



HAL
open science

Dynamique calcique dans les cardiomyocytes de veines pulmonaires de rat. Une hétérogénéité source d'arythmie ?

Côme Pasqualin

► **To cite this version:**

Côme Pasqualin. Dynamique calcique dans les cardiomyocytes de veines pulmonaires de rat. Une hétérogénéité source d'arythmie ?. Pharmacologie. Université de Tours, 2016. Français. NNT : . tel-02460908

HAL Id: tel-02460908

<https://hal.science/tel-02460908>

Submitted on 3 Feb 2020

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

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

UNIVERSITÉ FRANÇOIS-RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

CNRS ERL 7368 – Équipe Transferts Ioniques et Rythmicité Cardiaque
Groupe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires

THÈSE

présentée par

Côme PASQUALIN

soutenue le **25 novembre 2016**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université François-Rabelais de Tours**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Dynamique calcique dans les cardiomyocytes de veines pulmonaires de rat Une hétérogénéité source d'arythmie ?

Thèse dirigée par :

Mme Véronique MAUPOIL

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

M. Olivier BERNUS

Professeur, IHU Liryc, Université Victor Segalen, Bordeaux

M. Sylvain RICHARD

Directeur de Recherche CNRS, Université de Montpellier

JURY :

Mme Diane GODIN-RIBUOT

Professeur, Université Joseph-Fourier, Grenoble

Mme Véronique MAUPOIL

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

M. Olivier BERNUS

Professeur, IHU Liryc, Université Victor Segalen, Bordeaux

M. Pierre BREDELOUX

Maître de Conférences, Université François-Rabelais, Tours

M. Sylvain RICHARD

Directeur de Recherche CNRS, Université de Montpellier



REMERCIEMENTS

À **Véronique Maupoil**, qui me guide, me conseille et me soutient depuis près de six ans ; qui m'a appris à chercher et à écrire, souvent au prix de ses week-ends ; qui m'a appris à faire apprendre, et qui a fait apprendre à ma place pour que je puisse terminer cette thèse dans les temps...

À **Pierre Bredeloux**, sans qui je n'aurais peut-être jamais envisagé une carrière d'enseignant-chercheur, et qui a parcouru sans jamais faillir les kilomètres de texte que j'ai soumis à son regard critique au fil des années...

À **Olivier Bernus**, qui m'a offert l'opportunité unique de réaliser des expériences au Liryc, et avec qui j'espère vivement pouvoir poursuivre les travaux débutés en cartographie optique ; à lui, surtout, qui a accepté de consacrer un temps précieux à être juge et rapporteur de ce travail...

À **Sylvain Richard**, grand connaisseur des cardiomyocytes isolés, spécialiste dont j'espère qu'il fera preuve de patience et d'indulgence devant ce travail ; à lui, donc, qui a accepté la difficile tâche de rapporteur...

À **Diane Godin-Ribuot**, pour son accueil chaleureux au laboratoire HP2 de Grenoble, où j'ai réalisé des expériences inenvisageables ailleurs en France, et pour le temps consacré à la lecture et à l'évaluation de cette thèse...

À **Claire O. Malécot** (n'oubliez pas le « O. », elle y tient !), **Angèle Yu** (prononcez [jy]), et **François Gannier** (non, rien à ajouter cette fois !), mes chers collègues et amis, pour avoir partagé avec moi leurs connaissances, mais aussi leur temps et leur bonne humeur tout au long de nos travaux...

À **Ian Findlay** et **Jean-Louis Freslon**, pour toutes les discussions scientifiques et techniques que nous avons eues ensemble, échanges ô combien enrichissants...

À **Yann Fourbon**, **Christophe Vandier**, **Aurélien Chatelier**, **Caroline Pascarel-Auclerc**, **Fabien Brette**, et **Jessica Morand**, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours des dernières années et, je l'espère, pour les quelques années à venir...

À **Laura Chaufour** et **Wendy Roisand**, précieuses stagiaires...

À **Vladimir Veksler** et **Renée Ventura-Clapier**, qui m'ont initié à la technique des fibres pelées...

À **Anne Cantereau**, **Christian Cognard**, **Alexei Grichine** et **Julien Burland-Gaillard**, pour leur aide et leur expertise en microscopie confocale...

À **Nicolas Peineau**, qui, en m'accueillant si chaleureusement au sein de son équipe, m'a permis de débiter l'enseignement, exercice passionnant et si utile également pour la présentation de mes travaux de recherche...

À **tous les membres de STIM** et en particulier à son directeur **Frédéric Becq**, ainsi qu'à **Patrick Bois**, responsable de l'équipe TIRC, pour leur accueil au sein du laboratoire de recherche...

À **Christophe Aubert** et **Benjamin Plante**, pour l'attention particulière qu'ils ont portée à nos animaux...

À **tous les enseignants de la faculté de pharmacie de Tours**, qui ont su me faire aimer les sciences et m'ont transmis ce goût du partage du savoir ; j'espère pouvoir moi aussi un jour contribuer au développement des Sciences Pharmaceutiques et à leur enseignement ...

... et puis aussi...

À **mes parents**, bien sûr, pour m'avoir transmis la valeur du travail et le goût des relations humaines...

À **Gisèle Godard**, qui a partagé sa connaissance des subtilités de la langue française, qui a consacré une partie de son précieux temps à traquer les « coquilles » et qui a corrigé avec tant de bienveillance les fautes qui ont échappé à nos multiples relectures...

À **Sam** (qui aurait dû devenir « Thesis planner » !), pour tout, et bien plus encore...

À tous...

... merci.

RESUME

La fibrillation atriale (FA) est le trouble du rythme le plus fréquemment rencontré en clinique. Elle est responsable d'une importante morbi-mortalité et d'une forte majoration du risque d'accident vasculaire cérébral. La FA est réfractaire aux traitements pharmacologiques anti-arythmiques, elle constitue donc un problème de santé publique. À son stade initial, la FA est principalement déclenchée par des foyers d'activité électriques anormaux situés dans le manchon de cardiomyocytes (CM) des veines pulmonaires (VP). Le mécanisme à l'origine de leur génération très mal connu. Les ions calcium (Ca^{2+}) étant fréquemment impliqués dans la génération de signaux électriques arythmogènes, nous avons émis l'hypothèse qu'ils pouvaient être impliqués dans les arythmies générées dans la VP.

Les caractéristiques structurelles et fonctionnelles du cycle du Ca^{2+} n'étant pas connues dans les CM de VP, nous avons donc exploré et comparé ce cycle à celui des CM d'oreillette gauche (OG) et de ventricule gauche (VG) chez le rat.

L'étude de l'architecture de la membrane plasmique – point d'entrée du Ca^{2+} dans le CM – a nécessité le développement d'un algorithme d'analyse spécifique pour les CM de VP (TTorg). Contrairement aux CM d'OG et de VG, la longueur du réseau de tubules transverses (TT) est variable dans les CM de VP et son niveau d'organisation est très hétérogène d'un CM à l'autre. Cette organisation hétérogène des TT d'un CM à l'autre implique une grande variabilité de distribution spatiale des canaux calciques ($\text{Ca}_v1.2$) par rapport aux récepteurs de la ryanodine (RyR2) et ainsi une grande hétérogénéité de forme et d'amplitude des transitoires calciques. Ces différents types de CM ne sont pas dispersés aléatoirement au sein de la veine, mais regroupés en « îlots » de CM présentant le même type d'organisation.

Dans les CM de VP, la cinétique de recapture du Ca^{2+} cytoplasmique dans le réticulum sarcoplasmique par la SERCA est identique à celle des CM d'OG, mais plus rapide que celle des CM de VG. En revanche, dans les CM de VP, la cinétique globale de diminution de la concentration calcique du cytoplasme par les mécanismes sarcolemmaux et les mitochondries est plus rapide que dans les CM d'OG, mais plus lente que dans les CM de VG.

Dans les CM de VP, la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques induit une augmentation de l'amplitude du transitoire calcique identique à celle des CM d'OG mais plus faible que celle des CM de VG. La stimulation des récepteurs α_1 -adrénergique induit une diminution de l'amplitude des transitoires calcique qui est plus importante dans les CM de VP que dans ceux d'OG.

L'étude de l'amplitude de contraction des CM isolés a nécessité le développement d'un algorithme d'analyse spécifique pour les CM de VP (SarcOptiM). Cette amplitude est très hétérogène dans les CM de VP, à l'image de l'amplitude de leurs transitoires calciques. Contrairement aux anneaux isolés d'OG, la force de contraction des anneaux de VP n'est augmentée ni par l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} extracellulaire ni par le Bay K 8644, un ouvreur des canaux calciques de type L. Ces différences de réponses ne sont pas dues à une différence de sensibilité des myofilaments pour le Ca^{2+} . Les CM de VP ne semblent donc pas présenter de réserve contractile dans les conditions d'étirement permettant d'obtenir une réponse contractile maximale.

L'étude des libérations calciques spontanées dans le cytoplasme des CM a montré une plus grande fréquence des *sparks* et des *waves* dans les CM de VP que dans les CM d'OG.

En conclusion, la forte hétérogénéité des CM de VP ainsi que la plus grande fréquence des libérations calciques spontanées dans leur cytoplasme pourraient expliquer le fort potentiel arythmogène des VP.

Mots clés : fibrillation atriale, cardiomyocyte, dynamique calcique, contraction, microscopie confocale, analyse d'image.

ABSTRACT

Atrial Fibrillation (AF) is the most common arrhythmia. It is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality, and exposes patients to a strongly increased risk of stroke. AF is resistant to antiarrhythmic drugs, making it a significant public health problem. At an early stage, AF is due to abnormal electric foci located in the myocardial sleeves of pulmonary veins (PV). The mechanism initiating these ectopic foci is unknown. Calcium (Ca^{2+}) being frequently involved in the triggering of pro-arrhythmic electric signals, we thus hypothesized that it could also be involved in the arrhythmias occurring in the PV sleeves.

Structural and functional features of the calcium cycle are unknown in PV cardiomyocytes (CM). Therefore, we explored and compared this cycle with that of left atria (LA) and ventricle (LV) cardiomyocytes in the rat.

The study of plasma membrane architecture – through which Ca^{2+} enters the cytoplasm – has required the development in ImageJ (the NIH image analysis software) of a specific algorithm for PV CM (TTorg). As opposed to LA and LV CM, the length of the transverse tubular network is variable in PV CM and its organization is very heterogeneous from one CM to another. This heterogeneity results in a variability in the spatial distribution of calcium channels ($\text{Ca}_v1.2$) relative to ryanodine receptors (RyR2) and therefore in a large variety of calcium transients shapes and amplitudes. These different types of CM are not randomly spread within the vein, but gathered in “islets” of CM with the same type of organization.

The kinetics of sarcoplasmic reticulum calcium reuptake by the SERCA is identical in PV and LA CM but is faster in PV than in LV CM. In contrast, the global kinetics of cytoplasmic calcium decrease by sarcolemmal mechanisms and mitochondria is faster in PV CM than in LA CM but slower than in LV CM.

Activation of β -adrenergic receptors increases the calcium transient in a similar amplitude in PV and LA CM, but this increase is lower than the one observed in LV CM. Activation of α_1 -adrenergic receptors decreases the calcium transient amplitude to a greater extent in PV CM than in LA CM.

The study of isolated PV CM contractility required the development in ImageJ of a specific algorithm (SarcOptiM). Contraction amplitudes of isolated PV CM are highly heterogeneous like that of calcium transients. Unlike in LA CM, increasing the extracellular calcium concentration or application of the L-type calcium channel opener BayK8644 has no effect on the contraction amplitude of PV rings. These differences in responses between LA

and PV CM are not due to a difference in the sensitivity of contractile proteins to Ca^{2+} . Thus, PV CM do not seem to have a contractile reserve in stretch condition allowing the maximal contractile response in control conditions.

The study of spontaneous calcium releases from sarcoplasmic reticulum has revealed a higher frequency of “sparks” and “waves” in PV than in LA CM.

In conclusion, the great heterogeneity of PV CM, as well as the high frequency of spontaneous calcium release events in the cytoplasm of PV CM might explain their high arrhythmogenicity.

Key words: atrial fibrillation, cardiomyocyte, calcium dynamics, contraction, confocal microscopy, image analysis.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
RESUME	5
ABSTRACT	7
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	19
ÉTAT DE L'ART	21
LE CYCLE DU CALCIUM DANS LES CARDIOMYOCYTES	23
I. Le calcium dans le couplage excitation-contraction et dans la phase de relaxation du cardiomyocyte	23
A. Étape 1 : Le potentiel d'action et le courant calcique, initiateurs du « transitoire calcique »	23
1. Le potentiel d'action	23
2. Le courant calcique transmembranaire pendant le potentiel d'action	26
B. Étape 2 : La libération autocatalytique du calcium par le réticulum sarcoplasmique	29
1. Généralités	29
2. Régulation du fonctionnement des RyR2	29
3. Optimisation du CICR par le réseau de tubules transverses.....	31
C. Étape 3 : La contraction du cardiomyocyte	35
D. Étape 4 : La diminution de la concentration calcique cytoplasmique	37
1. Généralités	37
2. La recapture calcique par la SERCA2a.....	38
3. L'élimination du calcium par l'échangeur sodium-calcium.....	40
4. L'élimination calcique par les PMCA et la séquestration par les mitochondries.....	42
E. Étape 5 : La relaxation des cardiomyocytes	42
II. Variations spontanées de la concentration calcique cytoplasmique dans les cardiomyocytes	43
A. Généralités	43
B. Les sparks calciques spontanés	43
1. Définition et caractéristiques	43
2. Cause/Origine	43
3. Facteurs favorisants	44
C. Les waves	44
D. Waves calciques et troubles du rythme : les post-dépolarisations tardives (DAD)	46
1. Mécanisme général	46
2. Causes connues des DAD	47
LA FIBRILLATION ATRIALE	50
I. Épidémiologie	50
II. Étiologie et facteurs de risque	51
A. Les FA primitives	51
B. Les FA secondaires	51

C.	Les FA idiopathiques	52
III.	<i>Diagnostic</i>	52
IV.	<i>Physiopathologie</i>	53
A.	Les mécanismes arythmiques.....	53
1.	Les foyers électriques ectopiques	53
2.	Les activités déclenchées	54
3.	Les phénomènes de réentrée	56
B.	Initiation, développement et autopromotion de la FA.....	59
1.	Initiation de la FA.....	59
2.	Développement et autopromotion de la FA	59
V.	<i>Complications de la FA</i>	63
A.	Les accidents thromboemboliques	63
B.	L'insuffisance cardiaque.....	63
C.	Les chutes des patients âgés.....	63
D.	Les complications neurologiques.....	64
E.	Les morts subites	64
VI.	<i>Traitements</i>	64
A.	La prévention du risque thromboembolique	64
B.	Le contrôle du rythme : la cardioversion.....	65
1.	La cardioversion électrique.....	65
2.	La cardioversion pharmacologique.....	66
C.	Le contrôle de la fréquence cardiaque.....	66
D.	L'ablation chirurgicale.....	66
VII.	<i>Conclusions</i>	68
	LES VEINES PULMONAIRES DANS LA FIBRILLATION ATRIALE.....	69
I.	<i>Anatomie des veines pulmonaires</i>	69
A.	Macro-anatomie	69
B.	Structure.....	70
II.	<i>Le manchon de cardiomyocytes des VP</i>	71
A.	Description générale	71
B.	Existence incertaine d'autres types cellulaires dans le manchon	75
C.	Origine embryonnaire du manchon myocardique des VP.....	76
III.	<i>Mécanismes arythmiques dans la VP</i>	76
A.	Activités déclenchées et automatismes	76
1.	Existence controversée d'un automatisme physiologique dans la VP.....	76
2.	Activités déclenchées dans les cardiomyocytes de VP	77
3.	L'« automatisme catécholaminergique » : un mécanisme arythmique inexpliqué spécifique de la VP.....	78
B.	Les réentrées	80
C.	Conclusions.....	81
	OBJECTIFS	83
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	87
I.	<i>Animaux</i>	89

