomic dysfunction in cardiac amyloidosis assessed by heart rate variability and heart rate turbulence. Ann Noninvasive Electrocardiol 25(4): e12749.

Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM (2012) Blocking SCN10A channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. Circ Res 111(3): 322–332.

Yokoyama T, Lee J-K, Miwa K, Opthof T, Tomoyama S, Nakanishi H, Yoshida A, Yasui H, Iida T, Miyagawa S, Okabe S, Sawa Y, et al. (2017) Quantification of sympathetic hyperinnervation and denervation after myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. PLoS One 12(7).

Yu T, Zhu J, Li D, Zhu D (2021) Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. iScience 24(3): 102178.

Zandstra TE, Notenboom RGE, Wink J, Kiès P, Vliegen HW, Egorova AD, Schalij MJ, De Ruiter MC, Jongbloed MRM (2021) Asymmetry and Heterogeneity: Part and Parcel in Cardiac Autonomic Innervation and Function. Frontiers in Physiology 12.

Zhang D, Tu H, Cao L, Zheng H, Muelleman RL, Wadman MC, Li Y (2018) Reduced N-Type Ca2+ Channels in Atrioventricular Ganglion Neurons Are Involved in Ventricular Arrhythmogenesis. J Am Heart Assoc 7(2).

Zhang D, Tu H, Wang C, Cao L, Muelleman RL, Wadman MC, Li Y-L (2017) Correlation of Ventricular Arrhythmogenesis with Neuronal Remodeling of Cardiac Postganglionic Parasympathetic Neurons in the Late Stage of Heart Failure after Myocardial Infarction. Frontiers in Neuroscience 11.

Zhang L, Hancock JC, Hoover DB (2005) Tachykinin Agonists Modulate Cholinergic Neurotransmission at Guinea-Pig Intracardiac Ganglia. Journal of Pharmacological Sciences 99(3): 228–238.

Zhang L, Tompkins JD, Hancock JC, Hoover DB (2001) Substance P modulates nicotinic responses of intracardiac neurons to acetylcholine in the guinea pig. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281(6): R1792-1800.

Zhang L, Xie R, Yang J, Zhao Y, Qi C, Bian G, Wang M, Shan J, Wang C, Wang D, Luo C, Wang Y, et al. (2019a) Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from Sox2-positive satellite cells. Glia 67(6): 1062–1075.

Zhang L, Xie R, Yang J, Zhao Y, Qi C, Bian G, Wang M, Shan J, Wang C, Wang D, Luo C, Wang Y-Z, et al. (2019b) Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from Sox2-positive satellite cells. Glia 67.

Zündorf G, Reiser G (2011) Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection. Antioxid Redox Signal 14(7): 1275–1288.

ANNEXES

[1]. Liste des communications scientifiques

COMMUNICATIONS ORALES

Electrophysiological characterization of mouse intracardiac neurons

Lizot G., Bescond J., Bois P., Faivre J. F., Chatelier A.

Congrès international des canaux ioniques 2022 - 31e édition (Sète, France)

Electrophysiological characterization of mouse intracardiac calbindin neurons

Lizot G., Bescond J., Bois P., Faivre J. F., Chatelier A.

Congrès international Printemps de la cardiologie 2022 (Tours, France)

Eclairage sur le système nerveux intracardiaque

Lizot G., Bois P., Chatelier A.

Séjour thématique de l'école doctorale Sciences Biologiques et Santé 2019 (Mézière en Brenne, France)

POSTERS

Electrophysiological characterization of mouse intracardiac calbindin neurons

Lizot G., Bescond J., Bois P., Faivre J. F., Chatelier A.

Congrès international de la biophysical society 2022 - 65e édition (San Francisco, Etats Unis)

Enhanced calcium constitutive entries through optogenetically drived membrane hyperpolarization impact on C2C12 myoblast behavior

Lizot G., Chapotte Baldacci C. A., Jajkiewicz C., Magaud C., Thoreau V., Penna A., Bois P., Sebille S. Chatelier A.

Congrès international des canaux ioniques 2019 - 30e édition (Sète, France)

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Molecular and functional characterization of the mouse intrinsic cardiac nervous system

Lizot G., Pasqualin C., Tissot A., Pagès S., Faivre J.F., Chatelier A. (2022) *Heart Rhythm,* 18:S1547-5271(22)01898-7. DOI : 10.1016/j.hrthm.2022.04.012

Fine Tuning of Calcium Constitutive Entry by Optogenetically-Controlled Membrane Polarization: Impact on Cell Migration.

Chapotte Baldacci C. A., **Lizot G.,** Jajkiewicz C., Lévêque M., Penna A., Magaud C., Thoreau V., Bois P., Sebille S., Chatelier A., (2020) *Cells* 9(7)1684. DOI: 10.3390/cells9071684

[2]. Article scientifique annexe

cells

MDPI

Article

Fine Tuning of Calcium Constitutive Entry by Optogenetically-Controlled Membrane Polarization: Impact on Cell Migration

Charles-Albert Chapotte-Baldacci [1], Guénaëlle Lizot [1], Cyrielle Jajkiewicz [1], Manuella Lévêque [1,2], Aubin Penna [1], Christophe Magaud [1], Vincent Thoreau [3], Patrick Bois [1], Stéphane Sebille [1] and Aurélien Chatelier [1,*]

1 Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), CNRS ERL 7003—EA 7349, Université de Poitiers, Pôle Biologie Santé, Bâtiment B36, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 9, 86073 Poitiers, France; charles.albert.chapotte.baldacci@univ-poitiers.fr (C.-A.C.-B.); guenaelle.lizot@univ-poitiers.fr (G.L.); cyrielle.jajkiewicz@etu.univ-poitiers.fr (C.J.); manuella.leveque@univ-poitiers.fr (M.L.); aubin.penna@univ-poitiers.fr (A.P.); christophe.magaud@univ-poitiers.fr (C.M.); patrick.bois@univ-poitiers.fr (P.B.); stephane.sebille@univ-poitiers.fr (S.S.)

2 Dermatology Department, University Hospital of Poitiers, 86000 Poitiers, France

3 Neurovascular Unit and Cognitive Disorders (NEUVACOD), EA 3808, Université de Poitiers, Pôle Biologie Santé, Bâtiment B36, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, CEDEX 9, 86073 Poitiers, France; vincent.thoreau@univ-poitiers.fr

* Correspondence: aurelien.chatelier@univ-poitiers.fr; Tel.: +33-(0)5-4945-37-47

Received: 12 June 2020; Accepted: 8 July 2020; Published: 13 July 2020

check for updates

Abstract: Anomalies in constitutive calcium entry (CCE) have been commonly attributed to cell dysfunction in pathological conditions such as cancer. Calcium influxes of this type rely on channels, such as transient receptor potential (TRP) channels, to be constitutively opened and strongly depend on membrane potential and a calcium driving force. We developed an optogenetic approach based on the expression of the halorhodopsin chloride pump to study CCE in non-excitable cells. Using C2C12 cells, we found that halorhodopsin can be used to achieve a finely tuned control of membrane polarization. Escalating the membrane polarization by incremental changes in light led to a concomitant increase in CCE through transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) channels. Moreover, light-induced calcium entry through TRPV2 channels promoted cell migration. Our study shows for the first time that by modulating CCE and related physiological responses, such as cell motility, halorhodopsin serves as a potentially powerful tool that could open new avenues for the study of CCE and associated cellular behaviors.

Keywords: non-excitable cell; halorhodopsin; TRP channels; constitutive calcium entry; TRPV2; migration

1. Introduction

The tight control of intracellular calcium homeostasis is a key determinant of normal cell function and survival. At any time and even in resting cells, this control involves a finely tuned balance between intracellular calcium storage, calcium influx and calcium extrusion across the plasma membrane. Calcium influx can be achieved via several classes of ion channels depending on the cell type; these include voltage-gated calcium channels, ligand-gated ion channels and channels of the transient receptor potential (TRP)/Orai families. The different types of channels facilitate calcium movement across the plasma membrane as a function of the electrochemical gradient, thereby giving rise to an increase in cytosolic-free calcium. The finely tuned control of these entries is therefore essential

for the differential modulation of signaling pathways involved in specific cellular processes such as proliferation, cell death, gene transcription, cell migration, exocytosis or contraction [1].

The cytosolic calcium concentration under basal conditions achieves a steady-state equilibrium whereby calcium influx through constitutively active channels is balanced by efflux across the plasma membrane. Such constitutive calcium entry (CCE) through TRP channels has been widely related to the homeostatic function in normal cells as well as dysfunction in pathological conditions [2–5]. This form of calcium influx is due to the fact that some types of channels can be open at rest, with the amplitude of the influx strongly dependent on the membrane potential and associated calcium driving force. Whereas TRP and CCE have been identified in several cell types [3–5], the resting membrane potential of these cells can vary widely depending on the excitable or non-excitable nature of the cell type under investigation. Excitable cells, such as neurons or cardiac and skeletal muscle cells, are characterized by their polarized resting membrane potentials in the −50 mV to −90 mV range and their ability to generate action potentials. In contrast, non-excitable cells have a more depolarized resting potential in the −10 mV to −30 mV range [6]. Even if these cells are considered to be non-excitable, several studies have shown, however, that they exhibit membrane potential variations characterized by hyperpolarization phases during essential cellular processes such as proliferation, migration or differentiation [7–9]. One hypothesis is that by increasing the calcium driving force, membrane polarization would augment CCE through TRP channels and/or Orai channels. This subject has been particularly investigated in cancer cell studies but seems to be a common mechanism in many cell types [10–16]. The study of CCE in physiological and pathophysiological cellular processes is currently hampered, however, by the limited number of molecular tools and experimental approaches available to specifically modulate CCE.

Most studies of CCE are based on the use of gene knockout or pharmacological tools to block or activate TRP/Orai channels [17,18]. However, cells often adapt to calcium channel gene invalidation by reorganizing their calcium homeostasome to maintain calcium homeostasis. On the other hand, pharmacological modulators are often poorly selective, particularly in relation to studies requiring the long-term incubation of cell cultures with these agents where the potential for off-target cellular side effects is considerable. Moreover, the use of such pharmacological modulators often strongly activates these channels, thereby preventing their basal constitutive activity from being studied.

Here we chose to explore an alternative strategy to study CCE by modulating the driving force for calcium via the optogenetic control of the resting membrane potential. Indeed, optogenetic tools are particularly suited for fine tuning the membrane potential with a strong spatio-temporal resolution. Since the approach was first described and developed in neural cells [19], optogenetics has spurred immense research activity, permitting important advances to be made in our understanding of neural circuitry and brain function given the possibility to optically interrogate the electrical activity of targeted neurons with high specificity and spatio-temporal resolution. Whereas use of this technique has expanded to the study of other excitable cells, such as cardiomyocytes [20,21] or skeletal muscle cells [22–24], it has only been used sparingly to control membrane potential in non-excitable cells. As mentioned above, non-excitable cells have a lowly polarized membrane potential that may undergo temporary hyperpolarization in response to cell activity. In this condition, the use of polarizing optogenetic tools could be of particular interest. Halorhodopsin (eNpHR) is a light-activated chloride pump that drives chloride ion entry when stimulated by 590 nm light. This entry occurs even against chloride electrochemical gradient and is therefore not dependent on intracellular chloride concentration. [25]. Thus, eNpHR light stimulation leads to a negatively charged ions entry that polarizes the cell membrane potential. This pump has been principally used to date as a neuron silencer [26–29], but never to investigate the impact of membrane polarization on non-excitable cells. Optogenetics, and particularly polarizing tools such as halorhodopsin, could therefore provide a powerful means to achieve a precise spatio-temporal control of membrane potential and CCE, as well as the associated cellular processes such as cell migration.

Since this possibility has not been tested to date, we sought to determine whether membrane polarization induced by halorhodopsin activation could enhance CCE and thereby modulate cellular behavior. To test this hypothesis, we used the mouse myoblast cell line C2C12, a non-excitable cell line expressing several types of ion channels [16,30,31] amongst which TRP channels are known to be important for their calcium signaling and migration-associated properties [32–35]. After having confirmed the capacity of halorhodopsin to polarize the membrane potential of C2C12 cells, we investigated the effect of this light-controlled polarization on CCE and demonstrated that it is possible to tightly control CCE through precise halorhodopsin light stimulation. Finally, we show that continuous light stimulation of the halorhodopsin pump enhanced CCE and led to increased cell migration. During this study, we incidentally identified transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) as an important player in this CCE and highlighted a role of this channel in C2C12 cell migration. We therefore propose a role for the light-responsive halorhodopsin pump as an innovative tool to investigate CCE and to modulate cellular behavior in non-excitable cells by controlling their membrane potential.

2. Material and Methods

2.1. Cell Culture and Transfection

C2C12 mouse skeletal myoblasts, human embryonic kidney (HEK)293 cells and HEK293 cells expressing mouse TRPV2 in a stable manner were grown at 37 °C with a 5% CO_2 humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Basel, Switzerland). The DMEM was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaillé, France) and 1% penicillin/streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich, Lyon, France) for C2C12 cells and with 8% FBS for HEK293 cell cultures. Cells were transfected using a Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) according to the manufacturer's instructions. For co-transfection, the total DNA was adjusted to 8 µg per well in 6-well plates. C2C12 myoblasts were seeded after transfection. For patch clamp and calcium imaging experiments, the cells were seeded on Matrigel (Corning, Wiesbaden, Germany)-coated glass coverslips in 35 mm tissue culture dishes, while for migration experiments, 24-well plates and Matrigel-coated glass coverslips in 35 mm tissue culture dishes were used.

2.2. Gene Constructs

For the optogenetic control of C2C12 myoblasts, cells were transfected with a pCMV-eNpHR3.0-EYFP plasmid derived from pCaMKIIa-eNpHR3.0-EYFP (Addgene #26971, Watertown, MA, USA). For this construct, the CaMKIIa promoter was excised using MluI and BamHI restriction endonucleases (New England Biolabs, Evry, France) and replaced by a human cytomegalovirus (CMV) promoter excised from pcDNA™3.1/Zeo(-) (ThermoFisher, Villebon sur Yvette, France) with the same enzymes. For co-expression experiments of the dominant-negative mutant E594K of TRPV2, we used the plasmid pcDNA3-mTRPV2(E594K)-Flag obtained from Aubin Penna [36].

2.3. Immunoblotting

To determine the TRPV2 protein expression, 1×10^6 cells were lysed in a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, Sigma-Aldrich, Lyon, France) containing protease and phosphatase inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Lyon, France; PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Germany). Next, 10 µg of protein samples were separated by SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then subjected to western blotting using a rabbit anti-TRPV2 antibody (1:1000, ab74859, Abcam, Cambridge, UK) and a mouse anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (1:1000, sc-32233, Santa Cruz, Heidelberg, Germany). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and goat anti-mouse

antibodies (1:5000, 115-035-144 and 115-035-146, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) were used as secondary antibodies and proteins were detected using enhanced chemiluminescence (Immobilon, Merck Millipore, Molsheim, France). Images were obtained using the GeneGnome Imager (SynGene Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France).

2.4. Immunofluorescence Staining

C2C12 myoblasts transfected with eNpHR-YFP alone or co-transfected with mTRPV2[E594K]-FLAG were fixed using 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Alrich, Lyon, France) in phosphate-buffered saline (PBS, Corning, Wiesbaden, Germany) for 10 min at 4 °C and permeabilized in 0.2% PBS/Triton X-100. Blocking of non-specific sites and permeabilization were achieved by incubation with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Lyon, France) and 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 30 min at room temperature. Cells were stained using the blocking solution containing rabbit polyclonal anti-TRPV2 antibody (1:200, ACC-039, Alomone labs, Jerusalem, Israel) or rabbit polyclonal anti-FLAG antibody (1:100, F7425, Sigma-Aldrich, Lyon, France) overnight at 4 °C, followed by an incubation with the donkey anti-rabbit secondary antibody coupled with red fluorescent Alexa Fluor 555 (1:400, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) for 2 h at room temperature. Finally, DAPI (4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1:200, Sigma-Aldrich, Lyon, France) staining was performed to visualize nuclei. After washing, the glass coverslips were slide mounted in Mowiol (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The immunolabeled samples were examined by confocal scanning microscopy using an FV-1000 system mounted on an Olympus IX81 inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

2.5. Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA from cultures of C2C12 myoblasts was isolated using RNABLe reagent (Eurobio, Les Ulis, France) followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation (Sigma-Aldrich, Lyon, France). RNA integrity was evaluated by ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) staining on a 1% agarose gel. Total RNA was quantified by assessing optical density at 260 and 280 nm (NanoDrop ND-100 Labtech, Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Complementary DNAs (cDNAs) were synthesized as follows: 10 µL of total RNA (1 µg) were added to 12 µL of reaction mixture (100 mM Tris–HCl (pH 8.3), 150 mM KCl, 6.25 mM MgCl2, 20 mM DTT, 2 mM dNTPs) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) and 1.5 µg Random Primer Pd(N)6 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). RNA was denatured at 65 °C for 2 min and then added to 40 U RNAse inhibitors (RNaseOUT, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) and 400 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) to 25 µL final volume. cDNA was synthesized at 37 °C for 1 h and then 25 µL sterile water was added. The remaining enzymes were heat-deactivated (100 °C, 2 min). After the RT procedure, 10 µL of cDNA (≈150 ng) was added to 40 µL of PCR reaction mixture (22 mM Tris–HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 2.2 mM $MgCl_2$, 277.8 µM dNTPs, 12 pmol forward and reverse primers and 1.25 U of Taq Polymerase) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Thermal cycles were performed in a PTC-100 thermal cycler (M.J. Research, Inc, Watertown, MA, USA) and consisted of exposure to 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55, 57 or 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. After the last cycle, samples were incubated at 72 °C for 5 min to ensure complete product extension. All primer sequences and annealing temperatures are described in Table 1. An amount of 18S mRNA was used as a housekeeping gene and the negative control consisted of PCR reactions without template addition. cDNAs extracted from hippocampal and cortical tissue were used as positive controls for TRPC4 mRNAs [37]. Amplified products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels (containing 0.01% ethidium bromide) in Tris-Acetate-EDTA buffer (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and visualized using a UV Transilluminator (E-box VX5, Vilber, Marne la Vallée, France).

Table 1. Mouse gene-specific primers for RT-PCR.

Gene	Ref seq	Primers (5′–3′)	Annealing Temperature (°C)	Amplicon (pb)
TRPC1	NM_011643 NM_001311123	CAAGATTTTGGGAAATTTCTGG TTTATCCTCATGATTTGCTAT	55	371
TRPC4	NM 016984	TCTGCAGATATCTCTGGGAAGGATGC AAGCTTTGTTCGAGCAAATTTCCATTC	57	414
TRPM7	NM_021450 NM_001164325	TTGGAGCATTTGTGGGACAC ACGGGCTTAAATGGAGAAGCA	60	328
TRPV2	NM 011706	AGATGCTTAGAACTAAGGTGGAGG AGAGTCGGTCACGGTCAAAC	60	500
TRPV4	NM_022017	GTGGGCAAGAGCTCAGATGG CCGAGGACCAACGATCCCTAC	60	184
18S mRNA (Mrps6)	NM 080456	TTTGATTCTGAAAGCCATGCG CCAGTATGTTCTCCACAGCA	57	218

2.6. Electrophysiology

Endogenous fluorescence of yellow fluorescent protein (YFP) was used to identify eNpHR-positive C2C12 myoblasts. Measurements were carried out at room temperature (≈22 °C). Patch electrodes (≈4 MΩ) were pulled from borosilicate glass capillaries (GC150T, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) using a vertical micropipette puller (Narishige, Tokyo, Japan). The patch pipettes were filled with (mM): 10 NaCl, 130 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 2 Mg-ATP, 1 EGTA and 10 HEPES. The pH was adjusted to 7.2 using KOH. The bath solution contained (mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1.8 $MgCl_2$, 11 glucose, and 10 HEPES. The pH was adjusted to 7.4 using NaOH. Experiments were performed using an Axopatch 200B amplifier with a CV 202 AU headstage (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Voltage and current clamp (I = 0) experiments were performed using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Voltage-clamp and light pulses were generated by a personal computer equipped with an analog-digital converter (Axon Digidata 1550a, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) using pClamp software v10.2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). eNpHR currents were digitized at 5 KHz and filtered at 2 KHz. For all experiments, a 5 s interval between each stimulation was applied. The digitized currents were stored on a computer for later off-line analysis. Cell illumination was performed through the 20x objective of the microscope by using a light guide-coupled LED with a 590 nm beam (Thorlabs, Maisons-Lafitte, France). This was connected to a DC4100 controller (Thorlabs, Maisons-Lafitte, France) and driven via pClamp 10.2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) to manage light pulses. Voltage-clamp experiments were performed on cells maintained at a holding potential of −15 mV and exposed to 1 s light pulses of different intensities (from 2.5 to 84.1 $mW.cm^{-2}$). A 3 min light pulse at 16.2 $mW.cm^{-2}$ was performed to observe voltage control stability induced by eNpHR activity. Analyses were performed using Clampfit 10.2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Light power was assessed by a photometer (Opton Laser International, Orsay, France) at the output of the 20X microscope objective.