II. Prélèvement et préparation du matériel biologique.....	89
III. Dissociation des cardiomyocytes	90
A. Dissociation des CM d'OG et de VP	90
B. Dissociation des CM de VG.....	90
C. Conservation des CM isolés.....	91
IV. Microscopie confocale.....	91
A. Généralités	91
B. Marquages fluorescents sur cardiomyocytes vivants	92
C. Marquages fluorescents sur cardiomyocytes fixés	93
D. Marquages fluorescents sur tissus fixés	93
E. Analyse des images.....	94
V. Enregistrements photométriques des transitoires calciques globaux	94
A. Généralités	94
B. Étude des mécanismes d'extrusion et de recapture du calcium cytoplasmique.....	95
C. Cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique.....	97
D. Étude de l'effet de substances pharmacologiques.....	97
VI. Enregistrement et analyse des événements calciques spontanés.....	97
A. Les sparks	97
B. Les waves.....	98
VII. Mesures de contractilité.....	99
A. Contractilité des cardiomyocytes isolés	99
B. Contractilité des anneaux isolés de VP et d'OG	99
C. Contractilité des tissus « pelés »	100
VIII. Dispositif d'acquisition de numérisation et d'enregistrement	101
IX. Quantification de l'expression des protéines	101
A. Généralités	101
B. Extraction des protéines.....	102
C. Séparation et transfert des protéines.....	102
D. Détection et semi-quantification des protéines.....	102
X. Statistiques	103

RESULTATS..... 105

I. Caractérisation du cycle du calcium dans les CM de VP : étude structurelle et fonctionnelle	107
A. Développement d'un outil d'analyse de la régularité de l'organisation des tubules transverses dans les cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG.....	107
1. Introduction et objectifs.....	107
2. Résultats	108
3. Conclusion.....	109
B. Structure du réseau de tubules transverses et conséquences sur la forme du transitoire calcique dans les CM de VP	110
1. Introduction et objectifs.....	110
2. Résultats	111
3. Conclusion.....	113
C. Niveaux d'expression des RyR2, Cav1.2, NCX1 et PLB	114

1.	Introduction et objectifs.....	114
2.	Résultats	114
3.	Discussion, limites et perspectives	115
D.	Étude des transitoires calciques globaux dans les cardiomyocytes de VP vs. OG et VG	115
1.	Introduction et objectifs.....	115
2.	Résultats	116
3.	Discussion.....	124
E.	Étude de l'effet de facteurs arythmogènes sur les <i>sparks</i> calciques spontanés dans les CM de VP et d'OG ...	133
1.	Introduction et objectifs.....	133
2.	Résultats	134
3.	Discussion.....	141
II.	<i>Caractérisation de la contractilité des CM de VP</i>	145
A.	Développement d'un outil de mesure de la contractilité des cardiomyocytes de veine pulmonaire, d'oreillette gauche et de ventricule gauche.....	145
1.	Introduction et objectifs.....	145
2.	Résultats	146
3.	Conclusion.....	147
B.	Etude de la contractilité des cardiomyocytes de VP vs. OG.....	147
1.	Introduction	147
2.	Résultats	148
3.	Discussion.....	152
	CONCLUSION	157
I.	<i>Principaux résultats</i>	159
II.	<i>Perspectives</i>	160
	BIBLIOGRAPHIE	163
	ANNEXE	181

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Schéma type d'un potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire (modifié d'après Babuty <i>et al.</i> 2008).....	25
Figure 2 Potentiels d'action de cardiomyocytes d'une préparation de VP et d'OG stimulée à 2 Hz, chez le rat (modifiée d'après Faucher (2008)).....	26
Figure 3 Régulation du fonctionnement des $Ca_v1.2$ par la PKA. AKAP15 est une protéine d'ancrage. Schéma modifié d'après Leroy et Fischmeister (2015).....	28
Figure 4 Schéma simplifié du complexe macromoléculaire du RyR2 et d'une partie des protéines régulatrices associées (d'après Bers <i>et al.</i> (2004)).....	31
Figure 5 Représentation schématique de l'organisation du réticulum sarcoplasmique et des récepteurs de la ryanodine par rapport aux canaux calciques dans les cardiomyocytes de ventricule gauche (à gauche) présentant un réseau de tubules bien organisé transversalement et d'oreillette gauche (à droite) ne présentant pas de tubules (modifié d'après Bootman <i>et al.</i> (2006)).	32
Figure 6 Marquages fluorescents des membranes dans des coupes histologiques d'oreillette gauche humaine (modifiée d'après Richards <i>et al.</i> (2011)).....	33
Figure 7 Illustration en fausses couleurs des différentes formes de transitoires calciques dans les cardiomyocytes selon leur type de réseau de tubules transverses (modifié d'après Kirk <i>et al.</i> (2003)).	35
Figure 8 A : Machinerie contractile des cardiomyocytes. Schéma de la structure des sarcomères (modifié d'après Schaub <i>et al.</i> (1998)).	36
Figure 9 Schéma général du cycle du calcium dans les cardiomyocytes (modifié d'après Bers <i>et al.</i> (2000)). ...	38
Figure 10 Schéma simplifié de la régulation du fonctionnement de la SERCA2a par la phospholamban (d'après Braunwald (2013)).....	39
Figure 11 Modes de fonctionnement de l'échangeur Na^+-Ca^{2+}	41
Figure 12 Image de microscopie confocale en fausses couleurs de <i>sparks</i> calciques spontanés dans le cytoplasme d'un cardiomyocyte.	43
Figure 13 Schéma du mécanisme de propagation des <i>waves</i> calciques par le phénomène de <i>calcium-induced calcium release</i> dans le cytoplasme des cardiomyocytes.	45
Figure 14 Exemple de déclenchement d'une <i>wave</i> calcique dans une zone à forte concentration spatiale et temporelle de <i>sparks</i> spontanés.	45
Figure 15 Schéma de potentiel d'action avec post-dépolarisation tardive (DAD) (modifié d'après Leenhardt <i>et al.</i> (2011)).....	46
Figure 16 ECG d'un patient sain et d'un patient souffrant de fibrillation atriale au cours d'un épisode de fibrillation.	53
Figure 17 Schéma représentant la distribution de 69 foyers ectopiques (points noirs) de déclenchement de FA chez 45 patients, d'après Haïssaguerre <i>et al.</i> (1998).	54
Figure 18 Schéma de potentiels d'action avec post-dépolarisations précoces (EAD) et tardives (DAD). Schéma modifié d'après (Leenhardt <i>et al.</i> 2011).	55
Figure 19 Mécanismes de réentrées.	57

Figure 20 Répartition préférentielle des canaux jonctionnels intercellulaires dans les cardiomyocytes en conditions physiologiques (modifiée d'après Hervé <i>et al</i> 2013) (Hervé et Derangeon 2013).	58
Figure 21 Ablation chirurgicale d'une fibrillation auriculaire.	67
Figure 22 Dessin anatomique de la position des veines pulmonaires par rapport au cœur humain entier, modifié d'après Sobotta's Atlas and Text-book of Human Anatomy (Sobotta 1906).	69
Figure 23 Schéma du bloc cœur-poumons de rat, d'après (Bronquard <i>et al.</i> 2007).	70
Figure 24 Coupes histologiques transversales de veines pulmonaires humaine (A) et de rat (B) après coloration pour révéler le myocarde. Modifié d'après Mueller-Hoecker <i>et al.</i> (2008) et Bronquard <i>et al.</i> (2007).	71
Figure 25 Orientation des fibres myocardiques (lignes noires) au niveau de la jonction des VP avec l'OG chez l'Homme (modifiée d'après Nathan et Eliakim (1966)).	72
Figure 26 Structure de la veine pulmonaire de rat observée en microscopie électronique.	73
Figure 27 Cardiomyocytes isolés de veines pulmonaires (A) et d'oreillette gauche (B) de rat, observés en microscopie à lumière transmise.	74
Figure 28 Distribution des fibres nerveuses adrénérgiques et cholinérgiques à niveau de l'orifice des VP chez l'Homme.	75
Figure 29 Salves d'activités électriques automatiques déclenchées par la noradrénaline dans le manchon de cardiomyocytes des VP (modifiée d'après Doisne <i>et al.</i> (2009)).	78
Figure 30 Bloc cœur-poumons d'un rat Wistar mâle âgé de 3 mois.	90
Figure 31 Schéma simplifié du trajet optique d'un microscope inversé confocal.	92
Figure 32 Méthode de détermination des constantes de cinétique de recapture et d'élimination par le NCX, la PMCA et les mitochondries.	96
Figure 33 Axe (ligne verte) le long duquel est réalisé le balayage laser pour l'acquisition d'une image de <i>sparks</i>	98
Figure 34 Exemple d'enregistrement des vagues calciques avec la technique décrite ci-dessus.	99
Figure 35 Schéma simplifié du dispositif de mesure de la force de contraction d'un anneau isolé de veine pulmonaire ou d'oreillette gauche.	101
Figure 36 Schémas des principales organisations des réseaux de tubules retrouvés dans les populations des cardiomyocytes de VP (A), VG (B) et OG (C).	107
Figure 37 Niveau d'expression des protéines RyR2.	114
Figure 38 Niveaux d'expression du phospholamban dans les tissus d'OG, de VP et de VG.	114
Figure 39 Amplitude et cinétique des transitoires calciques évoqués par une stimulation électrique dans les cardiomyocytes de VP.	117
Figure 40 Élimination et recapture du calcium cytoplasmique.	119
Figure 41 Cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique.	120
Figure 42 Effet de la stimulation des récepteurs β -adrénérgiques sur le transitoire calcique.	121
Figure 43 Effet de l'isoprénaline sur les transitoires calciques.	122
Figure 44 Stimulation des récepteurs α_1 -adrénérgique et conséquences sur l'amplitude du transitoire calcique.	123
Figure 45 Marquage des mitochondries dans des cardiomyocytes de VP et d'OG vivants.	128

Figure 46 Schéma de comparaison des flux calciques entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme dans les cardiomyocytes d'OG et de VP.	131
Figure 47 Sparks des CM de VP et d'OG.	135
Figure 48 Effet de la noradrénaline sur les <i>sparks</i> des CM de VP et d'OG chez les rats de 3 mois.	137
Figure 49 Effet de l'âge sur les <i>sparks</i> des CM de VP et d'OG.	139
Figure 50 Effet de l'hypertension artérielle sur les <i>sparks</i> des CM de VP et d'OG.	141
Figure 51 Amplitude de contraction des sarcomères.	148
Figure 52 Variation de l'amplitude de contraction des anneaux de VP (n=11) et d'OG (n=23) en fonction de la $[Ca^{2+}]_e$	149
Figure 53 Réponse contractile d'anneaux de VP et d'OG à un ouvreur des canaux calciques.	150
Figure 54 Courbe concentration-effet du diltiazem sur l'amplitude de contraction d'anneaux de VP (n=13) et d'OG (n=9).	151
Figure 55 Tension développée par des anneaux pelés de VP (n=7) et d'OG (n=7) en fonction de la concentration en calcium libre du milieu d'incubation.	152
Figure 56 Enregistrement de transitoires calciques spontanés dans plusieurs zones d'une préparation VP-OG-OD en présence de noradrénaline 1 μ M.	153
Figure 57 Effet du Bay K 8644 sur l'amplitude des transitoires calciques des cardiomyocytes de VP.	154

LISTE DES ABREVIATIONS

AAC	activité automatique catécholaminergique	mito / mitoch	mitochondrie
AO	aorte	NCX	échangeur sodium-calcium
BSA	albumine de sérum bovin	OG / OD	oreillette gauche / droite
CaMKII	calmoduline kinase II	PA	potentiel d'action
Ca _v	canal calcique voltage-dépendant	PKA / PKC	protéine kinase A / C
CCD	<i>charge-coupled device</i> (dispositif à transfert de charge)	PLB / PLN	phospholamban
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i>	PMCA	pompe calcique ATPase de la membrane plasmique
CM	cardiomyocyte(s)	PV	veine pulmonaire
CMOS	<i>complementary metal oxide semiconductor</i>	RIPV	veine pulmonaire inférieure droite
CS	sinus coronaire	RS	réticulum sarcoplasmique
ctrl	contrôle	RSPV	veine pulmonaire supérieure droite
DAD	post-dépolarisation tardive	RyR2	récepteur de la ryanodine de type 2
DMSO	diméthylsulfoxyde	SERCA	pompe calcique ATPase du réticulum sarcoplasmique
EAD	post-dépolarisation précoce	SHR	rat spontanément hypertendu
FDHM	durée du pic à 50 % du maximum	SR	réticulum sarcoplasmique
FWHM	largeur du pic à 50 % du maximum	SVC	veine cave supérieure
HCN4	<i>hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel type 4</i>	TBS	<i>tris-buffered saline</i>
IP ₃	inositol triphosphate	Tn	troponine
IP ₃ R	récepteurs de l'IP ₃	TT	tubules transverses
iso	isoprénaline	TTP	temps au pic
IVC	veine cave inférieure	TVPC	tachycardie ventriculaire polymorphique catécholaminergique
LA	oreillette gauche	VG	ventricule gauche
LIPV	veine pulmonaire inférieure gauche	VP	veine pulmonaire
LSPV	veine pulmonaire supérieure gauche	WKY	rat de souche Wistar-Kyoto
LV	ventricule gauche		

INTRODUCTION

La fibrillation atriale (FA) est le trouble du rythme le plus fréquemment rencontré en cardiologie, en particulier chez les patients de plus de 50 ans. Son incidence est d'environ 2 % dans la population générale des pays occidentaux et dépasse les 10 % chez les individus âgés de 80 ans et plus. Elle constitue donc un véritable problème de santé publique du fait du vieillissement de la population.

La FA est caractérisée par un rythme rapide (~ 400 battements par minute) et par une contraction asynchrone des cardiomyocytes de l'oreillette gauche (OG) à l'origine d'une perte de sa fonction mécanique.

Les patients souffrant de cette pathologie sont ainsi exposés à un risque majoré de mort subite, d'insuffisance cardiaque et d'accidents thromboemboliques (*e.g.* leur risque d'accident vasculaire cérébral est accru de 250 % par rapport aux patients sains (Healey *et al.* 2012)).

La prise en charge de cette pathologie est complexe (*i.e.* la balance bénéfice risque n'est pas toujours en faveur du traitement), onéreuse (*i.e.* estimée à 6.65 G\$/an aux États-Unis en 2006 (Coyne *et al.* 2006)) et malgré la diminution des risques associés à la pathologie, elle expose les patients à d'autres risques liés aux traitements (*e.g.* troubles de l'hémostase et saignements). De plus, il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique curatif efficace.

La principale source de déclenchement de la FA est le manchon de cardiomyocytes des veines pulmonaires (VP) (Haïssaguerre *et al.* 1998). Des foyers d'activités électriques anormaux s'activent dans ces cardiomyocytes ; le signal électrique généré se propage jusqu'à l'OG et perturbe son fonctionnement. Le(s) mécanisme(s) conduisant à l'apparition de ces foyers électriques ectopiques est (sont) inconnu(s).

Dans les cardiomyocytes de ventricule et d'oreillette, les ions calcium (Ca^{2+}) sont fréquemment impliqués dans la génération d'activités électriques anormales pouvant conduire à des troubles du rythme (Song *et al.* 2015; Voigt *et al.* 2013). Un mécanisme semblable pourrait donc être à l'origine de l'activation des foyers d'activité électrique ectopique du manchon myocardique des VP. Cette hypothèse est soutenue par certaines études montrant 1) une « instabilité calcique » des cardiomyocytes de VP (Rietdorf, Bootman, et Sanderson 2014) 2) l'induction d'activités électriques automatiques dans le myocarde et les cardiomyocytes isolés de VP de rat par la noradrénaline (Maupoil *et al.* 2007; Doisne *et al.* 2009; Logantha *et al.* 2010; Okamoto *et al.* 2012). Ce dernier type d'activités électriques, appelées activités automatiques catécholaminergiques (AAC), nécessite l'activation simultanée des récepteurs α_1 - et β_1 -adrénergiques, ce qui modifie fortement le cycle du calcium des cardiomyocytes. Ces

AAC ne sont pas observées dans le myocarde atrial. Ceci témoigne d'une spécificité fonctionnelle des cardiomyocytes de VP.

Le travail décrit dans cette thèse a donc été réalisé dans le but de mieux comprendre le rôle du calcium dans le déclenchement des activités électriques ectopiques générées par les cardiomyocytes de VP.