2.7. Calcium Measurements

Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) changes were measured using the Fura-2/AM fluorescent probe (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP were incubated with Fura-2/AM (3 µM, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) for 30 min at 37 °C with 5% CO_2. They were washed twice with Tyrode's solution containing 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose (pH 7.4). Petri dishes were mounted in the observation chamber and cells bathed in Tyrode's solution were imaged. Ratiometric calcium imaging was performed with an Olympus IX73 inverted microscope (Olympus, Tokyo, France). Cells were excited at 340 and 380 nm using a Lambda 421 beam combiner (Sutter Instrument, Ballancourt-Sur-Essonne, France) and the emitted signal acquired at 510 nm using an Andor Zyla 4.2 PLUS cooled sCMOD camera (Andor Technology, Oxford Instruments, Belfast, UK).

Images were acquired with Metafluor software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Paired images were collected every 1–2 sec for 1-10 min and analyzed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Basal fluorescence was recorded for at least 30 s, after which the coverslips were used for light stimulation and treatments. Fluorescence changes were expressed as the ratio F340/F380 normalized to basal values (ΔF/F0). eNpHR-YFP-positive cells were identified by YFP fluorescence. Cell illumination was performed using a 593/40 nm LED light positioned close to the cell and controlled manually by a Ce:YAG driver (Doric Lenses, Quebec, Quebec, Canada). Light pulses (duration 30 s) of different intensities (from 2.5 to 56.1 $mW.cm^{-2}$) were applied to cells in Tyrode's solution in the presence or absence of calcium, and with or without preincubation for 30 min with 100 µM Tranilast (Merck Millipore, Molsheim, France). For experiments with Ca^{2+}-free solution, $CaCl_2$ was omitted from the medium and replaced with 0.1 mM EGTA.

2.8. Fura-2 Quenching Assay

eNpHR-YFP-expressing myoblasts, plated on glass coverslips, were washed with Tyrode's solution and incubated with Fura-2/AM (3 µM) for 30 min at 37 °C and 5% CO_2. After Fura-2/AM loading, cells were perfused with Tyrode's solution for a few seconds and then a peristaltic pump (Gilson, Middleton, WI, USA) was used to perfuse the cells with a manganese solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 0.1 mM Mn^{2+}, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose, pH 7.4) to quench the Fura-2 fluorescence. Fura-2-loaded cells were excited at 365 nm with a Lambda 421 beam combiner and the emitted signal was acquired at 510 nm using the same system described in the section "Calcium measurements". The influx of Mn^{2+} through cation channels was evaluated by the quenching of Fura-2 fluorescence excited at 365 nm, i.e., at the isosbestic point (360 nm). Fluorescence variation was recorded with Metafluor software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). After 3 min in manganese solution, cells were illuminated with a 593/40 nm LED light at an intensity of 48 $mW.cm^{-2}$. C2C12 myoblasts which did not express eNpHR-YFP were used as internal control. The quench rate of fluorescence intensity, expressed as percent per minute, was estimated using a linear regression analysis and the intensity obtained before Mn^{2+} perfusion was set to 100%.

2.9. In Vitro Migration Assay

3×10^3 $cells/cm^2$ were grown on 24-well plates or in 35 mm-diameter culture dishes with a bottom made from a glass coverslip coated with Matrigel. Cell migration was recorded automatically every 20 min for 15 h for cells in a culture medium maintained at 37 °C and 5% CO_2. eNpHR-YFP-positive cell migration tracking was performed using the YFP fluorescence. Experiments using eNpHR light stimulation assays and associated controls were performed on a fast spinning disk confocal microscope (IX81-ZDC, Olympus, Tokyo, Japan) mounted on an Andor Revolution imaging system (Andor Technology, Oxford Instruments, Belfast, UK) and coupled to light stimulation at 590 nm with an optical fiber (Doric Lenses, Canada). C2C12 myoblasts were continuously stimulated at 18 $mW.cm^{-2}$ throughout the migration assay (15 h). A second part of the cell migration experiment, which did not require light stimulation, was performed using a real-time recorder (JuLI stage, NanoEnTek, Seoul, Korea) in combination with treatments. Cell tracking was performed with ImageJ software and average velocity from multiple independent coverslips was used to calculate the sample mean ± standard error of the mean (SEM) obtained after analysis.

2.10. Statistical Analysis

Results were expressed as mean ± SEM. All statistical analyses were performed using PRISM software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were used to determine statistical significance.

3. Results

3.1. Light Activation of eNpHR Induces Membrane Polarization in C2C12 Myoblasts

To determine the impact of light-induced eNpHR activation on chloride currents and membrane potential, we expressed a recombinant eNpHR-YFP fusion protein in C2C12 myoblasts by cellular transfection of the pCMV-eNpHR3.0-YFP plasmid. The vector codes for a 590 nm wavelength-activated chloride pump coupled to the yellow fluorescent protein (YFP) to identify transfected cells (Figure 1A). Twenty-four hours after transfection, the expression, localization and functionality of eNpHR-YFP in C2C12 myoblasts were determined. We observed a strong expression of eNpHR-YFP protein located primarily at the plasma membrane, although a minor but detectable signal around intracellular sites was also observed (Figure 1B). The functionality of eNpHR in transfected C2C12 myoblasts was assessed by evaluating its ability to be activated by 1 s light pulses of escalating intensity. Light stimulations (590 nm) were applied to patch-clamped (whole-cell configuration) C2C12 myoblasts held at −15 mV. Light stimulation induced outward currents from a light power of 1.3 mW/cm^2, producing a current of 0.2 ± 0.1 pA/pF (n = 29) and reaching a plateau of 5.2 ± 1.1 pA/pF at around 40.2 mW/cm^2 (n = 29; Figure 1C). To examine changes in the membrane potential induced by eNpHR currents, C2C12 myoblasts were placed in the current-clamp configuration and irradiated with 1 s light pulses as before. The increase in light power induced cell polarization, with a shift of the membrane potential toward more negative values (Figure 1D). The resting membrane potential of these cells was −9.3 ± 2.3 mV in the absence of light stimulation. Membrane potential polarization commenced at a light power of 2.7 mW/cm^2 (−15.2 ± 2.7 mV, n = 36) and hyperpolarized towards a plateau beginning at irradiations above 29.2 mW/cm^2. The membrane potential continued to decrease more gradually until a rheobase of −87.8 ± 7.3 mV was reached at 84.1 mW/cm^2 (n = 36). At maximum light intensity, the kinetics of membrane polarization are depicted by a time constant of 18.7 ± 2.1 ms (n = 36). To test whether membrane polarity could be maintained for long periods of light stimulation, light (16.2 mW/cm^2) was applied for 180 s. The membrane potential decreased, reaching a steady-state level around −50 mV and then returning to the basal value of −10 mV once the light stimulation was switched off (Figure 1E). These results indicate that the halorhodopsin pump is a relevant tool for the fine and reversible control of membrane polarization. We therefore sought to test the impact of this pump's activity on the maintenance of intracellular calcium homeostasis.

3.2. Light-Activated Membrane Polarization Induces Calcium Elevation through Constitutive Ca^{2+} Entry

Membrane polarity is a determining factor in the control of calcium influx. Indeed, membrane polarization increases the calcium driving force and could therefore magnify CCE [5]. To test this hypothesis in our C2C12 model, we performed experiments to measure changes in $[Ca^{2+}]_i$ that may occur during light-induced membrane polarization. We used a strategy based on the ratiometric Fura-2 calcium-sensitive dye. Conveniently, the excitation/emission wavelengths of Fura-2 do not overlap with those of YFP or eNpHR, thus permitting simultaneous Fura-2 recordings and eNpHR stimulation to be performed. Light stimulations at 590 nm led to increased $[Ca^{2+}]_i$ in eNpHR-transfected myoblasts, in contrast to control cells where no calcium increase was observed (Figure 2A). The lowest calcium response was obtained for light stimulations of 6 mW/cm^2, with a plateau reached for values above 48 mW/cm^2 (Figure 2B). Increased $[Ca^{2+}]_i$ was seen almost immediately from the time the light stimulation was turned on and plateaued throughout the duration of light stimulation (Figure 2C). When the light stimulation was switched off, $[Ca^{2+}]_i$ decreased gradually back to its basal level with a mean recovery time of 50.6 ± 2.8 s. To determine whether the calcium increase depended on intracellular or extracellular stores, C2C12 cells expressing eNpHR-YFP were perfused with Tyrode's solution containing no calcium. No light-induced calcium elevation was observed during the perfusion of cells with this solution, which contrasted to that seen with the perfusion of Tyrode's solution containing calcium (Figure 2C,D). Washout of the calcium-free solution with a control of Tyrode's solution restored light-induced calcium elevations, but to a lower level. To confirm the extracellular origin of the calcium

source, we conducted Mn^{2+} quenching experiments and compared the rate of Fura-2 quenching as an index of calcium entry. A significant increase in Fura-2 fluorescence quenching (Figure 2E) was observed in light-stimulated C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP (23.7 ± 3.0 %/min) compared to control cells (9.6 ± 0.5 %/min) (Figure 2F). These results suggest that light-induced membrane hyperpolarization augments CCE, thereby increasing $[Ca^{2+}]_i$.

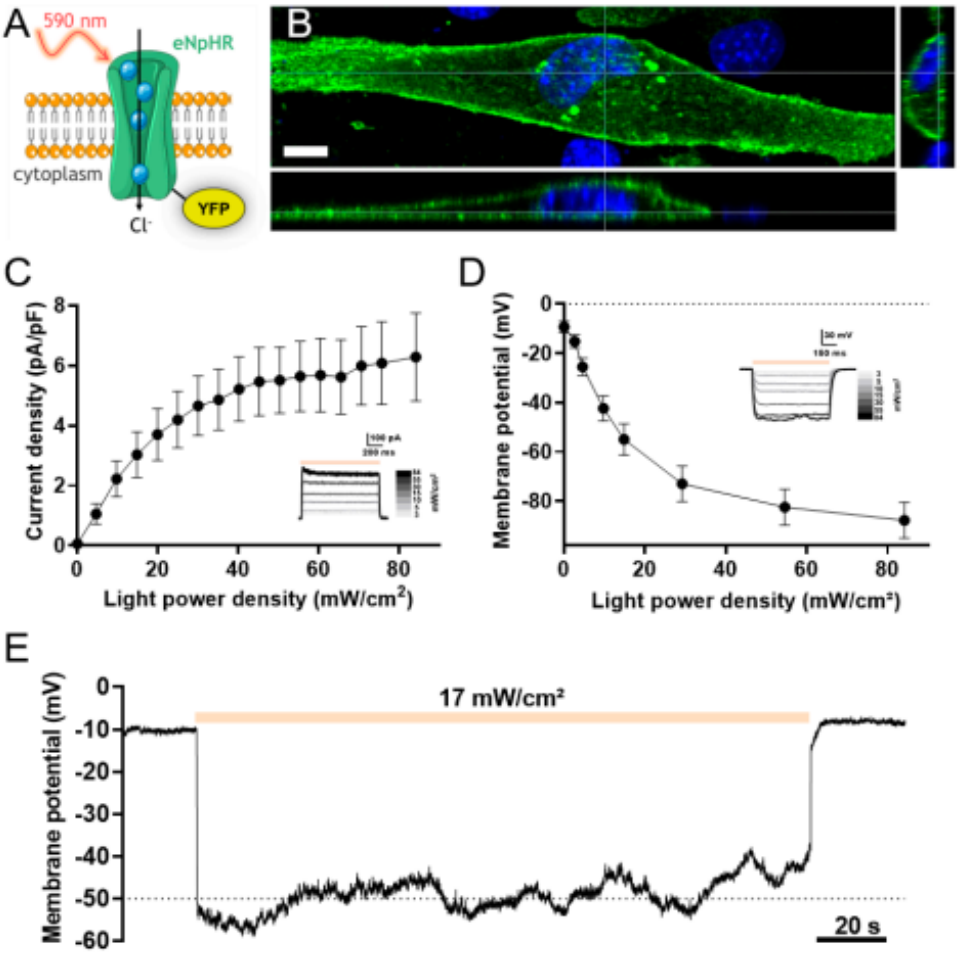


Figure 1. Effect of light-induced activation of the halorhopsin pump on membrane polarization of C2C12 myoblasts (**A**) Schematic representation of the light-activated chloride pump eNpHR coupled to yellow fluorescent protein (YFP). (**B**) 3D expression of eNpHR in C2C12 myoblast. YFP fluorescence highlights the cellular localization of eNpHR. Right and lower panels represent cross-sections of the myoblast (scale bar: 10 µm). (**C**) Relationship between photocurrent density and light power density. Outward eNpHR currents were recorded at a holding potential of −15 mV during a 1 s light pulse at different light intensities. The inset shows representative raw data traces recorded in response to incremental variations in light intensities (mean ± SEM, n = 29). (**D**) Membrane potential as a function of light power density. Membrane potentials were recorded in the current-clamp configuration (I = 0) during 1 s light pulses at different intensities. Inset shows representative traces of membrane potential modulation by light stimulation in an eNpHR-expressing myoblast (mean ± SEM, n = 36). (**E**) Effect of long-duration light stimulation at 17 mW/cm^2 (orange bar) on membrane potential of an eNpHR-expressing myoblast.

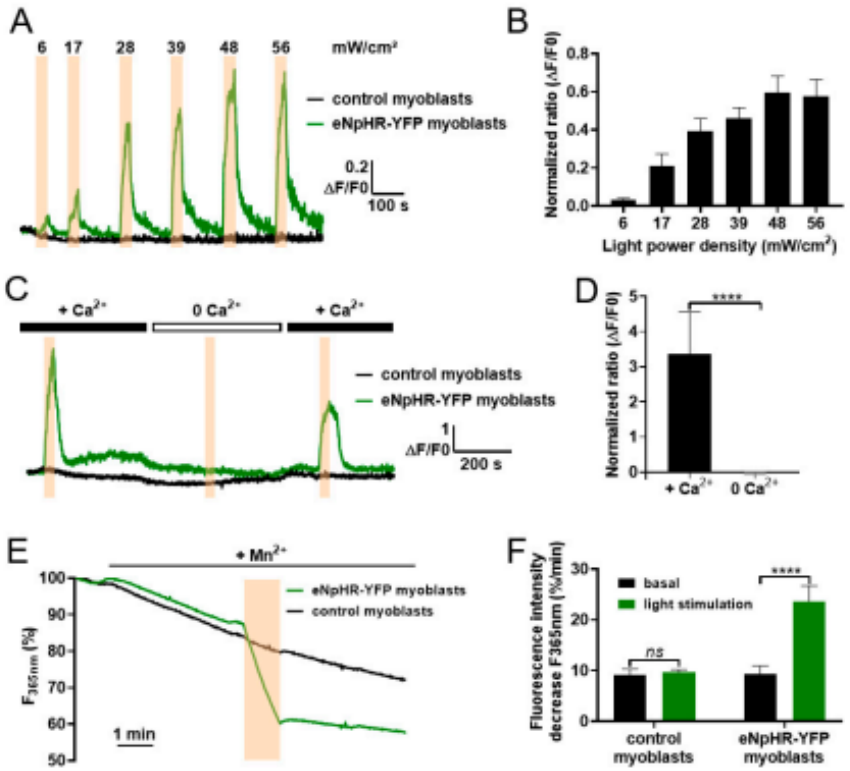


Figure 2. Constitutive calcium entry controlled by light stimulation of eNpHR-expressing C2C12 myoblasts. (**A**) Representative raw data traces of normalized Fura-2 fluorescence ratio at several light intensities (6, 17, 28, 39, 48, 56 mW/cm^2, duration: 30 s, represented by orange bars) in control C2C12 myoblasts (black) and eNpHR-expressing C2C12 myoblasts (green). (**B**) Maximum amplitude (ΔF/F0) of the normalized Fura-2 fluorescence response during light stimulations of variable intensity in eNpHR-expressing C2C12 myoblasts (mean ± SEM, $n = 31$, $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test). (**C**) Representative traces of normalized Fura-2 fluorescence ratio during light stimulations (duration: 30 s, 48 mW/cm^2, orange bars) in control C2C12 myoblasts (black) and eNpHR-expressing C2C12 myoblasts (green) perfused with Tyrode's solution containing 1.8 mM Ca^{2+} or 0 mM Ca^{2+}. (**D**) Amplitude (ΔF/F0) of the normalized Fura-2 fluorescence response to light stimulation of eNpHR-expressing myoblasts perfused with Tyrode's solution containing 1.8 mM Ca^{2+} or 0 mM Ca^{2+} (mean ± SEM, $n = 10$, $p < 0.0001$, Mann–Whitney test). (**E**) Representative traces showing Mn^{2+} quenching (100 μM) of Fura-2 fluorescence recorded in control C2C12 myoblasts (gray) and eNpHR-expressing C2C12 myoblasts (green). Cells were stimulated with light (orange bar) for 1 minute at 48 mW/cm^2. (**F**) Quantitative analysis of the maximum rate of Mn^{2+} quenching (%/min) before light stimulation (dark histograms) and during light stimulation at 48 mW/cm^2 (green histograms) in control C2C12 myoblasts and eNpHR-expressing C2C12 myoblasts (mean ± SEM, control myoblasts n = 27; eNpHR myoblasts n = 26, $p < 0.0001$, Mann–Whitney test).

3.3. *Expression of TRPV2 Channels in C2C12 Myoblasts*

Polarization-dependent calcium elevation could require the activation of different types of calcium-permeable ion channels. To this end, calcium entry has been shown to occur in human skeletal myoblasts via T-type calcium channel window currents [7]. However, this hypothesis is unlikely in C2C12 myoblasts since it has been shown that these channels are not expressed in rat and mouse myoblasts [38,39]. In addition, patch clamp experiments on C2C12 myoblasts did not reveal the presence of any voltage-dependent calcium currents (15 tested cells; data not shown). A second possibility could be the potentiation of CCE through TRP channels. Indeed, the presence of transient

receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) [33], transient receptor potential melastatin channel 7 (TRPM7) and transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) [35] channel activity was shown in skeletal muscle myoblasts, with these channels controlling processes such as cell migration or cellular fusion [33,40]. Of note, TRP channels have been shown to mediate CCE in different systems [5]. To determine the molecular player(s) potentially involved in C2C12 light-driven calcium entry, we used RT-PCR to detect the possible expression of different TRP channels in these cells. In this way, TRPC1, TRPV2, TRPV4 and TRPM7 transcripts were detected in our cell model, while no signal for TRPC4 was found (Figure 3A and Figure S1). Of the expressed channel transcripts, the properties of TRPV2 [14,36] render it a good candidate to be mediating light-induced calcium entry. The expression and localization of TRPV2 channels in C2C12 myoblasts were further investigated in western-blot experiments, with TRPV2 channel proteins detected at a molecular weight around 97 kDa (Figure 3B). As a control, HEK cells stably expressing mouse TRPV2 were used; these showed a specific band at 86 kDa, which was absent in control HEK cells (Figure 3B). The difference in molecular weight (97 kDa vs. 86 kDa) could be due to differences in glycosylation patterns as previously demonstrated in other cell models [41–43]. As it was shown that proper trafficking of TRPV2 to the plasma membrane is required for it to control CCE [41], we also performed immunocytochemistry staining. These experiments confirmed the presence of endogenous TRPV2 channels located in the plasma membrane of C2C12 myoblasts under normal growth conditions (Figure 3C).