Dans un premier temps, le fonctionnement physiologique du cycle du calcium des cardiomyocytes de VP a été étudié et comparé à celui des cardiomyocytes d'OG et de ventricule gauche (VG) dans lesquels ce cycle a fait l'objet de descriptions détaillées. D'autres travaux ont ensuite été menés dans des conditions expérimentales favorisant le déclenchement d'arythmies (*e.g.* en présence de noradrénaline, d'agonistes sélectifs des récepteurs α_1 - et β_1 -adrénergiques) ainsi que sur des cardiomyocytes isolés d'animaux présentant des facteurs de risque de FA (*e.g.* animaux âgés ou hypertendus) afin d'étudier dans ces conditions particulières la dynamique calcique des cardiomyocytes de VP par rapport aux deux autres types de cardiomyocytes.

Ces travaux ont été réalisés chez le rat. En effet, chez cette espèce, il est facile d'étudier les deux principaux facteurs de risque de FA que sont l'âge et l'hypertension artérielle. De plus, le rat possède, comme l'Homme (Thomas *et al.* 2016), des récepteurs α_1 -adrénergiques cardiaques qui sont nécessaires au déclenchement des AAC (Maupoil *et al.* 2007). Ces travaux ont nécessité le développement d'algorithmes spécifiques d'analyses d'image et de vidéo pour l'étude des CM de VP.

ÉTAT DE L'ART

LE CYCLE DU CALCIUM DANS LES CARDIOMYOCYTES

L'ion Ca^{2+} tient le premier rôle dans la fonction principale des cardiomyocytes : la contraction. Une élévation de la concentration calcique cytoplasmique ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) entraîne la contraction de la cellule et une diminution initie sa relaxation. Toutefois, lorsque les échanges calciques entre les différents compartiments de la cellule sont perturbés, cet ion peut également être impliqué dans le déclenchement de nombreux troubles du rythme cardiaque.

Les principaux échanges calciques dans les cardiomyocytes ont lieu entre le cytoplasme et le réticulum sarcoplasmique (RS) suite à une stimulation électrique qui, physiologiquement, provient du nœud sinusal. Des mouvements calciques peuvent également survenir dans les cardiomyocytes de manière spontanée en dehors de toute stimulation électrique. Il s'agit principalement d'élévations ponctuelles de la concentration calcique dans le cytoplasme, qui apparaissent à proximité du réticulum sarcoplasmique. Dans certaines circonstances, ces événements localisés peuvent se propager à l'ensemble du cardiomyocyte, voire à plusieurs cardiomyocytes, et présenter un caractère arythmogène.

Cette partie présente l'état des connaissances de la dynamique calcique se déroulant dans les cardiomyocytes. Elle compare de manière privilégiée la dynamique calcique des cardiomyocytes de ventricule gauche (VG) à celle des cardiomyocytes d'oreillette gauche (OG). En effet, contrairement aux cardiomyocytes de VP, ces deux types de cardiomyocytes ont été largement étudiés et leurs cycles du calcium sont bien connus.

I. Le calcium dans le couplage excitation-contraction et dans la phase de relaxation du cardiomyocyte

A. Étape 1 : Le potentiel d'action et le courant calcique, initiateurs du « transitoire calcique »

1. *Le potentiel d'action*

a. Généralités

Les cellules cardiaques sont des cellules excitables : elles sont capables, suite à une stimulation électrique, de générer une variation de leur potentiel électrique transmembranaire appelée potentiel d'action (PA). Cet événement électrophysiologique est caractérisé par une dépolarisation très rapide de la membrane plasmique, suivie d'une repolarisation plus lente. La forme de ce signal varie selon l'espèce, l'endroit où il est enregistré dans le myocarde, et le type

de cellule qui le produit. Il entraîne une élévation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$ appelée « transitoire calcique » et ayant pour finalité la contraction du cardiomyocyte.

Le PA, d'une durée de quelques dizaines à quelques centaines de millisecondes, résulte d'un changement de la perméabilité de la membrane plasmique à certains ions du fait de l'ouverture et/ou de la fermeture de canaux ioniques, qui sont des protéines transmembranaires spécialisées dans le transport de ces ions. En effet, lorsque la perméabilité de la membrane à un ion augmente, le potentiel de membrane tend à se rapprocher du potentiel électrique d'équilibre de cet ion¹. Le sens de migration de l'ion considéré à travers la membrane dépend donc des gradients de charge et de concentration de cet ion de part et d'autre de la membrane plasmique. Ce mouvement ionique crée alors un courant électrique. Ainsi, la migration des ions à travers la membrane peut modifier le gradient de charge transmembranaire et donc faire varier la différence de potentiel électrique entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Un tel phénomène se produit lors du PA.

b. Les grandes phases du potentiel d'action des cardiomyocytes

Le PA des cardiomyocytes est classiquement divisé en quatre phases (Figure 1) :

– la première phase, dite « phase 0 », est provoquée par l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants de la membrane plasmique. Ceci provoque l'entrée massive d'ions Na^+ dans le cytoplasme, qui entraîne à son tour une dépolarisation membranaire rapide et importante ;

– la deuxième phase, dite « phase 1 », peut être décomposée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les canaux sodiques s'inactivent. La présence en grande quantité de sodium dans le cytoplasme déclenche le fonctionnement de l'échangeur sodium-calcium (NCX) en « mode inverse » (cf. description dans la partie « L'élimination du calcium par l'échangeur sodium-calcium » page 40) : il fait entrer dans la cellule un ion Ca^{2+} et sortir trois ions Na^+ par cycle. Dans le même temps, un début de repolarisation membranaire est amorcé par l'ouverture de certains canaux potassiques, qui permettent la sortie d'ions K^+ . Le courant induit par l'ouverture de ces canaux est appelé I_{to} (pour *transient outward*). Le potentiel de membrane de la cellule tend alors vers le potentiel d'équilibre du potassium qui est de l'ordre de -90 mV (Levi *et al.* 1994) ;

¹ Tel que défini par l'équation de Nernst.

– la troisième phase, appelée phase 2 ou « phase en plateau », est constituée de deux étapes principales. D'une part, la poursuite de la repolarisation par les courants potassiques : I_{to} est progressivement relayé par les courants potassiques repolarisants lent I_{Ks} et rapide I_{Kr} ; d'autre part, l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L, correspondant aux $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$, et de type T, correspondant aux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$, qui permettent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Ce nouveau courant s'oppose alors aux courants potassiques repolarisants pendant quelques millisecondes, jusqu'à ce que les canaux calciques s'inactivent ;

– lors de la dernière phase, appelée « phase 3 » ou phase de « repolarisation tardive », les courants potassiques I_{Ks} , I_{Kr} , et rectifiant entrant (I_{K1}) deviennent largement majoritaires et ramènent la membrane plasmique à son potentiel de repos.

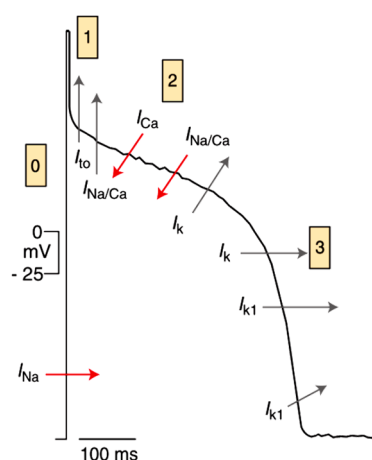


Figure 1 Schéma type d'un potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire (modifié d'après Babuty *et al.* 2008).

0-3 correspondent aux phases du potentiel d'action décrites dans le paragraphe précédent. Les flèches rouges correspondent aux courants ioniques induisant une dépolarisation de la membrane plasmique et les flèches grises à une repolarisation. I_k correspond aux courants I_{Ks} et I_{Kr} .

Les PA des cardiomyocytes d'OG sont différents de ceux des cardiomyocytes ventriculaires car ils ne présentent pas de phase de plateau. Cette différence vient principalement de la forme du courant I_{K1} , qui ne permet pas l'apparition d'une phase de maintien de l'état dépolarisé aux potentiels membranaires peu négatifs (Figure 2).

Dans les cardiomyocytes de VP de chien, le PA est légèrement plus court que celui des cardiomyocytes d'OG. Cette différence serait due à des courants potassiques (I_{Kr} et I_{Ks}) plus grands et à un courant calcique lent (I_{CaL}), plus petit dans les cardiomyocytes de VP que dans les cardiomyocytes d'OG (Ehrlich *et al.* 2003).

Chez le rat, les PA des cardiomyocytes de VP sont assez proches de ceux des cardiomyocytes d'OG (Doisne 2009) (Figure 2). La subtile différence de forme entre les deux types de PA viendrait en partie du courant potassique I_{K1} , plus faible dans les cardiomyocytes de VP que dans les cardiomyocytes d'OG (Okamoto *et al.* 2012).

Chez l'Homme, contrairement aux cardiomyocytes d'OG et de VG, il n'y a, à notre connaissance, aucune donnée disponible concernant les caractéristiques des PA des cardiomyocytes de VP.

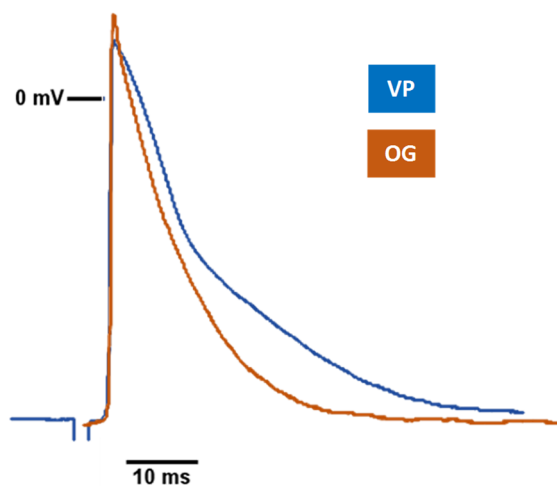


Figure 2 Potentiels d'action de cardiomyocytes d'une préparation de VP et d'OG stimulée à 2 Hz, chez le rat (modifiée d'après Faucher (2008)).

Immédiatement après le potentiel d'action, le cardiomyocyte est inexcitable du fait de l'inactivation des canaux sodiques, qui sont impliqués dans la génération du potentiel d'action. Une nouvelle dépolarisation et donc un nouveau PA sont de ce fait rendus impossibles pendant un certain temps après un premier PA ; ce délai est appelé « période réfractaire » (PR).

2. Le courant calcique transmembranaire pendant le potentiel d'action

a. Généralités

Le calcium entrant par les canaux calciques en phase 2 du potentiel d'action est la première étape dans l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, qui sera ensuite amplifiée par une libération calcique du réticulum sarcoplasmique pour aboutir à la contraction.

Dans les cardiomyocytes, le courant calcique présente deux composantes principales qui se distinguent par le seuil de voltage auquel elles s'activent :

– le courant I_{CaL} , provoqué par l'ouverture des canaux calciques de type $Ca_v1.2$ (majoritaires) et $Ca_v1.3$. Cette composante est dominante et s'active au potentiel électrique membranaire d'environ -40 mV ;

– le courant I_{CaT} , généré par l'ouverture des canaux calciques de type $Cav3.1$ et $Cav3.2$, qui s'active à partir d'un potentiel électrique membranaire d'environ -60 mV.

Chez le chien et le rat, la densité du courant I_{CaL} est décrite comme étant plus grande dans les cardiomyocytes d'OG que dans les cardiomyocytes de VP (Ehrlich *et al.* 2003; Coutu, Chartier, et Nattel 2006; Walden, Dibb, et Trafford 2009; Okamoto *et al.* 2012). Toutefois, les travaux récents du laboratoire réalisés chez le rat sont en opposition avec les travaux d'Okamoto *et al.* (Malécot, Pasqualin, et Maupoil 2016).

Le courant I_{CaT} est rarement observé dans les cardiomyocytes ventriculaires d'animaux adultes. En revanche, il est souvent présent dans les cardiomyocytes auriculaires bien que sa contribution au couplage excitation-contraction soit très modeste comparée au courant I_{CaL} (Bean 1985; Sipido, Carmeliet, et Van de Werf 1998; Vassort, Talavera, et Alvarez 2006). Chez le chien, la densité du courant I_{CaT} ne semble pas significativement différente entre les cardiomyocytes de VP et les cardiomyocytes d'OG (Ehrlich *et al.* 2003). Chez le rat, le courant I_{CaT} n'a pas été étudié dans les cardiomyocytes de VP. En revanche, il est présent dans les cardiomyocytes d'OG, et absent dans les cardiomyocytes ventriculaires (Leuranguer *et al.* 2000; Ferron *et al.* 2002; Ono et Iijima 2010).

b. Régulation du fonctionnement des canaux calciques

i. Les canaux calciques de type L

Les canaux calciques cardiaques de type L sont constitués de plusieurs sous-unités. Une sous-unité $\alpha1$ formant le pore est associée à des sous-unités auxiliaires : $\alpha2$, $\beta2$, γ et δ . La sous-unité $\alpha1$ constitue le pore du canal et caractérise le Cav . Les $Cav1.2$ possèdent la sous-unité $\alpha1c$ (~ 250 kDa) et les $Cav1.3$ la sous-unité $\alpha1d$. Les autres sous-unités régulent l'ouverture du canal (pour revue, voir Shaw et Colecraft (2013)).

Les trois principaux mécanismes de régulation de ces canaux font intervenir les protéines kinases, le complexe calcium-calmoduline et la protéine ahnak1.

- Régulation par les protéines kinases

Les stimulations $\alpha1$ - et $\beta1$ -adrénergiques conduisent respectivement à l'activation des protéines kinases C (PKC) et A (PKA). Ces deux kinases phosphorylent les canaux calciques de type L sur des sites différents, conduisant à des conséquences fonctionnelles distinctes (Kamp et Hell 2000).

Les effets de la phosphorylation du canal par les PKC sont encore très controversés. Selon les auteurs, cette phosphorylation active, inhibe ou est sans effet sur le canal (Kamp et Hell 2000). À l'inverse, l'effet associé à la phosphorylation des canaux par les PKA (Figure 3) est plus clair : leur probabilité d'ouverture est augmentée.

- Régulation par le complexe calcium-calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine présente dans le cytoplasme qui est attachée aux canaux calciques de manière constitutive. En présence de fortes concentrations calciques ($\sim 1 \mu\text{M}$) dans le cytoplasme, elle inhibe l'ouverture du canal calcique ce qui permet un rétrocontrôle négatif.

- Régulation par ahnak1

La protéine ahnak1 inhibe le canal de manière constitutive. Cette inhibition est levée lors d'une stimulation β_1 -adrénergique, par la phosphorylation de ahnak1 par la PKA (Haase 2007; Pankonien *et al.* 2011) (Figure 3).

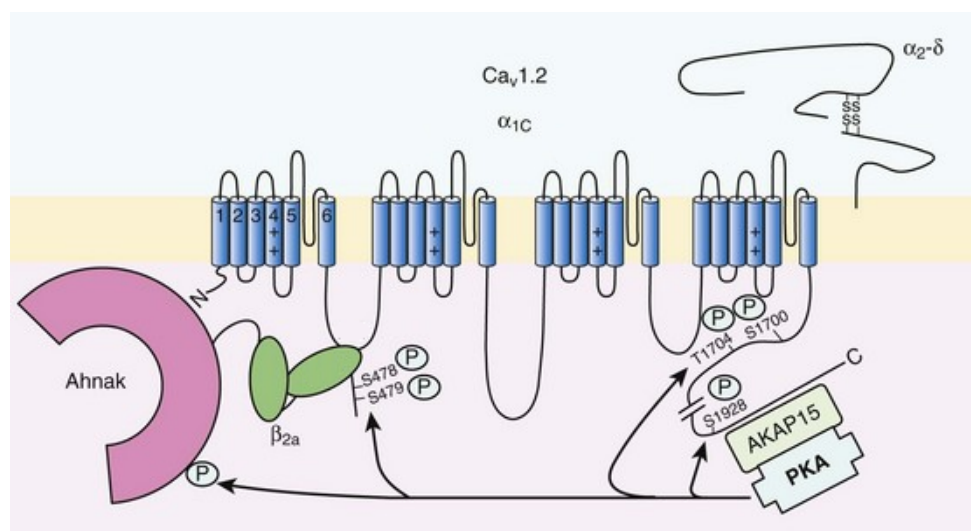


Figure 3 Régulation du fonctionnement des $\text{Ca}_v1.2$ par la PKA. AKAP15 est une protéine d'ancrage. Schéma modifié d'après Leroy et Fischmeister (2015).

ii. Les canaux calciques de type T

La régulation de ces canaux est encore mal connue dans les cardiomyocytes. À l'inverse des canaux de type L, il est classiquement admis que les canaux calciques de type T ne sont pas affectés par les stimulations β_1 -adrénergiques (Bean 1985; Bonvallet et Rougier 1989). Toutefois, ce postulat n'est pas accepté à l'unanimité par la communauté scientifique (Li *et al.* 2012).

La phosphorylation des canaux T par la calmoduline kinase II (CaMKII) augmente leur probabilité d'ouverture (Bean 1985).

B. Étape 2 : La libération autocatalytique du calcium par le réticulum sarcoplasmique

1. Généralités

La libération autocatalytique du calcium du réticulum sarcoplasmique survient immédiatement après l'entrée des ions Ca^{2+} par les canaux calciques sensibles au voltage. Ces ions calcium se trouvent à proximité des récepteurs de la ryanodine, principalement de type 2² (RyR2) qui sont des récepteurs-canaux de la membrane du réticulum sarcoplasmique activés par le calcium. La fixation du calcium sur ces récepteurs entraîne donc leur ouverture, et une partie du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique diffuse dans le cytoplasme (Fabiato 1983). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente rapidement d'une concentration initiale d'environ 100 nM ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ du cardiomyocyte au repos) à environ 2 μM ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ au pic de libération) (Puglisi *et al.* 1999). Cette valeur varie selon le type de cardiomyocyte et l'espèce étudiée. Ce phénomène de libération autocatalytique du calcium est aussi connu sous le nom de *Calcium-Induced Calcium Release* (CICR) (Fabiato 1983). Le calcium libéré se lie ensuite aux protéines contractiles et permet la contraction du cardiomyocyte.

2. Régulation du fonctionnement des RyR2

La régulation du fonctionnement des RyR2 est extrêmement fine. Ce récepteur-canal est un complexe macromoléculaire constitué d'un canal et de nombreuses protéines régulatrices (Bers 2004) (Figure 4). Ces dernières sont situées dans le cytoplasme des cardiomyocytes, ainsi que dans la lumière et la membrane du réticulum sarcoplasmique. En plus des protéines régulatrices, son fonctionnement est contrôlé par plusieurs ions, le pH et le potentiel redox. Pour faciliter la lecture, seules les principales régulations sont présentées ici.

a. Rôle du calcium

Il s'agit de l'ion ayant le rôle régulateur le plus important pour le RyR2. Ce dernier possède deux sites de fixation du Ca^{2+} côté cytoplasmique : un site de haute affinité déclenchant l'ouverture du RyR2 – il s'agit du site sur lequel se fixe le calcium lors du CICR ; et un site de

² Des récepteurs de la ryanodine de type 3 seraient également présents dans les cardiomyocytes de VP chez la souris (Rietdorf, Bootman, et Sanderson 2014).

faible affinité, responsable de l'inactivation du RyR2 pour des $[Ca^{2+}]_i$, de l'ordre du millimolaire.

Le calcium situé dans la lumière du réticulum sarcoplasmique joue également un rôle régulateur : si le stock de calcium est trop bas, l'ouverture des RyR2 est bloquée jusqu'à l'obtention d'une concentration suffisante (Terentyev *et al.* 2002).

b. Rôle des protéines cytoplasmiques

La PKA joue un rôle majeur dans l'augmentation de la conductance des RyR2, par l'intermédiaire d'autres protéines régulatrices telles que la calstabine 2 et la sorcine.

La calstabine 2 (ou FKBP12.6) est probablement la protéine la plus impliquée dans le contrôle de l'ouverture des RyR2. Il s'agit d'une enzyme fixée sur chaque sous-unité du RyR2 qui permet d'augmenter la coopérativité entre les sous-unités d'un même canal, mais également inter-canaux (Yano *et al.* 2000). Sa dissociation du RyR2 favorise la pleine conductance du canal en augmentant sa probabilité et son temps moyen d'ouverture (Brillantes *et al.* 1994). La dissociation de la calstabine 2 du RyR2 est favorisée par la phosphorylation de ce dernier par la PKA (Lehnart, Wehrens, et Marks 2004).

La sorcine est une petite protéine exerçant une action inhibitrice sur le RyR2. Cette inhibition est levée lorsque la sorcine est phosphorylée par la PKA (Farrell *et al.* 2003; Seidler *et al.* 2003).

La CaMKII, quant à elle, peut phosphoryler le RyR2 sur un site différent de la PKA, ce qui augmente la probabilité d'ouverture du canal, sans induire la dissociation de la calstabine 2 (Witcher *et al.* 1991). Cette augmentation de la probabilité d'ouverture est cependant moins marquée que lors de la phosphorylation par la PKA (Wehrens *et al.* 2004).

c. Rôle des protéines transmembranaires

Ces protéines transmembranaires sont : la triadine, la junctine, la junctate et les junctophilines. La junctophiline-2 stabiliserait l'état fermé des RyR2. Sa dissociation des RyR2 entraînerait une fuite de calcium, laquelle serait impliquée dans des arythmies atriales comme dans certains cas de FA (Beavers *et al.* 2013).

d. Rôle des protéines lumineales

La calsésquestrine (CSQ) est une protéine ayant un grand pouvoir chélateur de l'ion calcium : chaque molécule peut complexer environ 40 ions Ca^{2+} (Figure 4). Ceci permet le stockage d'une grande quantité de calcium dans la lumière du réticulum sarcoplasmique. Son rôle régulateur sur le RyR2 est encore très discuté : elle participerait, avec la junctine et la triadine, à l'inhibition du fonctionnement de ce récepteur-canal si la concentration calcique lumineale est faible, et à son activation si cette concentration est forte (Blayney et Lai 2009).

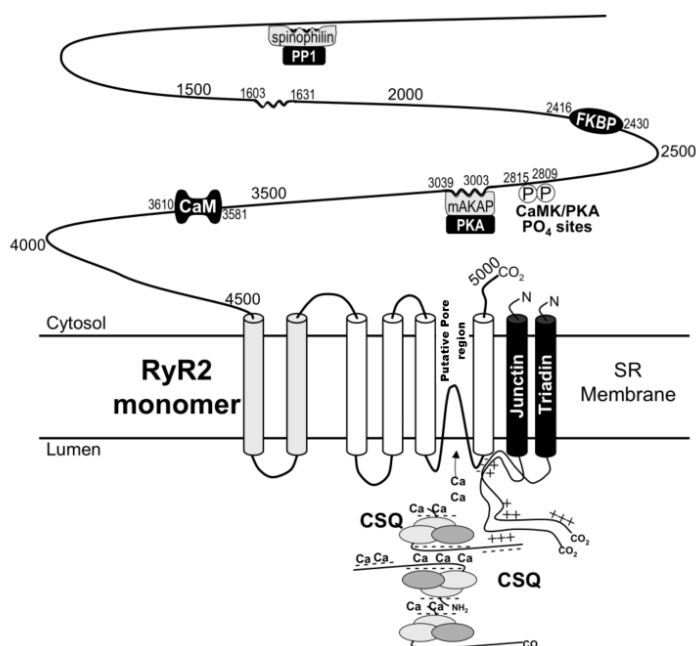


Figure 4 Schéma simplifié du complexe macromoléculaire du RyR2 et d'une partie des protéines régulatrices associées (d'après Bers *et al.* (2004)). mAKAP est une protéine d'ancrage, et PP1 est la protéine phosphatase 1.

3. Optimisation du CICR par le réseau de tubules transverses

a. Le réseau de tubules transverses des cardiomyocytes

L'efficacité du CICR est fortement dépendante de la proximité spatiale entre les $\text{Ca}_v1.2$ et les RyR2. Ce couple forme une unité fonctionnelle de libération calcique appelée dyade.

Dans les cardiomyocytes ventriculaires, la proximité de ces deux protéines est optimisée par une organisation particulière de la membrane plasmique. Celle-ci forme des invaginations à intervalles réguliers dans le cytoplasme du cardiomyocyte appelées tubules transverses (TT). Ils permettent l'augmentation de la surface d'échange entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme et portent la majorité des $\text{Ca}_v1.2$. Ces derniers se retrouvent donc présents à proximité des RyR2, à la fois en périphérie et au centre du cardiomyocyte (Figure 5). Cette architecture membranaire réduit à un nombre négligeable les RyR2 orphelins de $\text{Ca}_v1.2$. Grâce à ce réseau de tubules, le transitoire calcique généré lors du CICR est homogène et synchrone dans tout le volume du cardiomyocyte. L'effet du CICR en est renforcé.

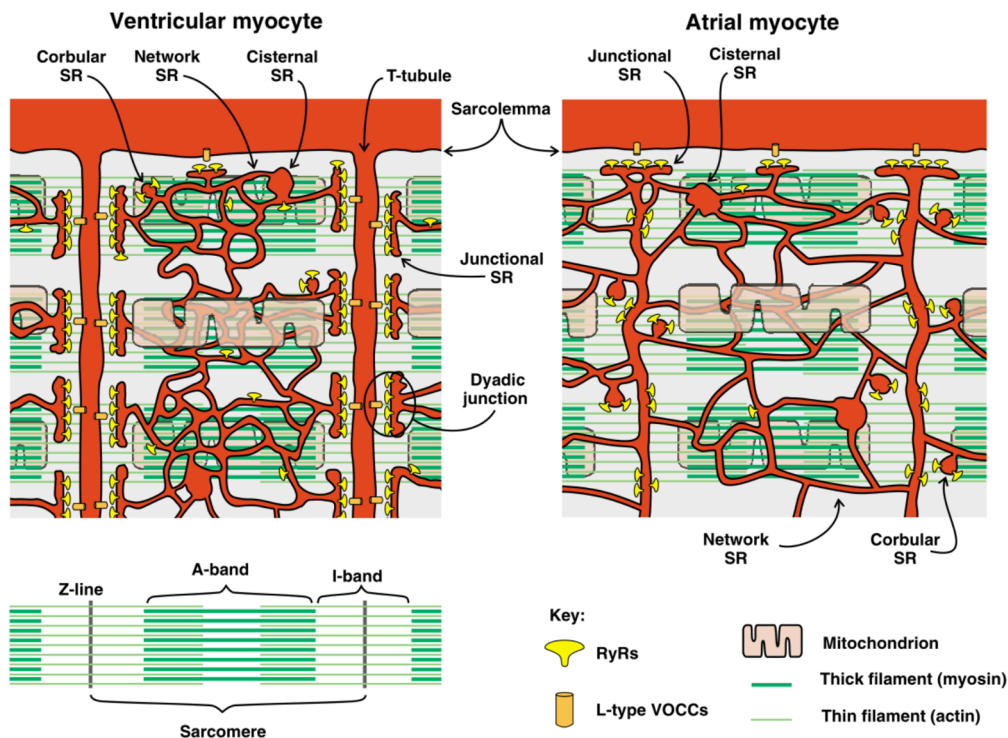


Figure 5 Représentation schématique de l'organisation du réticulum sarcoplasmique et des récepteurs de la ryanodine par rapport aux canaux calciques dans les cardiomyocytes de ventricule gauche (à gauche) présentant un réseau de tubules bien organisé transversalement et d'oreillette gauche (à droite) ne présentant pas de tubules (modifié d'après Bootman *et al.* (2006)).

Dans les cardiomyocytes atriaux, il est classiquement admis que les TT sont faiblement développés, voire absents, comme chez les petits animaux tels que le rat et le chat, tandis qu'ils seraient plus présents chez l'Homme et les grands animaux tels que le mouton, le cochon, la vache et le cheval (Huser, Lipsius, et Blatter 1996; McNutt et Fawcett 1969; Richards *et al.* 2011). Toutefois, la réalité semble beaucoup plus complexe puisqu'il existe des variabilités inter-régionales de densité de tubules au sein des tissus d'oreillette de rat et de cochon : les cardiomyocytes de l'épicarde présenteraient une plus forte densité de TT que les cardiomyocytes de l'endocarde (Frisk *et al.* 2014). Il est probable qu'il en soit de même chez l'Homme, car l'existence de tubules dans les cardiomyocytes atriaux humains n'est pas mise en évidence par toutes les études et n'est pas constante d'un cardiomyocyte à l'autre au sein d'une même étude (Figure 6) (Legato 1973; Richards *et al.* 2011). Par ailleurs, les cardiomyocytes humains sont généralement obtenus à partir de patients malades. Or les tubules sont des structures labiles qui peuvent être altérées par différentes conditions pathologiques (*e.g.* tachycardie) (Wakili *et al.* 2010).

Dans tous les cas, les tubules sont globalement moins présents dans les cardiomyocytes auriculaires que dans les cardiomyocytes ventriculaires. Le nombre de dyades y est donc plus faible (Figure 5). Cette différence d'organisation structurelle induit des différences de

fonctionnement du CICR entre les cardiomyocytes ventriculaires et auriculaires et a des conséquences sur la répartition spatiale des événements calciques spontanés (cf. partie « Les sparks calciques spontanés » page 43).

Dans les CM de VP, très peu d'informations sont disponibles concernant la présence et l'organisation des tubules transverses. Seule une étude réalisée chez le rat suggère l'existence d'un réseau de tubules semblable à celui des cardiomyocytes ventriculaires (Okamoto *et al.* 2012).

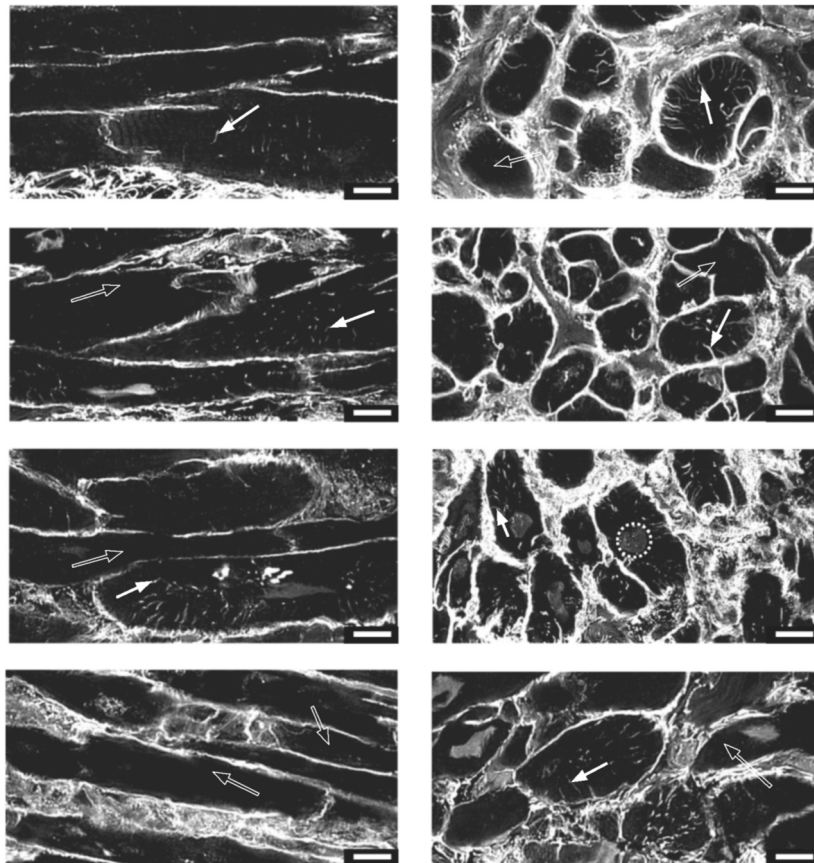


Figure 6 Marquages fluorescents des membranes dans des coupes histologiques d'oreillette gauche humaine (modifiée d'après Richards *et al* (2011)).

Les cardiomyocytes sont observés en coupe longitudinale (panneau de gauche) et en coupe transversale (panneau de droite). Des tubules sont clairement visibles dans un certain nombre de myocytes (flèches blanches) et absent dans certains autres (flèches évidées).