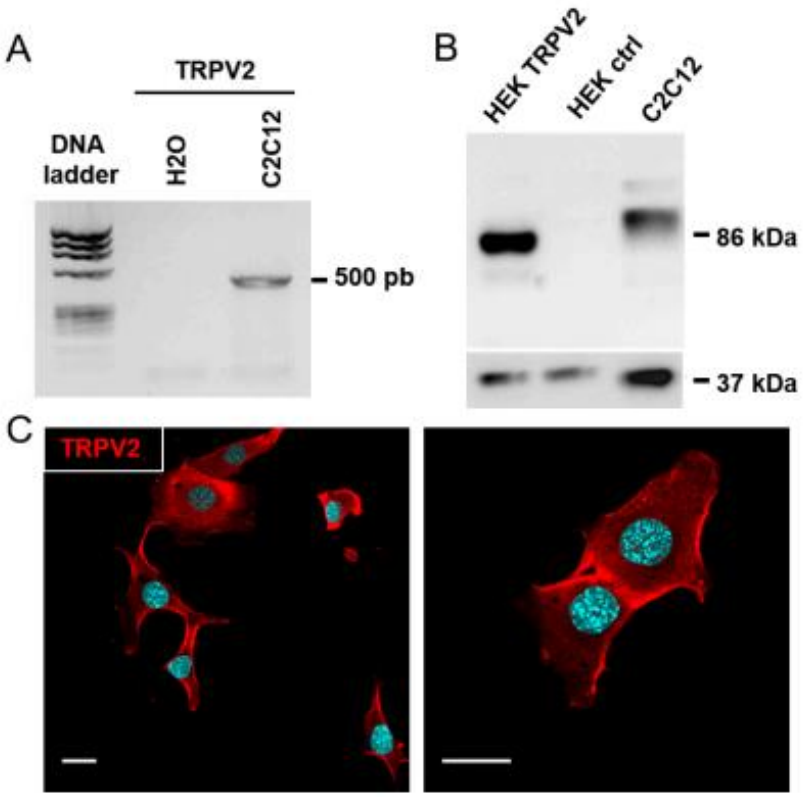


Figure 3. Expression of transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) channels in C2C12 myoblasts. (**A**) Assessment of TRPV2 mRNA expression in C2C12 myoblasts by RT-PCR. (**B**) Western blot analysis of TRPV2 and GAPDH expression in C2C12 myoblasts, human embryonic kidney (HEK)293 cells stably expressing TRPV2 (HEK TRPV2), and control HEK293 cells (HEK ctrl). TRPV2 and GAPDH were detected sequentially on the same blot (stripped twice). 5 µg of proteins were deposited for HEK cell lysates and 10 µg for C2C12 myoblasts ($n = 4$). (**C**) Confocal images at two magnifications showing immuno-localization of TRPV2 (red) and nuclei staining (blue) in C2C12 myoblasts (scale bar: 20 µm).

3.4. Involvement of TRPV2 in Calcium Response to Optical Stimulation

We subsequently focused our attention on TRPV2 since this channel is a well-known player in CCE, is expressed in various cellular systems, and has a relatively well developed panel of pharmacological and molecular tools available to block its activity such as Tranilast [44–47] or dominant-negative mutants [36,48,49], respectively. To determine the role of TRPV2 channels in the light-induced calcium response (Figure 4), variations in Fura-2 fluorescence during light stimulation were monitored in C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP and treated with either the DMSO vehicle as control or 100 µM Tranilast to block TRPV2 activity. Interestingly, exposure to Tranilast interfered with the light-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in C2C12 myoblasts (Figure 4A), leading to a 77% reduction in the peak level of the control Ca^{2+} transient (Figure 4B). Tranilast is considered to be the most specific, commercially available TRPV2 inhibitor; however, the possibility of other molecular targets being implicated in its action cannot be ruled out. To confirm the implication of TRPV2 channels in the light stimulation response, eNpHR-expressing C2C12 myoblasts were co-transfected with a plasmid encoding a Flag-tagged TRPV2 channel bearing the E594K mutation conferring a dominant-negative activity [48]. As shown in Figure 4C, most cells overexpressing eNpHR-YFP also co-expressed TRPV2[E594K] mutant channels (Figure 4C). To examine the impact of TRPV2[E594K] expression on the light-induced calcium response, we monitored the variation in Fura-2 fluorescence during light stimulation in myoblasts expressing eNpHR-YFP alone or co-transfected with the dominant-negative mutant. A decrease of 55% in the peak amplitude of the Ca^{2+} transient (Figure 4D) was observed in cells expressing the TRPV2[E594K] mutant compared to control cells (Figure 4E). These results are indicative of a strong contribution of TRPV2 channels to the light-induced calcium entry seen in C2C12 myoblasts.

3.5. Optogenetic Control of TRPV2-Dependent C2C12 Myoblast Migration

We next considered whether the light-induced control of $[Ca^{2+}]_i$ could be used as a tool to fine-tune calcium-dependent physiological processes. Depending on the cellular context, involvement of the TRPV2 channel is thought to play a role in different physiological and pathological processes through the control of cell adhesion, proliferation, migration or invasion [5,43,50]. Here, we determined if TRPV2 regulates C2C12 myoblast migration and, if so, how this process could be modified by the light stimulation technique. Compared to control (0.412 ± 0.011 µm/min, $n = 432$) and DMSO-treated (0.426 ± 0.017 µm/min, $n = 180$) C2C12 myoblasts, basal cell migration was significantly decreased in C2C12 myoblasts expressing the TRPV2[E594K] mutant (0.318 ± 0.011 µm/min, $n = 290$, $p < 0.0001$), treated with 100 µM Tranilast (0.311 ± 0.009 µm/min, $n = 285$, $p < 0.001$), or both expressing TRPV2[E594K] and treated with 100 µM Tranilast (0.299 ± 0.017 µm/min, $n = 89$, $n < 0.001$). It should be mentioned that no significant differences were observed between control and DMSO-treated C2C12 myoblasts (Figure 5A). These results thus demonstrate that TRPV2 is involved in the migration of C2C12 myoblasts. To investigate the impact of light stimulation on the migratory behavior of TRPV2-expressing C2C12 myoblasts, we exposed cells expressing eNpHR-YFP to a continuous light stimulation (590 nm; 17 mW/cm^2) and tracked their movement.

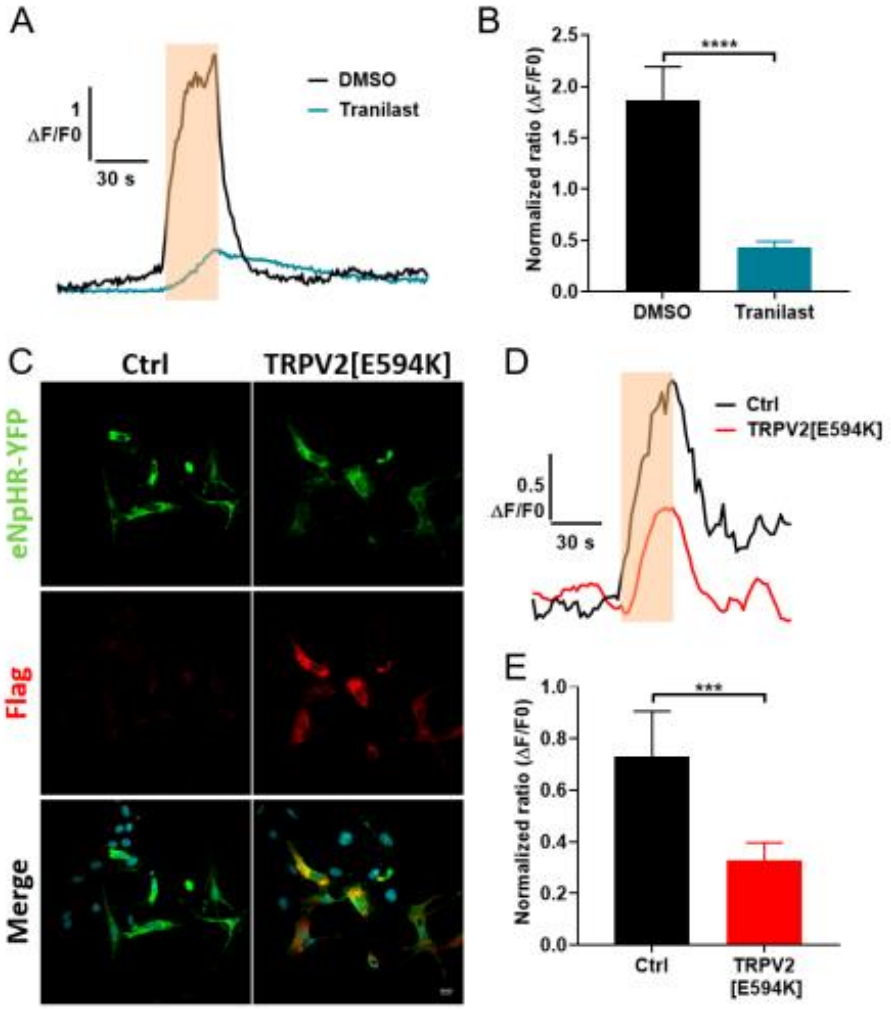


Figure 4. Involvement of TRPV2 channels in the mediation of constitutive calcium entry during light stimulation. (**A**) Representative traces of Fura-2 normalized ratio in response to a light stimulation of 30 s at 48 mW/cm^2 (orange rectangle) in C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP treated with DMSO 1/1000 (vehicle) or with 100 µM Tranilast, a TRPV2 inhibitor. (**B**) Maximum amplitude (ΔF/F0) of the Fura-2 fluorescence response to light stimulation in eNpHR-expressing C2C12 myoblasts treated with DMSO 1/1000 (n =4 0) or with 100 µM Tranilast (n = 45). (**C**) Confocal images showing immuno-expression of the negative-dominant TRPV2[E594K] tagged with a flag sequence (red) co-transfected (TRPV2[E594K] right panels) or not (Ctrl, left panel) with eNpHR-YFP (green) in C2C12 myoblasts. (**D**) Representative traces of normalized Fura-2 ratio during a light stimulation of 30 s at 48 mW/cm^2 (orange rectangle) in C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP co-transfected (TRPV2[E594K]) or not (Ctrl) with the negative-dominant TRPV2[E594K]. (**E**) Maximum amplitude (ΔF/F0) of the Fura-2 fluorescence response to light stimulation in control C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP (Ctrl, n = 31) or in C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP co-transfected with negative-dominant TRPV2[E594K] (TRPV2[E594K], n = 102). Data are presented as mean ± SEM. *** and **** represent significant differences with $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively (Mann–Whitney test).

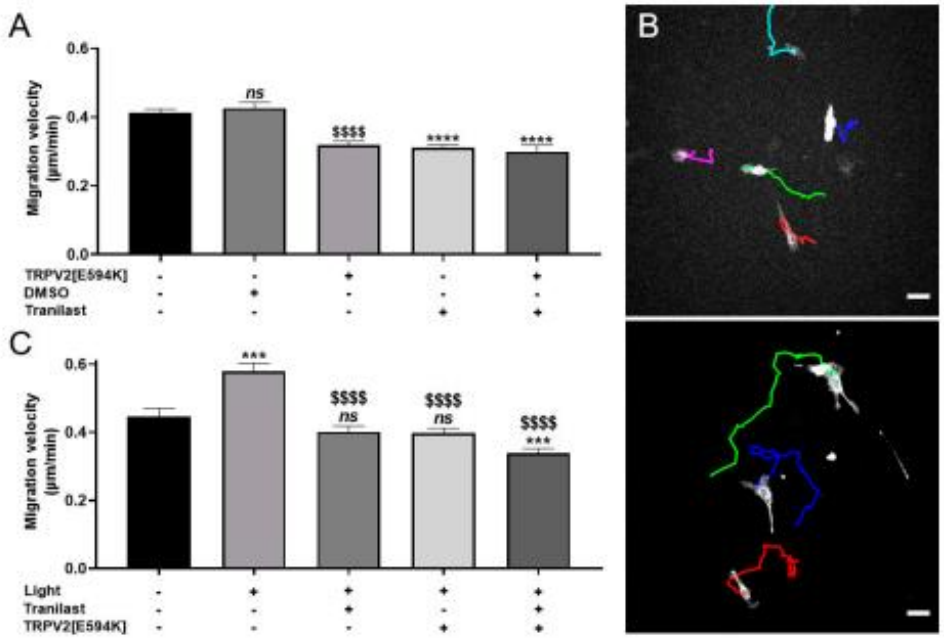


Figure 5. Light stimulation promotes cell migration mediated by TRPV2 in C2C12 myoblasts expressing eNpHR. (**A**) The role of TRPV2 channels in cell migration was evaluated with a cell migration tracking assay on C2C12 myoblasts expressing eNpHR. Cells were seeded at low density and the migration velocity (µm/min) was assessed for 15 h with a JuliStage system. C2C12 myoblast migration was evaluated for five conditions: without treatment (n = 432), co-transfected with TRPV2[E594K] (n = 290), treated with DMSO 1/1000 (n = 180), treated with 100 µM Tranilast (n = 285), and co-transfected with TRPV2[E594K] plus treated with 100 µM Tranilast (n = 89) ($ corresponds to the comparison with C2C12 myoblasts without treatment, * corresponds to the comparison with C2C12 myoblasts treated with DMSO 1/1000) ($$$$ and ****: $p < 0.0001$, Mann–Whitney test). (**B**) Cell trajectories of eNpHR-YFP-expressing C2C12 myoblasts (white cells) that were unstimulated (upper panel) or stimulated (lower panel) by light. Scale bar: 60 µm. (**C**) Effect of light stimulation on cell migration investigated by cell migration assay on C2C12 myoblasts expressing eNpHR-YFP. Cells were seeded at low density and the migration velocity (µm/min) was assessed for 15 h on C2C12 myoblasts in five conditions: unstimulated (n=115) or stimulated with light without treatment (n = 125), treated with 100 µM Tranilast (n = 133), co-transfected with TRPV2[E594K] (n = 162), or co-transfected with TRPV2[E594K] and treated with 100 µM Tranilast (n=163). $ corresponds to the comparison with C2C12 myoblasts stimulated by light, * and ns corresponds to the comparison with unstimulated C2C12 myoblasts. Data are shown as mean ± SEM (***: $p < 0.001$; $$$: $p < 0.0001$, Mann–Whitney test).

Light-stimulated C2C12 myoblasts migrated faster compared to unstimulated cells (Figure 5B). Indeed, whereas control cells migrated at a velocity of 0.446 ± 0.023 µm/min (n = 115), the light-stimulated C2C12 myoblasts moved at 0.579 ± 0.024 µm/min (n = 125, $p < 0.001$). This effect was inhibited when cells were co-transfected with the dominant-negative mutant of TRPV2 (0.398 ± 0.014 µm/min, n = 162), when cells were treated with 100 µM Tranilast (0.400 ± 0.017 µm/min, n = 133), or when they were concomitantly transfected with the dominant-negative mutant and treated with 100 µM Tranilast (0.339 ± 0.013 µm/min, n = 163). Note that this last condition decreased the migratory velocity to values significantly lower than the control value obtained in the absence of illumination ($p < 0.001$) (Figure 5C). These data thus clearly demonstrate that the optogenetic polarization of C2C12 cells via the halorhodopsin pump increases their migratory properties through a TRPV2-dependent pathway.

4. Discussion

Subtle but durable changes in the resting $[Ca^{2+}]_i$ have an impact on the cell phenotype and can be seen as signaling events per se. As CCE is an important factor determining $[Ca^{2+}]_i$, the former's modulation provides an important mechanism to alter cellular physiological processes such as cellular proliferation, migration and differentiation. Depending on the cellular model, CCE has been correlated to the expression of several ion channels, among which members of the TRP channel family seem to play a central role. Studies often investigate CCE-dependent roles by using pharmacological approaches to modulate the activity of these channels and to look at the subsequent impact on cellular properties such as migration or proliferation. However, the use of such molecules does not allow for fine spatio-temporal control to be achieved over CCE. Side effects on calcium homeostasis and cellular behavior can also result from off-target effects on other pathways. Other investigations have addressed the role of CCE by modulating membrane potential via the pharmacological inhibition of ion channels such as volume-regulated anion channels (VRAC), large-conductance calcium-activated potassium channels (BKCa) or intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (IKCa) [11,14,16]. These approaches have the advantage that they decrease the driving force for calcium entry and modulate CCE. However, they also have drawbacks in that they prevent the membrane potential from being tightly controlled and limit any spatial or temporal resolution of this parameter. Indeed, investigating the impact of CCE on cell behavior using these different strategies necessitates incubating cells with drugs that necessarily impact on all cells within the culture and prevent the targeting of specific cells or subcellular areas. The possibility to study the impact of membrane potential variations on CCE and cell behavior is also limited. In this context, our work achieves a significant technical advance by establishing an easy, accessible and tunable way to precisely control CCE by modulating the calcium driving force via activation of the halorhodopsin pump. Given the light activation properties of halorhodopsin, this new and innovative approach enables CCE to be controlled with a strong spatial and temporal resolution. This in turn opens new possibilities for the study of cellular behaviors such as cell migration associated with the modulation of calcium entry.

Optogenetics was originally developed to control membrane potential and thus stimulate or inhibit cellular excitability [26,28,51]. More specifically, the halorhodopsin pump was first used to block action potential generation by polarizing neurons with 590 nm light, an approach that required a light power density in the mW/mm^2 order of magnitude [28]. Surprisingly, lower light power densities (in the mW/cm^2 range) were sufficient to induce a strong membrane polarization of up to 100 mV in our C2C12 model. This discrepancy could be explained by several factors such as different halorhodopsin expression levels in different cell models, or that C2C12 cells are non-excitable and display a poorly polarized (around −10 mV) resting membrane potential. Non-excitable cells often display a small background conductance as opposed to polarized cells that harbor a background potassium conductance. In accordance with Ohm's law, this larger basal membrane resistance should lead to a stronger impact of small currents on variations in membrane potential. As a consequence, small halorhodopsin-mediated currents would have a strong impact on membrane polarization. These differences between excitable and non-excitable cell models are important because they infer that halorhodopsin is well adapted for a use in non-excitable cells and represents a powerful tool to achieve membrane polarization.

In our study, we showed that an escalating membrane polarization could be achieved by incrementing light intensity, and that this was associated with an increase in calcium driving force, leading to a concomitant increase in calcium entry. $[Ca^{2+}]_i$ increased over the duration of the stimulation and decreased progressively when the light stimulation was switched off. This point is particularly interesting since it clearly shows that illumination provides a tight and reversible control over CCE at previously unattainable levels in terms of amplitude and temporal resolution. By removing the extracellular calcium, or replacing it with manganese, we were able to show that the light-stimulated increase in $[Ca^{2+}]_i$ was a consequence of extracellular calcium entry into the cells via constitutively open channels. In the literature, CCE has been related to Orai and TRP channels; some of these

channels are constitutively open and are associated with a range of cellular processes as well as cancer formation [5,52]. We therefore sought to characterize the molecular identity of the channels involved in CCE in our cell model. Previous studies have identified Orai [53] and TRP channels such as TRPC1 [33], TRPM7 and TRPV2 [35] as being expressed in the C2C12 cell line. All of these channel types could participate in CCE, but our results revealed a strong expression of TRPV2 channels in the plasma membrane. Since the TRPV2 inhibitor Tranilast and the negative-dominant TRPV2[E594K] inhibited an important part of the light-induced CCE, TRPV2 seems to be the main player involved in this light-induced calcium entry. Nevertheless, since a small part of calcium entry remained after the Tranilast treatment or TRPV2[E594K] expression, it is possible that other channels such as TRPC1 and Orai could also participate in light-induced CCE, but to a lesser extent. Moreover, it is not excluded that a calcium-induced calcium release (CIRC) mechanism takes part in light-induced calcium elevation. It is well described that an increase in intracellular calcium can activate CICR through ryanodine receptors (RyR) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3R). In our experiments (Figure 2C), the amplitude of the light-induced calcium response was lower after the perfusion of the free calcium solution compared to the first stimulation. This could be the consequence of a lower level of calcium in intracellular stock compared to the first stimulation.

Cell migration is an important cellular function involved in numerous physiological and pathological processes [54]. It is regulated by multiple calcium-dependent pathways impacting on cytoskeletal remodeling, modulation of focal adhesion or cell contraction [55–58]. In this way, CCE-dependent resting calcium levels directly affect the motile behavior of the cell [52,59,60]. This relationship has been well described in cancer where CCE is often deregulated and associated with an increase in cell migration [52]. TRPV2 was reported to be involved in this process in many cellular models such as PC-3 [43,50] and LNCaP [61] cancer cell lines where it increases their migration properties. TRPV2's translocation to the plasma membrane and its association with BKCa also increased MDA-MB-435s cell migration [14]. TRPV2 has previously been described in C2C12 cells [35], but its implication in cell migration and differentiation has not been reported. Our study demonstrates for the first time that this channel plays an important role in the migration of C2C12 cells.