Un marquage non spécifique des noyaux des cardiomyocytes est également visible (cercle discontinu). Les barres d'échelles représentent 10 µm.

b. Relation architecture membranaire-efficacité du CICR

Plusieurs études réalisées en microscopie confocale ont montré l'impact du réseau de tubules transverses des cardiomyocytes sur la variation spatiotemporelle de la $[Ca^{2+}]_i$ (Kirk *et al.* 2003; Brette et Orchard 2003). En effet, l'augmentation locale du calcium cytoplasmique suite à une stimulation électrique du cardiomyocyte est dépendante de la distance de la zone étudiée par rapport aux canaux calciques, et donc par rapport à la membrane plasmique. Les types de transitoires calciques sont généralement classés en fonction de leur forme observée en microscopie confocale (Figure 7) :

– les transitoires calciques homogènes dans tout le volume cytoplasmique, dits en *I* (Figure 7-A), sont retrouvés dans les cardiomyocytes dont le réseau de tubules est bien développé dans tout le cardiomyocyte, et qui présentent très peu de RyR2 orphelins de canaux calciques. C'est le cas dans les myocytes ventriculaires ;

– les transitoires calciques dits en *U* (Figure 7-B) sont retrouvés dans les cardiomyocytes dépourvus de TT. Ils possèdent un grand nombre de RyR2 orphelins de canaux calciques en leur centre, et ne présentent donc une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ qu'en périphérie de la cellule. Tel est le cas dans certains myocytes auriculaires chez le rat et chez l'Homme (Kirk *et al.* 2003; Hatem *et al.* 1997). Il est néanmoins à noter que la libération calcique par les RyR2 périphériques peut parfois activer les RyR2 se trouvant à proximité. Il en résulte alors une propagation de proche en proche à caractère centripète du transitoire calcique. Ce genre de propagation en chaîne du transitoire calcique est rarement observé dans les conditions basales, en raison de la faible diffusion des ions calcium dans le cytoplasme et de leur séquestration rapide par les SERCA et les mitochondries. En revanche, il peut être observé lors d'une stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques ou lors de l'augmentation de la quantité d' IP_3 intracytoplasmique. Cette modification de la forme du transitoire serait un des mécanismes à l'origine de l'effet inotrope positif observé dans les cardiomyocytes auriculaires suite à l'activation du système nerveux sympathique (Mackenzie *et al.* 2004) ;

– les transitoires calciques dits en *W* (Figure 7-C), qui correspondent à des niveaux intermédiaires de développement des tubules transverses et donc à une forme intermédiaire, entre *I* et *U*, des transitoires calciques.

Chez le rat, en conditions basales, les cardiomyocytes atriaux présentent principalement des transitoires en *U* et en *W*, alors que des transitoires en *I* sont observés dans les cardiomyocytes ventriculaires. Subséquemment, la contraction basale des cardiomyocytes ventriculaires est plus grande que celle des cardiomyocytes atriaux, du fait de la libération de calcium plus grande et plus homogène dans le cytoplasme, et donc de la mobilisation d'un plus grand nombre de protéines contractiles (Smyrniyas *et al.* 2010; Mackenzie *et al.* 2004).

Dans les cardiomyocytes de VP, la forme des transitoires calciques n'a jamais été étudiée.

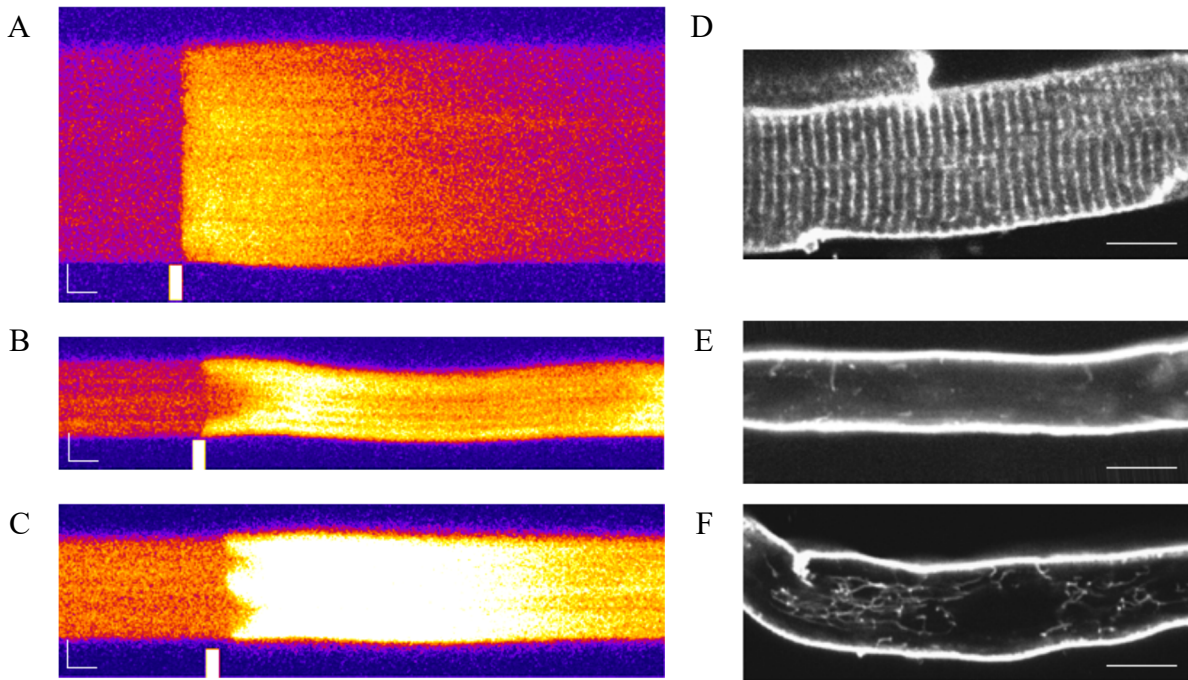


Figure 7 Illustration en fausses couleurs des différentes formes de transitoires calciques dans les cardiomyocytes selon leur type de réseau de tubules transverses (modifié d'après Kirk *et al.* (2003)). Les transitoires en I (A) ayant un départ synchrone dans toute la largeur de la cellule, en U (B) ayant un départ synchrone aux deux extrémités de la cellule, à proximité de la membrane plasmique et en W (C) ayant un départ synchrone aux deux extrémités de la cellule et en certaines zones au centre. Ces transitoires sont obtenus en microscopie confocale (mode *linescan*). Les fausses couleurs sont d'autant plus chaudes que la concentration calcique est élevée. Le rectangle blanc indique le moment de la stimulation électrique des cardiomyocytes, les barres d'échelles représentent 40 ms (X) et 4 µm (Y). Les transitoires correspondent respectivement à des enregistrements le long de l'axe transversal des cardiomyocytes de ventricule gauche (D) et d'oreillette gauche (E et F). Ces derniers sont également observés en microscopie confocale avec un marquage fluorescent permettant de révéler les membranes et donc le réseau des tubules transverses. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

C. Étape 3 : La contraction du cardiomyocyte

Dans les cardiomyocytes, le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique lors du CICR est à l'origine du coulisement des filaments épais de myosine par rapport aux filaments fins d'actine au sein d'une structure contractile élémentaire, le sarcomère (Figure 8-A). Ceci aboutit *in fine* à la contraction de la cellule. Pour réaliser ce mouvement, la tête de myosine doit se fixer à un site du filament fin d'actine situé face à elle.

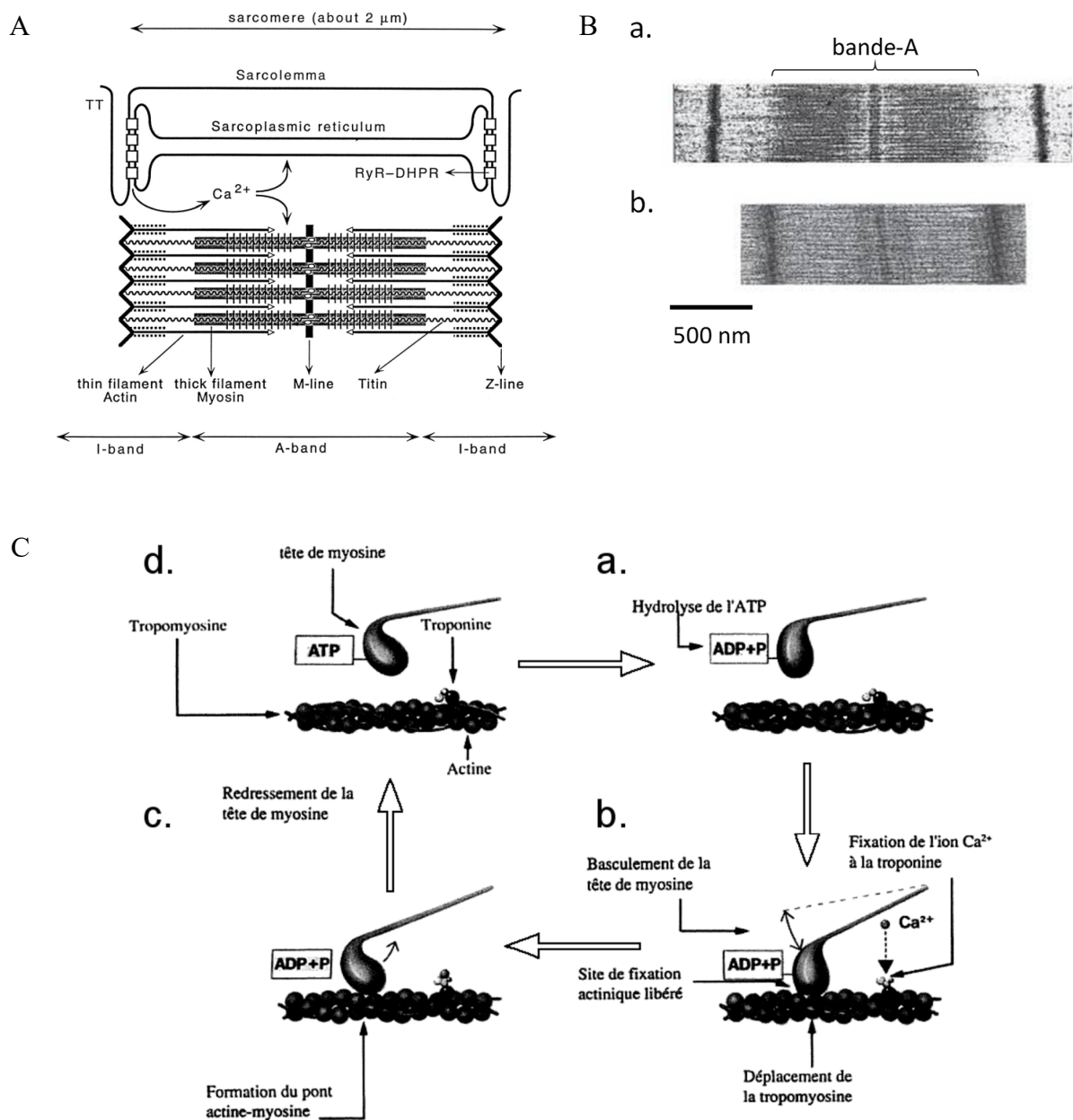


Figure 8 A : Machinerie contractile des cardiomyocytes. Schéma de la structure des sarcomères (modifié d'après Schaub *et al.* (1998)).

DHPR correspond aux canaux calciques de type $Ca_v1.2$ et TT aux tubules transverses ; B : sarcomères relâchés (Ba) et contractés (Bb) observés en microscopie électronique à transmission ; (C) Cycle d'attachement et de détachement des ponts actine-myosine dans les sarcomères pendant la contraction du cardiomyocyte. Les étapes a, b, c et d sont décrites ci-dessus (modifié d'après Poortmans *et al.* (2009)).

Quand la cellule est dans un état relâché, le site permettant la liaison de la myosine à l'actine est masqué par la troponine I (TnI), qui est une protéine appartenant au complexe formé par les troponines C (TnC), T (TnT), et la tropomyosine, associé au filament d'actine (Figure 8-Ca). Lorsque le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique se lie à la troponine C, la conformation du complexe formé par les troponines est modifiée et la tropomyosine est

déplacée. Le site de fixation de la myosine à l'actine n'est donc plus masqué et la tête de myosine peut se fixer au filament d'actine (Figure 8-Cb) (Bers 2000).

Par la suite, la libération d'une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) et d'un phosphate inorganique (Pi) présents sur le site de liaison de l'ATP de la myosine permet à la tête de myosine d'effectuer une rotation de 45° par rapport à sa queue. Ce mouvement produit ainsi un déplacement du filament d'actine par rapport au filament de myosine et donc le raccourcissement des sarcomères qui provoque la contraction du cardiomyocyte (Figure 8-Cc). Le site de liaison de l'ATP se trouve alors à nouveau libre et une nouvelle molécule d'ATP peut venir s'y fixer. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP induit la rupture du pont actine-myosine par diminution d'affinité : la tête de myosine se détache donc du filament d'actine (Figure 8-Cd). L'hydrolyse de la nouvelle molécule d'ATP en ADP et Pi libère alors de l'énergie, ce qui permet à la tête de myosine de revenir à sa position initiale. Les filaments sont alors prêts pour un nouveau cycle de contraction (Figure 8-Ca) (Poortmans et Boisseau 2009).

D. Étape 4 : La diminution de la concentration calcique cytoplasmique

1. Généralités

La relaxation du cardiomyocyte débute lorsque la $[Ca^{2+}]_i$ diminue. Le retour à une faible $[Ca^{2+}]_i$ est principalement assuré par deux mécanismes concomitants :

– l'arrêt de l'entrée du calcium dans le cytoplasme. Celui-ci est dû, d'une part, à l'inactivation des canaux calciques sensibles au voltage et, d'autre part, à la fermeture des RyR2 ;

– la sortie du calcium libéré par la troponine C du cytoplasme. La sortie du calcium du cytoplasme est opérée par plusieurs mécanismes dont l'importance relative varie selon l'espèce et le type de cardiomyocyte. Ces mécanismes, illustrés par la Figure 9, sont :

- la recapture du calcium cytoplasmique par le réticulum sarcoplasmique *via* la pompe calcique ATPase de la membrane du réticulum sarcoplasmique la SERCA2a, qui est l'isoforme présente dans les cardiomyocytes ;
- l'extrusion du calcium vers le milieu extracellulaire par l'échangeur Na^+-Ca^{2+} (NCX) ;
- l'extrusion ou la séquestration de calcium par des mécanismes dits « lents », car leur importance relative est moindre par rapport aux deux mécanismes

précédents. Il s'agit notamment de l'extrusion du calcium vers le milieu extracellulaire par la pompe calcique ATPase de la membrane plasmique (PMCA), et de la séquestration du calcium par les mitochondries.

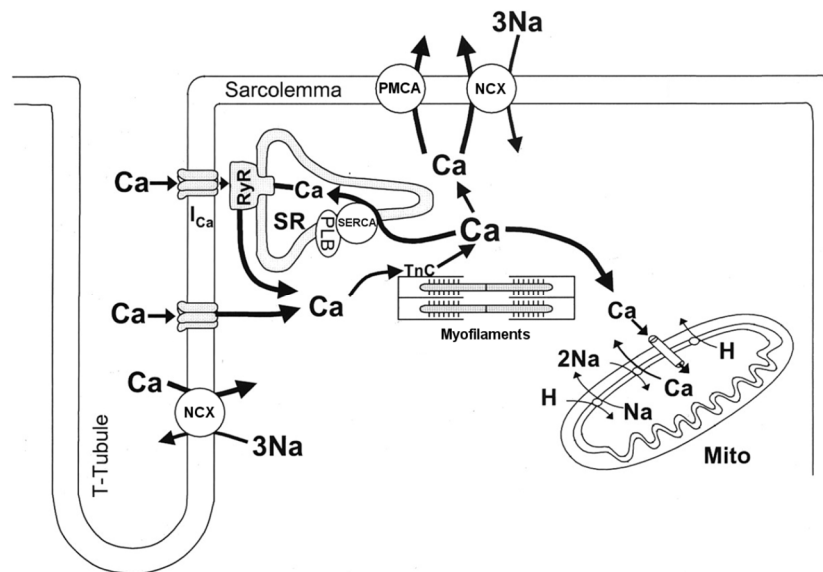


Figure 9 Schéma général du cycle du calcium dans les cardiomyocytes (modifié d'après Bers *et al.* (2000)).

2. La recapture calcique par la SERCA2a

a. Généralités

La SERCA2a est une pompe ATPase chargée du transfert des ions Ca^{2+} présents dans le cytoplasme vers le réticulum sarcoplasmique.

Quel que soit le type de cardiomyocyte, il s'agit de la principale protéine responsable de la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fin de transitoire calcique.

b. Mécanismes régulateurs

Les principaux régulateurs du fonctionnement de la SERCA2a sont deux protéines : le phospholamban (PLN) et la sarcolipine.

➤ Le phospholamban

Lorsqu'il est fixé à la SERCA2a, le PLN diminue la recapture du calcium vers le réticulum sarcoplasmique (RS) en déplaçant la sensibilité de la SERCA2a vers des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plus élevées. Il faut donc une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plus élevée pour que celle-ci s'active.

Le PLN peut se dissocier de la SERCA2a lorsqu'il est phosphorylé par la PKA (e.g. lors d'une stimulation β_1 -adrénergique), par la CaMKII, ou par les SOF kinases (« *State Of Filling* » kinases ; enzymes activées par la déplétion des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique) (Gustavsson *et al.* 2013; Mattiazzi *et al.* 2005; Bhogal et Colyer 1998) (Figure 10). *In vitro*, il a été montré que le PLN pouvait également être phosphorylé par les protéines kinases C (PKC), mais cet effet n'a pas encore été retrouvé *in vivo* (Kranias et Hajjar 2012).

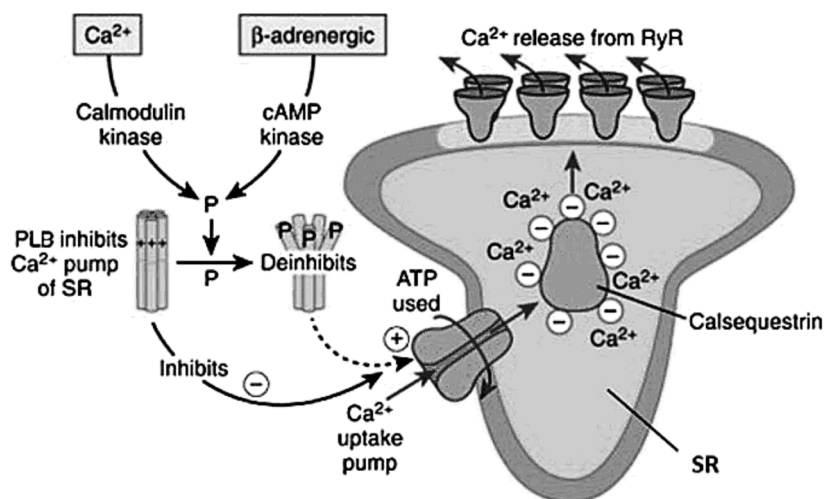


Figure 10 Schéma simplifié de la régulation du fonctionnement de la SERCA2a par la phospholamban (d'après Braunwald (2013)).

➤ La sarcolipine

La sarcolipine (SLN) est une protéine structurellement proche du PLN. Comme ce dernier, elle inhibe la SERCA2a en s'y fixant. Elle peut également se fixer au PLN lorsqu'il est lui-même fixé à la SERCA2a ; il se forme alors le complexe SERCA-PLN-SLN, qui est plus stable que le complexe SERCA-PLN et qui a une action super-inhibitrice sur la SERCA2a (Asahi *et al.* 2003; Asahi *et al.* 2004).

c. Fonctionnement des SERCA dans les différents types de cardiomyocytes

Chez le rat, la cinétique d'extrusion du calcium par les SERCA est plus rapide dans les cardiomyocytes d'oreillette que dans ceux de ventricule gauche. Elle contribue ainsi de manière plus importante à la diminution de la concentration calcique cytoplasmique : la part de calcium éliminée du cytoplasme par la SERCA est d'environ 93 % dans les cardiomyocytes atriaux tandis qu'elle ne représente que 83 % dans les cardiomyocytes ventriculaires (Walden, Dibb, et Trafford 2009).

Ceci est notamment expliqué par une expression plus importante de la SERCA2a dans les cardiomyocytes d'oreillette que dans ceux de ventricule. Par ailleurs, l'expression du PLN est plus faible dans les cardiomyocytes d'oreillette, bien qu'elle soit contrebalancée par une expression plus importante de la SLN dans ce type de cardiomyocytes (Lüss *et al.* 1999; Babu *et al.* 2007; Walden, Dibb, et Trafford 2009).

Ces différences observées entre les deux types de cardiomyocytes seraient à l'origine de la diminution plus rapide des transitoires calciques dans les cardiomyocytes d'oreillette que dans ceux de ventricule (Lüss *et al.* 1999; Bokník *et al.* 1999).

Dans les cardiomyocytes de VP, le fonctionnement de la SERCA n'a, à notre connaissance, jamais été exploré.

3. *L'élimination du calcium par l'échangeur sodium-calcium*

a. Généralités

Le deuxième mécanisme de sortie de calcium du cytoplasme est l'élimination par l'échangeur sodium-calcium de type 1 (NCX).

Le NCX est un antiport de la membrane plasmique capable d'utiliser l'énergie fournie par le gradient électrochimique transmembranaire pour échanger un ion Ca^{2+} contre trois ions Na^+ de part et d'autre de la membrane plasmique. Ce transfert ionique transmembranaire peut s'effectuer dans les deux sens. Par convention, le sens de transfert « normal », qui intervient dans la phase de diminution du transitoire calcique correspond à l'extrusion du cytoplasme d'un ion Ca^{2+} et à l'entrée simultanée de trois ions Na^+ . Le transfert en sens opposé correspond au mode « inverse ». Le NCX constitue un système d'efflux du calcium cytoplasmique dit de faible affinité et de forte capacité. Il contrôle les fortes fluctuations de calcium et de sodium cytoplasmique, contrairement aux mécanismes de forte affinité et de faible capacité, tels que les pompes calciques ATPases de la membrane plasmique, qui assurent une régulation plus fine de la concentration en calcium cytoplasmique.

Le NCX est distribué partout dans la membrane plasmique, y compris dans les tubules transverses. L'organisation du réseau des tubules transverses est donc un élément déterminant de la cinétique d'extrusion calcique par cet échangeur.

b. Mécanismes régulateurs du NCX

Le potentiel électrique transmembranaire détermine le sens de fonctionnement (normal ou inverse) du NCX. La valeur seuil de potentiel à partir de laquelle le sens de fonctionnement du NCX est inversé est appelée potentiel d'inversion ($E_{Na/Ca}$). Celui-ci est variable d'une cellule à l'autre autant qu'au sein d'une même cellule, car elle dépend des gradients de concentration de calcium et de sodium transmembranaires (Herchuelz, Van Eylen, et Lebrun 2013). La valeur du potentiel d'inversion est généralement de l'ordre de -40 mV ; pour des valeurs inférieures, il fonctionne en mode normal (sortie de calcium et entrée de sodium), pour des valeurs supérieures, il fonctionne en mode inverse (entrée de calcium et sortie de sodium) (Figure 11).

Le fonctionnement du NCX serait également régulé par sa phosphorylation par les PKA et PKC. Bien que leurs effets ne soient pas clairement établis, il semblerait que la PKA stimule son fonctionnement (Zhang et Hancox 2009; Chase et Orchard 2011).

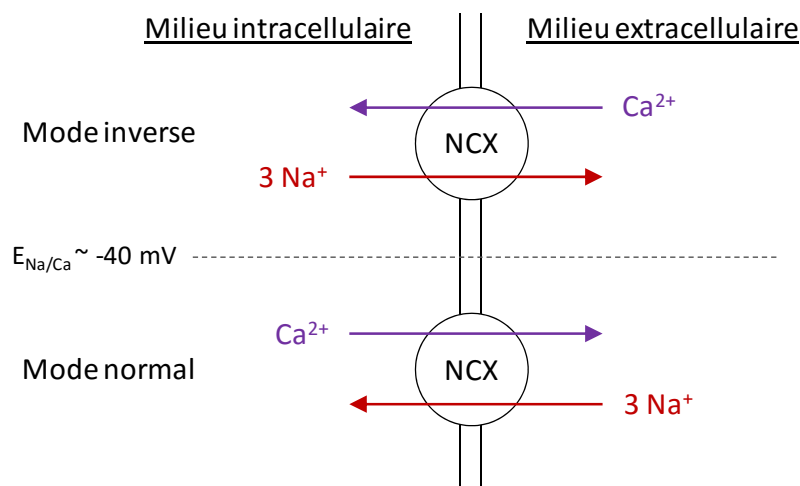


Figure 11 Modes de fonctionnement de l'échangeur Na^+-Ca^{2+} .

c. Fonctionnement du NCX dans les différents types de cardiomyocytes

Dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat, pendant le transitoire calcique, l'élimination du calcium cytoplasmique par le NCX représente environ 8 % de la totalité du calcium extrudé (Negretti, O'Neill, et Eisner 1993; Chase et Orchard 2011; Pásek *et al.* 2008). Dans l'oreillette, elle représente environ 6 % de la totalité du calcium extrudé (Walden, Dibb, et Trafford 2009).

Dans les CM de VP, la proportion du calcium cytoplasmique éliminé par le NCX pendant un transitoire calcique n'a jamais été étudiée. En revanche, le courant

transmembranaire généré par le NCX a été mesuré chez le chien et comparé à celui des CM d'OG. Aucune différence de densité de courant d'échange n'a été constatée entre les CM de VP et les CM d'OG (Ehrlich *et al.* 2003).

4. *L'élimination calcique par les PMCA et la séquestration par les mitochondries*

Les PMCA et les mitochondries contribuent à l'abaissement de la $[Ca^{2+}]_i$ mais leur rôle est généralement considéré comme mineur dans la phase de décroissance du transitoire calcique. Chez le rat, selon les études, la somme de leurs contributions à la diminution du calcium cytoplasmique des cardiomyocytes ventriculaires varierait entre 1 et 6 % (J. W. Bassani, Bassani, et Bers 1994; Chase et Orchard 2011). Dans les cardiomyocytes auriculaires de cette même espèce, elle serait de l'ordre de 1 % (Walden, Dibb, et Trafford 2009). La contribution de ces mécanismes à la diminution du calcium cytoplasmique n'a jamais été étudiée dans les CM de VP.

E. Étape 5 : La relaxation des cardiomyocytes

Le retour des cardiomyocytes à leur longueur de repos survient suite au détachement des ponts actine-myosine consécutif à l'abaissement de la concentration calcique cytoplasmique. La titine, qui constitue le troisième filament de la machinerie contractile, assure le retour du cardiomyocyte à sa longueur de repos (Figure 8-A). Cette protéine s'étend de la strie-Z à la ligne-M des sarcomères et joue le rôle d'élastique moléculaire. Elle exerce donc une force de « rappel » qui permet la restitution de la longueur initiale des sarcomères (Trinick 1996; Helmes, Trombita's, et Granzier 1996). Cette force de rappel, qui détermine la rigidité de la cellule, dépend des isoformes de titine exprimées dans les cardiomyocytes. La proportion des différentes isoformes varie entre les cardiomyocytes d'oreillette et de ventricule, ce qui peut expliquer la différence de longueur diastolique des cardiomyocytes entre oreillette et ventricule (Cazorla *et al.* 2000). Le rôle de la titine dans la relaxation des CM de VP n'a jamais été exploré.

II. Variations spontanées de la concentration calcique cytoplasmique dans les cardiomyocytes

A. Généralités

Les échanges calciques décrits dans la partie précédente font suite à une excitation électrique du cardiomyocyte. Néanmoins, en absence d'excitation, des fluctuations localisées (les *sparks*) ou globales (les *waves*) de la $[Ca^{2+}]_i$ peuvent également se produire. Ces événements surviennent dans les cardiomyocytes isolés ainsi que dans les tissus cardiaques sains, mais peuvent dans certains cas participer au déclenchement d'arythmies.

B. Les *sparks* calciques spontanés

1. Définition et caractéristiques

Les *sparks* calciques spontanés sont des élévations ponctuelles et transitoires de la $[Ca^{2+}]_i$ qui, dans les cardiomyocytes, résultent de l'activation synchrone d'une centaine de RyR2 (Heping Cheng et Lederer 2008) (Figure 12).

Ils ont une durée de quelques dizaines de millisecondes, une étendue volumique estimée à 8 fL et un pic moyen d'amplitude culminant entre 200 et 300 nM dans les cardiomyocytes ventriculaires (Heping Cheng et Lederer 2008). Cette $[Ca^{2+}]_i$ est insuffisante pour activer les ponts actine-myosine. Individuellement, ces *sparks* n'ont donc aucun effet sur la contraction des cardiomyocytes.

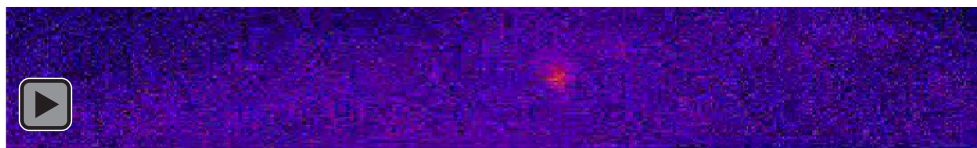


Figure 12 Image de microscopie confocale en fausses couleurs de *sparks* calciques spontanés dans le cytoplasme d'un cardiomyocyte.

Les fausses couleurs sont d'autant plus claires que la concentration calcique est élevée. (NB animation visible uniquement sur la version numérique de ce document). Des illustrations non animées de *sparks* sont disponibles page 135.

2. Cause/Origine

Beaucoup d'hypothèses ont été avancées pour expliquer la survenue des *sparks*. Selon l'hypothèse la plus soutenue, les *sparks* spontanés surviendraient sans entrée préalable de calcium par les canaux calciques, mais seraient dus à la faible probabilité d'ouverture des RyR2

à la concentration calcique diastolique (Cheng, Lederer, et Cannell 1993; Cannell, Cheng, et Lederer 1994; Heping Cheng et Lederer 2008).

Les *sparks* surviennent principalement à proximité de la membrane plasmique. Pour cette raison, dans les cardiomyocytes ventriculaires qui possèdent un réseau de tubules bien développé, les *sparks* apparaissent partout dans la cellule, alors que dans les cardiomyocytes d'oreillette gauche qui présentent peu de tubules, les *sparks* apparaissent principalement en périphérie de la cellule (Woo, Cleemann, et Morad 2005; Sheehan, Zima, et Blatter 2006; Orchard, Bryant, et James 2013). Une explication à ce phénomène serait l'existence d'une interaction physique entre la partie C-terminale de la sous-unité α_1c des canaux calciques présents dans les tubules et les RyR2 du réticulum sarcoplasmique qui favoriserait la survenue des *sparks* (Woo, Soldatov, et Morad 2003).

3. Facteurs favorisants

Plusieurs facteurs capables de moduler la fréquence de survenue des *sparks* ont été mis en évidence. Les principaux sont :

– la charge calcique du réticulum sarcoplasmique. Un réticulum fortement chargé en calcium augmente la probabilité de survenue et l'amplitude des *sparks* (Cheng *et al.* 1996). En revanche, une diminution de la charge calcique du réticulum sarcoplasmique par rapport à sa concentration physiologique n'induit pas de diminution de leur probabilité de survenue mais une diminution de leur amplitude (Song *et al.* 1998) ;

– la concentration calcique cytoplasmique. La probabilité d'ouverture des RyR2 est d'autant plus grande que la concentration calcique du cytoplasme est élevée ainsi, la fréquence des *sparks* est plus importante lorsque la $[Ca]_i$ est élevée (Sato, Blatter, et Bers 1997; Lipp et Niggli 1998; Heping Cheng et Lederer 2008). D'autre part, il a été montré que les *sparks* sont plus fréquents lorsque la membrane plasmique est faiblement polarisée (Sato *et al.* 2014).

C. Les waves

Lorsque plusieurs groupes de RyR2 s'activent au même moment dans une même zone du cardiomyocyte, l'ensemble des *sparks* générés peut provoquer une élévation de la concentration en calcium cytoplasmique suffisante pour activer l'ouverture de proche en proche d'autres RyR2. Cette réaction en chaîne appelée « *wave* », se manifeste par une vague de CICR capable de se propager dans toute la cellule (Figure 13).