TRPV2's involvement in the light-induced calcium increase and its function in C2C12 migration prompted us to test whether halorhodopsin-mediated stimulations could impact cell migration properties. Our results showed that light-induced CCE increased cell migration and that this effect was strongly reduced following TRPV2 inhibition. This revealed the role of TRPV2 in myoblast migration and confirmed that halorhodopsin pump activation can be used to control CCE to modulate specific aspects of cell behavior. Hence, our study shows for the first time that halorhodopsin could serve as a powerful tool to modulate membrane polarization and thus CCE, thereby enabling the controlled manipulation of non-excitable cell physiological responses such as cell motility (Figure 6).

In conclusion, our optogenetic approach appears well adapted for the study of calcium responses induced by fast membrane polarization. It also offers the advantage of a strong spatial and temporal control of the membrane potential. In a previous study, we showed that targeted optogenetic activation of ChR2 at a subcellular level can modulate calcium homeostasis [24]. By applying a similar strategy of stimulations to small membrane areas, the spatial restriction of halorhodopsin activation could be achieved to increase local constitutive calcium entry at specific cellular sites, such as podosomes, lamellipodia or pseudopodia, where calcium entry through TRP channels interacts with cytoskeletal remodeling processes [14,60,62]. Indeed, several studies have shown that the subcellular localization of TRP channels could be important for cellular processes such as migration. As an example, TRPC6 was shown to colocalize with BKCa in podocytes, with TRPC6 possibly serving as calcium source for BKCa activation [10]. Similarly, Gambade and colleagues showed that the translocation of TRPV2 to pseudopodia induced calcium entry and increased cancer cell migration [14]. Therefore, our halorhodopsin-based approach could provide crucial information on the role of such calcium entry in specific cellular microdomains. Using the halorhodopsin optogenetic approach in non-excitable cells could also provide new opportunities to investigate the impact of different membrane polarization

patterns on cell behavior in cell culture. Indeed, while non-excitable cells are known to display membrane potential oscillations during different cellular processes [8,9], the impact of these oscillations on the cell phenotype remains poorly understood. The high temporal resolution for the control of membrane polarization and associated CCE obtained with halorhodopsin-mediated stimulation should render this kind of investigation more feasible. Besides, progressive membrane polarization occurs during the initiation of the myoblast fusion process leading to an increase in intracellular calcium [7]. The approach described in our study could be helpful to study myogenesis by mimicking the progressive membrane polarization observed in the physiological condition using for example, a slow ramp of light. Finally, our approach provides an easy way to simultaneously augment and monitor CCE and could therefore provide an interesting and powerful method for the screening of pharmacological agents that modulate CCE.

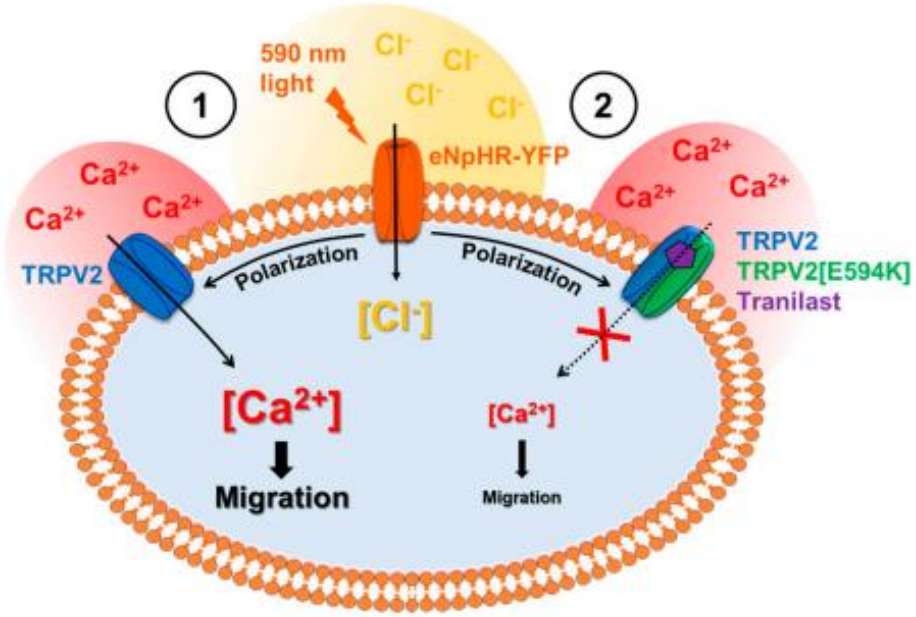


Figure 6. Schematic model of the effect of light-induced activation of halorhodopsin pump on the activation of calcium constitutive entry pathway through TRPV2 channels and on the modulation of cell migration. (**1**) Light stimulation of C2C12 myoblasts expressing eNpHR (orange) leads to membrane polarization by chloride ion entry (yellow) which gives rise to constitutive calcium entry (red) through TRPV2 channel (blue) by increasing the driving force for Ca^{2+} across the plasma membrane. This light-induced calcium entry increases cell migration in a manner that can be abolished (**2**) by the TRPV2 inhibitor Tranilast (purple) and the negative-dominant TRPV2[E594K] transcript (green).

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1684/s1. Figure S1. Expression of different TRP channel mRNAs in C2C12 myoblasts using standard RT-PCR.

Author Contributions: Conceptualization and supervision of the research: A.C.; Designed the experiments: C.-A.C.-B., G.L., V.T., A.P., C.M., P.B., S.S. and A.C.; Performed the experiments: C.-A.C.-B., G.L., C.J., M.L., C.M., V.T., and A.C.; Analysis and interpretation of the data: C.-A.C.-B., G.L., C.J., M.L., A.P., C.M., S.S. and A.C.; Writing—original draft: C.-A.C.-B. and A.C.; Writing—review and editing: C.-A.C.-B., G.L., A.P., C.M., V.T., P.B., S.S. and A.C.; Funding acquisition: A.P., P.B. and A.C. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This work was supported by AFM-TELETHON (grant n°19611). C.A Chapotte-Baldacci PhD thesis is supported by Région Poitou-Charentes and G. Lizot PhD thesis is supported by FRM (grant n°DPC20171138946). A. Penna and M. Lévêque's research was funded by the Région Nouvelle Aquitaine (Chaire Universitaire Canaux Calciques et Mélanome), M. Lévêque received support by "sport&collection" and la ligue contre le cancer (comité 86).

Acknowledgments: This work has benefited from the facilities and expertise of ImageUP platform (University of Poitiers) and the technical assistance of Anne Cantereau and Claudine Combes.

Conflicts of Interest: The authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517–529. [CrossRef] [PubMed]
2. Tutdibi, O.; Brinkmeier, H.; Rüdel, R.; Föhr, K.J. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J. Physiol.* **1999**, *515*, 859–868. [CrossRef] [PubMed]
3. Sabourin, J.; Lamiche, C.; Vandebrouck, A.; Magaud, C.; Rivet, J.; Cognard, C.; Bourmeyster, N.; Constantin, B. Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an alpha1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36248–36261. [CrossRef] [PubMed]
4. Aguettaz, E.; Lopez, J.J.; Krzesiak, A.; Lipskaia, L.; Adnot, S.; Hajjar, R.J.; Cognard, C.; Constantin, B.; Sebille, S. Axial stretch-dependent cation entry in dystrophic cardiomyopathy: Involvement of several TRPs channels. *Cell Calcium* **2016**, *59*, 145–155. [CrossRef] [PubMed]
5. Mignen, O.; Constantin, B.; Potier-Cartereau, M.; Penna, A.; Gautier, M.; Guéguinou, M.; Renaudineau, Y.; Shoji, K.; Félix, R.; Bayet, E.; et al. Constitutive calcium entry and cancer: Updated views and insights. *Eur. Biophys. J.* **2017**, *46*, 395–413. [CrossRef]
6. Yang, M.; Brackenbury, W.J. Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol* **2013**, *4*, 185. [CrossRef]
7. Bernheim, L.; Bader, C.R. Human myoblast differentiation: Ca(2+) channels are activated by K(+) channels. *News Physiol. Sci.* **2002**, *17*, 22–26. [CrossRef]
8. Blackiston, D.J.; McLaughlin, K.A.; Levin, M. Bioelectric controls of cell proliferation. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 3519–3528. [CrossRef]
9. Sundelacruz, S.; Levin, M.; Kaplan, D.L. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev. Rep.* **2009**, *5*, 231–246. [CrossRef]
10. Kim, E.Y.; Alvarez-Baron, C.P.; Dryer, S.E. Canonical transient receptor potential channel (TRPC)3 and TRPC6 associate with large-conductance Ca^{2+}-activated K^+ (BKCa) channels: Role in BKCa trafficking to the surface of cultured podocytes. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 466–477. [CrossRef]
11. Lallet-Daher, H.; Roudbaraki, M.; Bavencoffe, A.; Mariot, P.; Gackière, F.; Bidaux, G.; Urbain, R.; Gosset, P.; Delcourt, P.; Fleurisse, L.; et al. Intermediate-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels (IK Ca1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* **2009**, *28*, 1792–1806. [CrossRef] [PubMed]
12. Chantôme, A.; Potier-Cartereau, M.; Clarysse, L.; Fromont, G.; Marionneau-Lambot, S.; Guéguinou, M.; Pagès, J.-C.; Collin, C.; Oullier, T.; Girault, A.; et al. Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4852–4861. [CrossRef] [PubMed]
13. Guéguinou, M.; Chantôme, A.; Fromont, G.; Bougnoux, P.; Vandier, C.; Potier-Cartereau, M. KCa and Ca(2+) channels: The complex thought. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2322–2333. [CrossRef] [PubMed]
14. Gambade, A.; Zreika, S.; Guéguinou, M.; Chourpa, I.; Fromont, G.; Bouchet, A.M.; Burlaud-Gaillard, J.; Potier-Cartereau, M.; Roger, S.; Aucagne, V.; et al. Activation of TRPV2 and BKCa channels by the LL-37 enantiomers stimulates calcium entry and migration of cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23785–23800. [CrossRef]
15. Payne, S.L.; Levin, M.; Oudin, M.J. Bioelectric control of metastasis in solid tumors. *Bioelectricity* **2019**, *1*, 114–130. [CrossRef]
16. Chen, L.; Becker, T.M.; Koch, U.; Stauber, T. The LRRC8/VRAC anion channel facilitates myogenic differentiation of murine myoblasts by promoting membrane hyperpolarization. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 14279–14288. [CrossRef]
17. Hu, H.-Z.; Gu, Q.; Wang, C.; Colton, C.K.; Tang, J.; Kinoshita-Kawada, M.; Lee, L.-Y.; Wood, J.D.; Zhu, M.X. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35741–35748. [CrossRef]