Les *waves* calciques peuvent également se propager à travers plusieurs cardiomyocytes, voire à l'ensemble du tissu cardiaque (Li, Eisner, et O'Neill 2012; Hoeker *et al.* 2009). Cette propagation intercellulaire serait assurée par les jonctions gap, qui sont perméables aux ions Ca^{2+} (Toyofuku *et al.* 1998).

Les *waves* peuvent également être déclenchées dans le contexte particulier d'une non-uniformité de contraction des cardiomyocytes au sein d'un tissu cardiaque. Celles-ci seraient issues du décrochage des ions Ca^{2+} des troponines C au niveau des zones d'interface entre tissu contracté et tissu étiré (Wakayama *et al.* 2005; Miura *et al.* 2008).

Les *waves* peuvent être génératrices de dépolarisations membranaires, elles-mêmes pouvant être initiatrices d'arythmies.

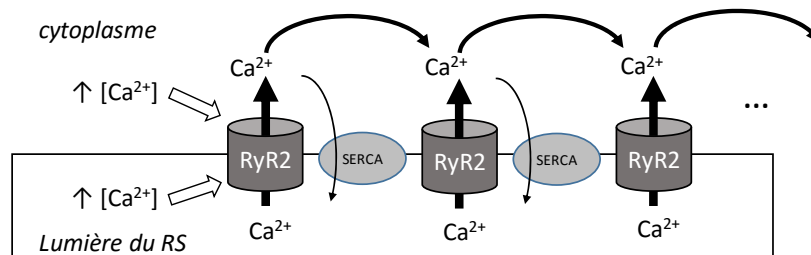


Figure 13 Schéma du mécanisme de propagation des *waves* calciques par le phénomène de *calcium-induced calcium release* dans le cytoplasme des cardiomyocytes.

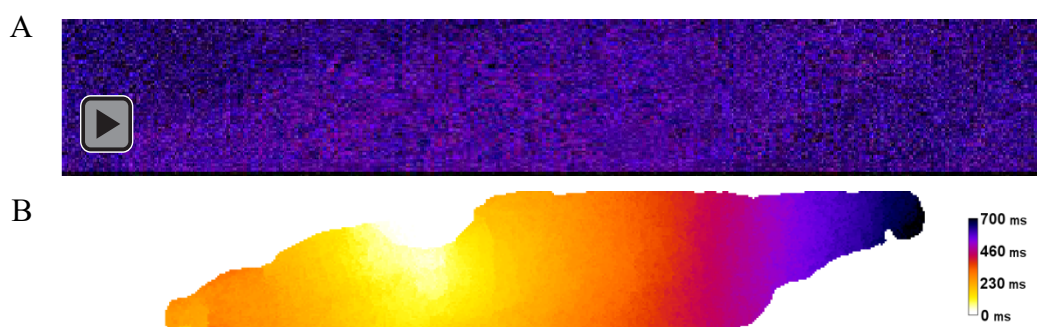


Figure 14 Exemple de déclenchement d'une *wave* calcique dans une zone à forte concentration spatiale et temporelle de *sparks* spontanés.
 (A) Enregistrement de l'activité calcique spontanée dans un cardiomyocyte de VP chargé en fluo-4 en microscopie confocale, ralenti vidéo : $\frac{1}{2}$. (NB animation visible uniquement sur la version numérique de ce document) (la méthode d'enregistrement est identique à celle utilisée pour l'enregistrement des transitoires calciques en microscopie confocale décrite page 92) ;
 (B) Carte de propagation en fausses couleurs de la *wave* calcique. Pour chaque zone, le délai d'apparition de la *wave* est d'autant plus précoce que la couleur est chaude.

D. *Waves* calciques et troubles du rythme : les post-dépolarisations tardives (DAD)

1. Mécanisme général

Les *waves* peuvent parfois engendrer des dépolarisations anormales de la membrane plasmique survenant entre deux potentiels d'action appelées post-dépolarisations tardives (ou *delayed after-depolarisation* (DAD)) (Figure 15).

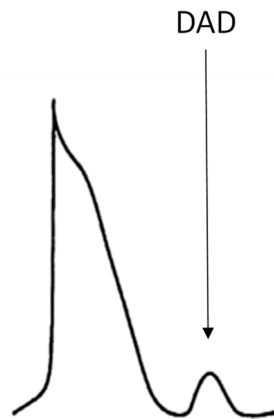


Figure 15 Schéma de potentiel d'action avec post-dépolarisation tardive (DAD) (modifié d'après Leenhardt *et al.* (2011)).

Le calcium libéré lors des *waves* est ensuite :

- recapturé par le réticulum sarcoplasmique *via* la SERCA ;
- ou extrudé du cytoplasme par les protéines membranaires chargées de cette fonction. Parmi celles-ci, on compte le NCX.

À chaque cycle d'échange, lorsque le NCX fonctionne en mode « normal » pour éliminer le calcium libéré lors de ces *waves*, trois ions Na^+ entrent dans le cytoplasme et un ion Ca^{2+} en sort. Le transport est donc électrogène : l'élimination du calcium cytoplasmique se fait au prix de la génération d'un courant dépolarisant (I_{ti} pour *transient inward*) porté par les ions sodium (Berlin, Cannell, et Lederer 1989). Ce courant, ainsi que d'autres courants activés par le calcium (*e.g.* le courant chlore), seraient à l'origine d'une dépolarisation transitoire. Celle-ci est susceptible d'engendrer un nouveau potentiel d'action, lui-même générateur d'arythmies : la post-dépolarisation tardive ou DAD (Schlotthauer et Bers 2000; Venetucci *et al.* 2008; Boyden, Dun, et Stuyvers 2015).

Bien que les *waves* ne soient pas systématiquement associées à la génération d'arythmies, il semble qu'une fréquence importante de *waves* dans les cardiomyocytes d'un tissu le prédispose au déclenchement d'arythmies (Wier *et al.* 1997). En effet, lorsque le

couplage électrique entre les myocytes est correct, des travaux de modélisation ont estimé que la propagation simultanée de *waves* dans environ 1000 cardiomyocytes était nécessaire pour entraîner une DAD suffisante pour générer un battement ectopique (Winslow *et al.* 1993).

Le caractère arythmogène des *waves* calciques spontanées a été mis en évidence dans plusieurs modèles expérimentaux :

– chez la souris la fréquence importante des *waves* calciques spontanées dans les cardiomyocytes de VP peut les faire échapper au rythme sinusal et promouvoir des arythmies (Rietdorf, Bootman, et Sanderson 2014) ;

– chez des souris transgéniques ayant des RyR2 mutés présentant une fuite du calcium plus importante que les souris de phénotype sauvage, le risque de développement d'une FA serait augmenté (Chelu *et al.* 2009) ;

– chez l'Homme, dans les myocytes auriculaires de patients en FA permanente, une plus grande fréquence des *sparks* spontanés et des *waves* a été constatée (Hove-Madsen *et al.* 2004).

2. Causes connues des DAD

Une dysrégulation des RyR2 par les protéines de ce complexe macromoléculaire peut être à l'origine des « fuites calciques » du réticulum sarcoplasmique.

a. La CaMKII

La calmoduline kinase II (CaMKII) a été récemment impliquée dans ces fuites. Une hyperphosphorylation des RyR2 par la CaMKII conduirait à une augmentation de leur probabilité d'ouverture, qui elle-même augmenterait la fréquence et l'amplitude des *sparks*. La probabilité de déclenchement de *waves* et par conséquent la fréquence des DAD s'en trouveraient donc également augmentées.

L'implication de la CaMKII dans la génération des *sparks* a été montrée chez la souris et chez l'Homme :

– chez les souris de phénotype sauvage, le site habituel de phosphorylation des RyR2 par la CaMKII est la sérine 2814. Or, il a été montré que chez les souris mutées,

l'hyperphosphorylation de la sérine 2814 augmentait la survenue des *sparks* dans les cardiomyocytes (Wehrens *et al.* 2004);

– chez l'Homme, le site de phosphorylation de la CaMKII est la thréonine 287. Lorsque ce site est hyperphosphorylé, la CaMKII serait suractivée, entraînant à son tour une hyperphosphorylation de la sérine 2814 des RyR2. Ce phénomène entraînerait donc, comme chez la souris, une augmentation de la fréquence des *sparks* (Neef *et al.* 2010; Voigt *et al.* 2012).

Cependant, ce mécanisme décrit dans les cardiomyocytes atriaux et considéré comme étant à l'origine de l'augmentation anormale de la survenue des *sparks* chez les patients souffrant de fibrillation atriale n'est peut-être pas le seul impliqué.

b. La calstabine 2

La calstabine 2 (FKBP12.6), a été mise en cause dans les fuites calciques du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes ventriculaires. Une hyperphosphorylation des RyR2 serait à l'origine d'une mauvaise interaction entre la calstabine 2 et les RyR2 (Marx *et al.* 2000), entraînant à leur tour des fuites calciques du réticulum sarcoplasmique dans ces cardiomyocytes. Ce phénomène a été mis en évidence chez des patients insuffisants cardiaques, qui ont la particularité d'avoir des cardiomyocytes dont le réticulum sarcoplasmique présente plus de fuites calciques que celui des sujets sains.

Des mutations de la calstabine 2 seraient également à l'origine de la perturbation de l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes auriculaires. En effet, il a été montré que les souris mutées n'exprimant pas cette protéine ont des cardiomyocytes auriculaires ayant des *sparks* plus fréquents, et sont plus sujettes au déclenchement de FA (Sood *et al.* 2008). Ce mécanisme n'a pas été étudié chez l'Homme.

c. L'ankyrine B

La mutation de l'ankyrine B entraînerait un défaut d'adressage des pompes et des récepteurs membranaires aux tubules transverses, ainsi qu'une réduction globale de la quantité de ces protéines membranaires dans les cardiomyocytes. Le défaut d'adressage et la réduction globale de la quantité de protéines membranaires affecteraient les mouvements calciques dans les cardiomyocytes augmentant ainsi la fréquence des *sparks* spontanés. Ces changements

augmenteraient donc également la fréquence des extrasystoles, fournissant ainsi un terrain propice au déclenchement d'arythmies (Mohler *et al.* 2003; Camors *et al.* 2012).

d. Amplification du risque de DAD dans la FA : le « *calcium-voltage coupling gain* »

Chez les patients souffrant de fibrillation atriale, le NCX est surexprimé (Voigt *et al.* 2012). Cette surexpression confère au NCX une plus grande importance relative dans l'extrusion du calcium cytoplasmique. Pour une même quantité de calcium cytoplasmique à extruder, le courant dépolarisant I_{ti} généré dans les cardiomyocytes auriculaires des patients souffrant de FA est plus important que chez les patients sains. On parle alors de « *calcium-voltage coupling gain* » ou de « variation de potentiel électrique membranaire induit par le calcium » plus grand. Le courant I_{ti} étant responsable de la dépolarisation, les post-dépolarisations tardives sont de fait plus fréquentes chez les patients souffrant de FA que chez les patients sains (Neef *et al.* 2010; Voigt *et al.* 2012).

e. Autres mécanismes aboutissant à la survenue de DAD

De nombreux autres mécanismes peuvent aboutir à l'augmentation ou à la diminution de la fréquence des *sparks* et donc à l'augmentation ou à la diminution de la fréquence des DAD. En effet, les RyR2 sont des complexes protéiques hautement régulés. Ces régulations peuvent être de nature endogène (*e.g.*, neurotransmissions noradrénergiques) et exogène (*e.g.*, caféine, tetracaïne...).

Il a été mis en évidence chez le chien une corrélation entre la stimulation du système nerveux sympathique et parasympathique et des activités déclenchées en rapport avec les DAD (Patterson *et al.* 2005).

Deux autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la survenue des DAD associés à l'élévation du calcium cytoplasmique : l'activation d'un courant chlore (Zygmunt, Goodrow, et Weigel 1998) ou d'un courant cationique non sélectif (*e.g.*, celui porté par le canal TRPM4 (Transient Receptor Potential M4)) (Lacolley 2007; Guinamard *et al.* 2004; Simard *et al.* 2013).

LA FIBRILLATION ATRIALE

La fibrillation atriale (FA) est un trouble du rythme cardiaque caractérisée par une activité électrique auriculaire rapide et anarchique responsable d'une incompétence hémodynamique de l'oreillette gauche et d'une augmentation de la fréquence cardiaque.

Initialement caractérisée par des épisodes de fibrillation spontanément résolutifs, elle évolue progressivement vers une pérennisation de l'état de fibrillation lorsqu'elle n'est pas traitée. La classification des stades de développement de la FA se fait selon la durée de ses épisodes, leur récurrence et la réponse aux traitements.

Au stade initial, d'une durée inférieure à sept jours et se terminant spontanément le plus souvent en moins de 24 heures, la fibrillation est dite paroxystique et peut présenter des récurrences.

Au deuxième stade, d'une durée supérieure à sept jours, la fibrillation est dite persistante. Une cardioversion électrique ou pharmacologique est nécessaire pour permettre le retour au rythme sinusal.

Au dernier stade, d'une durée supérieure à un an, la FA est dite permanente et la cardioversion n'a pas été efficace ou n'a pas été entreprise.

Cette pathologie, dont la fréquence augmente avec l'âge des sujets atteints, est une importante source de morbidité et de mortalité cardiovasculaire.

I. Épidémiologie

La FA est le trouble du rythme le plus couramment rencontré en pratique cardiologique dans les pays développés. Sa prévalence et son incidence augmentent chaque année en raison de l'allongement de l'espérance de vie, de la meilleure prise en charge des pathologies chroniques cardiaques et non cardiaques, et de l'amélioration de son diagnostic.

En 2014, la proportion de personnes souffrant de FA était estimée à 2 % dans les pays occidentaux (Zoni-Berisso *et al.* 2014). La prévalence de cette pathologie augmente avec l'âge, allant de 0,12-0,16 % pour la tranche d'âge inférieure à 50 ans, à 10-17 % chez les sujets de plus de 80 ans. Bien que sa prévalence soit plus élevée pour les hommes que pour les femmes

(ratio 1,2 : 1), celles-ci représentent la majorité des personnes atteintes en raison de leur plus grande espérance de vie.

L'incidence de la FA est actuellement estimée entre 0,21 et 0,41 nouveau cas pour 1 000 personnes par an. Les projections actuelles indiquent que 14 à 17 millions de personnes souffriront de cette pathologie en Europe à l'horizon 2030. La fibrillation atriale représente donc l'un des principaux problèmes de santé publique et une source majeure d'augmentation des coûts de la santé.

II. Étiologie et facteurs de risque

Les causes de fibrillation atriale sont multiples et souvent multifactorielles. Si elle présente parfois une origine génétique (on parle de fibrillation atriale primitive), elle survient généralement à la suite d'une pathologie cardiaque ou d'une autre pathologie sous-jacente (fibrillation atriale secondaire).

A. Les FA primitives

Les FA primitives représentent environ 30 % des cas diagnostiqués (Lévy *et al.* 1999). Elles seraient causées par des altérations du cycle du calcium dans les cardiomyocytes atriaux. Plusieurs gènes impliqués dans ces formes de FA ont été identifiés. La majorité de ces gènes codent des protéines membranaires telles que des canaux potassiques et sodiques, mais d'autres gènes ont également été identifiés, tels que ceux codant le facteur natriurétique atrial et l'Ankyrine B, une protéine du cytosquelette servant à l'ancrage des protéines membranaires (Hong *et al.* 2005; Yang *et al.* 2004; Xia *et al.* 2005). Un variant génétique adjacent au gène PITX2 (locus 4q25) et codant un facteur de transcription a également été reconnu comme facteur de prédisposition à la FA (Gudbjartsson *et al.* 2007; Käb *et al.* 2009; Mohanty *et al.* 2013).

B. Les FA secondaires

Dans la plupart des cas, la fibrillation n'est pas d'origine génétique. De nombreux facteurs prédisposent à la fibrillation dite secondaire. En premier figurent l'âge et l'hypertension artérielle, mais il existe également d'autres facteurs, d'origine cardiaque ou non. De manière générale, toute cardiopathie entraînant une surcharge barométrique dans l'oreillette peut potentiellement induire une FA.