18. Blair, N.T.; Carvacho, I.; Chaudhuri, D.; Clapham, D.E.; DeCaen, P.; Delling, M.; Doerner, J.F.; Fan, L.; Ha, K.; Jordt, S.E.; et al. Transient receptor potential channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. Pharmacol. CITE* **2019**, *2019*. [CrossRef]
19. Boyden, E.S.; Zhang, F.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 1263–1268. [CrossRef]
20. Jia, Z.; Valiunas, V.; Lu, Z.; Bien, H.; Liu, H.; Wang, H.-Z.; Rosati, B.; Brink, P.R.; Cohen, I.S.; Entcheva, E. Stimulating cardiac muscle by light: Cardiac optogenetics by cell delivery. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* **2011**, *4*, 753–760. [CrossRef]
21. Bruegmann, T.; Boyle, P.M.; Vogt, C.C.; Karathanos, T.V.; Arevalo, H.J.; Fleischmann, B.K.; Trayanova, N.A.; Sasse, P. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 3894–3904. [CrossRef] [PubMed]
22. Bruegmann, T.; van Bremen, T.; Vogt, C.C.; Send, T.; Fleischmann, B.K.; Sasse, P. Optogenetic control of contractile function in skeletal muscle. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7153. [CrossRef] [PubMed]
23. Asano, T.; Ishizuka, T.; Morishima, K.; Yawo, H. Optogenetic induction of contractile ability in immature C2C12 myotubes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
24. Sebille, S.; Ayad, O.; Chapotte-Baldacci, C.-A.; Cognard, C.; Bois, P.; Chatelier, A. Optogenetic approach for targeted activation of global calcium transients in differentiated C2C12 myotubes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11108. [CrossRef]
25. Schobert, B.; Lanyi, J.K. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10306–10313. [PubMed]
26. Zhang, F.; Wang, L.-P.; Brauner, M.; Liewald, J.F.; Kay, K.; Watzke, N.; Wood, P.G.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Gottschalk, A.; et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **2007**, *446*, 633–639. [CrossRef]
27. Gradinaru, V.; Thompson, K.R.; Deisseroth, K. ENpHR: A Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol.* **2008**, *36*, 129–139. [CrossRef]
28. Gradinaru, V.; Zhang, F.; Ramakrishnan, C.; Mattis, J.; Prakash, R.; Diester, I.; Goshen, I.; Thompson, K.R.; Deisseroth, K. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* **2010**, *141*, 154–165. [CrossRef]
29. Wiegert, J.S.; Mahn, M.; Prigge, M.; Printz, Y.; Yizhar, O. Silencing neurons: Tools, applications, and experimental constraints. *Neuron* **2017**, *95*, 504–529. [CrossRef]
30. Fioretti, B.; Pietrangelo, T.; Catacuzzeno, L.; Franciolini, F. Intermediate-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel is expressed in C2C12 myoblasts and is downregulated during myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2005**, *289*, C89–C96. [CrossRef]
31. Leem, Y.-E.; Jeong, H.-J.; Kim, H.-J.; Koh, J.; Kang, K.; Bae, G.-U.; Cho, H.; Kang, J.-S. Cdo Regulates Surface Expression of Kir2.1 K^+ Channel in Myoblast Differentiation. *PLoS ONE* **2016**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
32. Kunert-Keil, C.; Bisping, F.; Krüger, J.; Brinkmeier, H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 159. [CrossRef] [PubMed]
33. Louis, M.; Zanou, N.; Schoor, M.V.; Gailly, P. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 3951–3959. [CrossRef] [PubMed]
34. Formigli, L.; Sassoli, C.; Squecco, R.; Bini, F.; Martinesi, M.; Chellini, F.; Luciani, G.; Sbrana, F.; Zecchi-Orlandini, S.; Francini, F.; et al. Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1322–1333. [CrossRef]
35. Kurth, F.; Franco-Obregón, A.; Casarosa, M.; Küster, S.K.; Wuertz-Kozak, K.; Dittrich, P.S. Transient receptor potential vanilloid 2-mediated shear-stress responses in C2C12 myoblasts are regulated by serum and extracellular matrix. *FASEB J.* **2015**, *29*, 4726–4737. [CrossRef]
36. Penna, A.; Juvin, V.; Chemin, J.; Compan, V.; Monet, M.; Rassendren, F.-A. PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell Calcium* **2006**, *39*, 495–507. [CrossRef]
37. Zechel, S.; Werner, S.; Halbach, O.V.B.U. Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res.* **2007**, *328*, 651–656. [CrossRef]
38. Constantin, B.; Cognard, C.; Raymond, G. Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. *Cell Calcium* **1996**, *19*, 365–374. [CrossRef]

39. Bidaud, I.; Monteil, A.; Nargeot, J.; Lory, P. Properties and role of voltage-dependent calcium channels during mouse skeletal muscle differentiation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2006**, *27*, 75–81. [CrossRef]
40. Antigny, F.; Sabourin, J.; Saüc, S.; Bernheim, L.; Koenig, S.; Frieden, M. TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca^{2+} release in human myotubes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 806–813. [CrossRef] [PubMed]
41. Kanzaki, M.; Zhang, Y.-Q.; Mashima, H.; Li, L.; Shibata, H.; Kojima, I. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 165–170. [CrossRef] [PubMed]
42. Jahnel, R.; Bender, O.; Münter, L.M.; Dreger, M.; Gillen, C.; Hucho, F. Dual expression of mouse and rat VRL-1 in the dorsal root ganglion derived cell line F-11 and biochemical analysis of VRL-1 after heterologous expression. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4264–4271. [CrossRef] [PubMed]
43. Monet, M.; Gkika, D.; Lehen'kyi, V.; Pourtier, A.; Vanden Abeele, F.; Bidaux, G.; Juvin, V.; Rassendren, F.; Humez, S.; Prevarsakaya, N. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 528–539. [CrossRef]
44. Nie, L.; Oishi, Y.; Doi, I.; Shibata, H.; Kojima, I. Inhibition of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a blocker of Ca(2+)-permeable channel. *Cell Calcium* **1997**, *22*, 75–82. [CrossRef]
45. Hisanaga, E.; Nagasawa, M.; Ueki, K.; Kulkarni, R.N.; Mori, M.; Kojima, I. Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **2009**, *58*, 174–184. [CrossRef] [PubMed]
46. Iwata, Y.; Ohtake, H.; Suzuki, O.; Matsuda, J.; Komamura, K.; Wakabayashi, S. Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *99*, 760–768. [CrossRef]
47. Lévêque, M.; Penna, A.; Trionnaire, S.L.; Belleguic, C.; Desrues, B.; Brinchault, G.; Jouneau, S.; Lagadic-Gossmann, D.; Martin-Chouly, C. Phagocytosis depends on TRPV2-mediated calcium influx and requires TRPV2 in lipids rafts: Alteration in macrophages from patients with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13. [CrossRef]
48. Iwata, Y.; Katanosaka, Y.; Arai, Y.; Shigekawa, M.; Wakabayashi, S. Dominant-negative inhibition of Ca^{2+} influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 824–834. [CrossRef]
49. Cohen, M.R.; Johnson, W.M.; Pilat, J.M.; Kiselar, J.; DeFrancesco-Lisowitz, A.; Zigmond, R.E.; Moiseenkova-Bell, V.Y. Nerve growth factor regulates transient receptor potential vanilloid 2 via extracellular signal-regulated kinase signaling to enhance neurite outgrowth in developing neurons. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 4238–4252. [CrossRef]
50. Oulidi, A.; Bokhobza, A.; Gkika, D.; Vanden Abeele, F.; Lehen'kyi, V.; Ouafik, L.; Mauroy, B.; Prevarskaya, N. TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of prostate and urothelial cancer cell adhesion, migration and invasion. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64885. [CrossRef]
51. Nagel, G.; Brauner, M.; Liewald, J.F.; Adeishvili, N.; Bamberg, E.; Gottschalk, A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 2279–2284. [CrossRef]
52. Canales, J.; Morales, D.; Blanco, C.; Rivas, J.; Díaz, N.; Angelopoulos, I.; Cerda, O. A TR(i)P to cell migration: New roles of TRP channels in mechanotransduction and cancer. *Front. Physiol.* **2019**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
53. Kiviluoto, S.; Decuypere, J.-P.; De Smedt, H.; Missiaen, L.; Parys, J.B.; Bultynck, G. STIM1 as a key regulator for Ca^{2+} homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet. Muscle* **2011**, *1*, 16. [CrossRef] [PubMed]
54. Trepat, X.; Chen, Z.; Jacobson, K. Cell migration. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 2369–2392. [CrossRef]
55. Brundage, R.A.; Fogarty, K.E.; Tuft, R.A.; Fay, F.S. Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* **1991**, *254*, 703–706. [CrossRef] [PubMed]
56. Ridley, A.J.; Schwartz, M.A.; Burridge, K.; Firtel, R.A.; Ginsberg, M.H.; Borisy, G.; Parsons, J.T.; Horwitz, A.R. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* **2003**, *302*, 1704–1709. [CrossRef]
57. Tsai, F.-C.; Meyer, T. Ca^{2+} pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 837–842. [CrossRef]
58. Wei, C.; Wang, X.; Zheng, M.; Cheng, H. Calcium gradients underlying cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 254–261. [CrossRef]
59. Lee, J.; Ishihara, A.; Oxford, G.; Johnson, B.; Jacobson, K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* **1999**, *400*, 382–386. [CrossRef]

60. Wei, C.; Wang, X.; Chen, M.; Ouyang, K.; Song, L.-S.; Cheng, H. Calcium flickers steer cell migration. *Nature* **2009**, *457*, 901–905. [CrossRef]
61. Monet, M.; Lehen'kyi, V.; Gackiere, F.; Firlej, V.; Vandenberghe, M.; Roudbaraki, M.; Gkika, D.; Pourtier, A.; Bidaux, G.; Slomianny, C.; et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1225–1235. [CrossRef] [PubMed]
62. Nagasawa, M.; Kojima, I. Translocation of calcium-permeable TRPV2 channel to the podosome: Its role in the regulation of podosome assembly. *Cell Calcium* **2012**, *51*, 186–193. [CrossRef] [PubMed]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Supplementary material:

Figure S1: Expression of different TRP channel mRNAs in C2C12 myoblasts using standard RT-PCR