Liste non exhaustive de causes cardiaques de FA :

- Valvulopathies (surtout mitrales) ;
- Insuffisance cardiaque ;
- Infarctus du myocarde ;
- Cardiomyopathie hypertrophique ;
- Péricardite ;
- Syndrome de Wolff-Parkinson-White ;
- Cardiopathie congénitale (communication inter-atriale) ;
- Maladie du sinus ;
- Chirurgie cardiaque récente.

Liste non exhaustive de causes de FA d'origine non cardiaque :

- Diabète ;
- Dysthyroïdie ;
- Obésité/syndrome métabolique ;
- Maladies respiratoires : apnée du sommeil, pneumopathies, embolies pulmonaires etc ;
- Consommation d'excitants, d'alcool ou de sympathomimétiques ;
- Phéochromocytome/augmentation du tonus sympathique.

C. Les FA idiopathiques

Il existe encore aujourd'hui des cas de FA qui ne sont pas causés par une pathologie sous-jacente, ne pouvant pas être expliqués génétiquement et dont la cause n'a pas pu être déterminée. Ces FA sont dites idiopathiques.

III. Diagnostic

Le diagnostic de FA est difficile à établir du fait de son caractère asymptomatique. Une étude montre qu'en France, en 2008, 80 % des patients chez lesquels une FA a été diagnostiquée, ont été admis à l'hôpital pour une autre raison (Charlemagne *et al.* 2011).

L'électrocardiogramme est l'outil de référence pour le diagnostic de la FA. Ce tracé est composé de déflexions représentatives de l'activité électrique des différentes parties du cœur. En cas de FA, l'onde P, caractérisant la dépolarisation des oreillettes, est remplacée par des trémulations continues de la ligne de base, appelées ondes F (Figure 16).

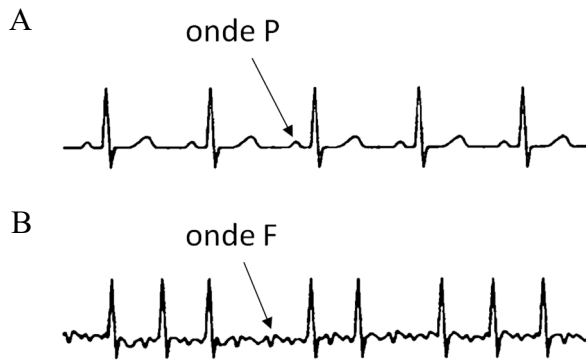


Figure 16 ECG d'un patient sain et d'un patient souffrant de fibrillation atriale au cours d'un épisode de fibrillation. L'onde P (A) témoignant de la dépolarisation synchrone des cardiomyocytes auriculaires chez le patient sain est remplacé par une onde F (onde de fibrillation ; B) caractéristique d'un épisode de fibrillation atriale

Pourtant, la détection de la FA lors d'examens électrocardiographiques ponctuels est hasardeuse. En effet, les premiers épisodes de FA étant de courte durée et spontanément résolutifs, si la tentative de diagnostic n'intervient pas au moment précis d'un épisode de fibrillation, la FA n'est pas découverte. Il est donc fréquent que la FA soit diagnostiquée suite à l'apparition d'une complication, tels qu'un accident ischémique transitoire (AIT) ou un accident vasculaire cérébral (AVC).

IV. Physiopathologie

A. Les mécanismes arythmiques

La physiopathologie de la FA est complexe, car les mécanismes à l'origine de ce trouble du rythme sont multiples et évoluent en fonction du stade de développement de la maladie.

Les trois principaux mécanismes identifiés sont :

- l'existence de foyers d'activités électriques ectopiques ;
- les activités électriques déclenchées (post-dépolarisations précoces (EAD) et tardives (DAD)) ;
- les phénomènes de réentrée.

1. Les foyers électriques ectopiques

Le nœud sinusal situé dans l'oreillette droite est le siège physiologique de l'automatisme cardiaque. Toute zone génératrice de potentiels d'action se trouvant en dehors du nœud sinusal est donc qualifiée de foyer électrique ectopique.

Bien que quelques foyers puissent être retrouvés dans le muscle cardiaque de la veine cave et dans l'oreillette droite, chez l'Homme, 94 % des foyers sont retrouvés dans le manchon de cardiomyocytes des veines pulmonaires (VP) (Figure 17) (Haïssaguerre *et al.* 1998).

Ce manchon de cardiomyocytes est en continuité anatomique et électrique avec les cardiomyocytes de l'oreillette gauche (OG) et s'étend sur une longueur variable, de l'ordre de quelques centimètres dans les quatre veines pulmonaires. Les foyers sont en général situés 2 à 4 centimètres après l'abouchement des VP à l'OG, avec une concentration particulièrement importante dans la veine pulmonaire supérieure gauche.

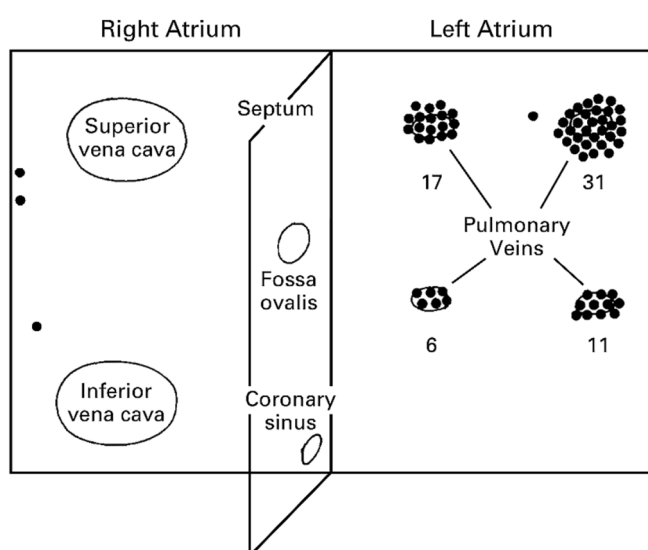


Figure 17 Schéma représentant la distribution de 69 foyers ectopiques (points noirs) de déclenchement de FA chez 45 patients, d'après Haïssaguerre *et al* (1998).

Les mécanismes cellulaires à l'origine du déclenchement des activités électriques anormales des cardiomyocytes de VP sont encore inconnus.

2. Les activités déclenchées

À l'échelle cellulaire, des activités électriques anormales peuvent être provoquées dans les cardiomyocytes par des dépolarisations transitoires de la membrane plasmique qui surviennent en plus des potentiels d'action originaires du nœud sinusal.

Deux catégories d'activités déclenchées sont connues : les post-dépolarisations tardives (DAD) et les post-dépolarisations précoces (EAD). Elles surviennent dans les cas de FA mais également d'autres pathologies prédisposant aux arythmies, comme l'insuffisance cardiaque.

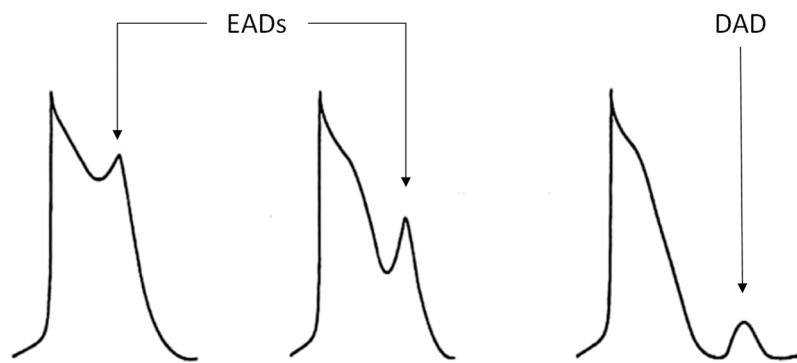


Figure 18 Schéma de potentiels d'action avec post-dépolarisations précoces (EAD) et tardives (DAD). Schéma modifié d'après (Leenhardt *et al.* 2011).

a. Les post-dépolarisations tardives (DAD)

Cf page 46.

b. Les post-dépolarisations précoces (EAD)

Les post-dépolarisations précoces, surviennent pendant le potentiel d'action, au cours de la phase de repolarisation de la membrane plasmique (Figure 18).

Les mécanismes impliqués sont moins bien connus que ceux impliqués dans le déclenchement des DAD. Ces EAD seraient dus à un déséquilibre entre des courants ioniques dépolarisants et repolarisants, avec un rôle prépondérant du courant calcique de type lent (I_{CaL}) et du courant d'échange (I_{ti}). L'importance relative de la participation de ces deux courants au déclenchement des EAD dépend de l'état de polarisation membranaire auquel l'EAD survient.

Le courant I_{CaL} interviendrait principalement à la fin de la phase en plateau du potentiel d'action. En effet, les propriétés d'activation et d'inactivation des canaux calciques permettent une entrée permanente de calcium dès lors que le potentiel membranaire est compris entre -30 mV et 0 mV. On parle alors de « courant de fenêtre ». Si ce courant est suffisamment important – par exemple dans le cas d'une phase de repolarisation membranaire prolongée – le processus de repolarisation peut être interrompu et un nouveau potentiel d'action apparaît. Les post-dépolarisations précoces sont donc favorisées par des facteurs augmentant la durée du potentiel d'action, que ce soit par la diminution des courants repolarisants, tels que les courants potassiques, ou par l'augmentation des courants dépolarisants, tels que les courants sodiques et calciques.

Le courant I_{ti} interviendrait plutôt en fin de potentiel d'action, quand le potentiel électrique membranaire est d'environ -70 mV. Comme dans le cas précédent, si l'intensité du

courant est suffisante, elle peut donner naissance à un nouveau potentiel d'action, générateur d'extrasystoles voire de torsades de pointe.

Cependant, d'autres courants pourraient participer à la survenue des EAD, tels que le courant sodique retardé et un courant dépolarisant cationique non spécifique activé par le calcium (Leenhardt *et al.* 2011).

De nombreux facteurs métaboliques, toxiques ou neurologiques peuvent favoriser l'apparition des post-dépolarisations précoces, comme la bradycardie, l'hypoxie, l'acidose, certains principes actifs antiarythmiques, ou encore l'augmentation du tonus sympathique (Leenhardt *et al.* 2011).

3. Les phénomènes de réentrée

a. Mécanisme

Les réentrées sont des mécanismes arythmiques impliquant la participation de l'ensemble du tissu. Il s'agit d'une ré-excitation d'une région du tissu cardiaque par un influx électrique qui revient à son point d'origine après avoir parcouru une boucle plus ou moins grande dans le tissu.

Dans des conditions physiologiques, la conduction électrique cardiaque est pourvue d'un système « anti-retour » dont l'efficacité dépend de deux variables : la période réfractaire (PR) des cardiomyocytes et la vitesse de conduction électrique dans le tissu. Le dysfonctionnement de ce système est à l'origine des réentrées.

Ainsi, ce phénomène se produit lorsqu'un influx partant d'une zone (A) pour arriver en zone (B) est bloqué transitoirement ou ralenti dans un circuit de conduction (*e.g.*, conduction anisotrope ou obstacle fibrotique), ou qu'un des circuits de conduction menant en zone (B) est trop long, ou que la période réfractaire en zone A est trop courte. Le signal électrique arrivé en zone (B) peut retourner en zone (A) par un circuit détourné ou lent et réactiver la zone (A) redevenue excitable. La zone B joue alors le rôle de « foyer ectopique ». Les zones A et B peuvent ainsi se réactiver en boucle et assurer la pérennisation du phénomène (Figure 19). Une propagation anormale de l'influx électrique peut conduire à une ou plusieurs réactivations de l'oreillette à partir d'un seul stimulus électrique, qu'il soit d'origine pathologique (*e.g.* DAD, EAD) ou non (*i.e.* potentiel d'action originaire du nœud sinusal).

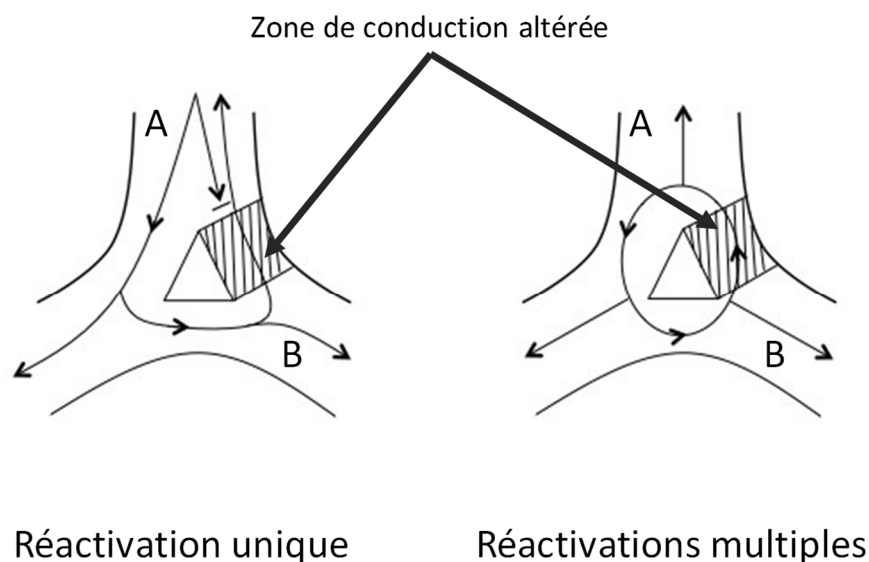


Figure 19 Mécanismes de réentrées.

La zone hachurée correspond à une zone du tissu où la conduction électrique intercellulaire est ralentie. Le signal électrique initial provient de la zone A et arrive en zone B. Les deux mécanismes de réentrée conduisant à une ou plusieurs réactivations du tissu sont décrits dans le paragraphe ci-dessus.

On parle de macro-réentrée lorsqu'il n'existe qu'un seul circuit de réentrée se réactivant cycliquement : l'activité induite est alors régulière. Au contraire, on parle de micro-réentrées lorsqu'il existe de multiples petits circuits de réentrées : l'activité induite est alors irrégulière et de type fibrillation.

b. Facteurs favorisant les réentrées

i. Rôle de la période réfractaire

Les réentrées sont favorisées par les périodes réfractaires (PR) courtes. Or, la durée de la période réfractaire dépend de la durée du potentiel d'action qui la précède : elle est d'autant plus longue que le PA est long, et d'autant plus courte que le PA est court. Ainsi, tout facteur raccourcissant la durée du potentiel d'action, et donc la période réfractaire, augmente les risques de réentrées.

Parmi les facteurs pouvant réduire la durée de la période réfractaire des cardiomyocytes auriculaires, on compte l'hyperstimulation sympathique et le stimulus vagal au niveau atrial. Ce dernier diminue la PR de manière hétérogène, contribuant ainsi d'autant plus au développement d'arythmies (Zipes, Mihalick, et Robbins 1974; Bettoni et Zimmermann 2002).

ii. Rôle de la vitesse de conduction électrique dans le tissu

L'efficacité du système anti-retour de la conduction électrique dépend également de la vitesse de conduction dans le tissu : une conduction électrique lente, ou anisotrope favorise les réentrées.

La nature et les caractéristiques électrophysiologiques des cellules composant le tissu, l'importance de leur matrice extracellulaire et leur orientation sont les principaux éléments déterminant la vitesse de conduction de l'influx électrique.

Au niveau cellulaire, la communication électrique entre les cellules est assurée par les jonctions communicantes, dites jonctions « gap ». Elles sont principalement situées aux extrémités des cardiomyocytes, au niveau des disques intercalaires (Figure 20), où se trouve une agrégation de canaux jonctionnels. Chaque canal jonctionnel est formé de deux hémicanaux, les connexons, qui sont eux-mêmes formés par six protéines transmembranaires appelées connexines (Cx). Ces canaux sont peu sélectifs à l'égard des ions, ils assurent ainsi une continuité électrique entre les cellules connectées en uniformisant leurs potentiels électriques intracellulaires. Une altération des jonctions gap (*e.g.*, diminution de la quantité ou une modification de la distribution des connexines) au sein des cardiomyocytes peut donc diminuer la vitesse de conduction électrique dans le tissu ou modifier le chemin de propagation privilégié du signal électrique. Tel semble être le cas, par exemple, suite à un infarctus du myocarde : la conduction est ralentie voire stoppée dans la zone ischémisée ce qui crée des zones propices aux réentrées. Ce défaut de conduction serait dû à un découplage des jonctions gap (Sinno *et al.* 2003; Nishida *et al.* 2011).

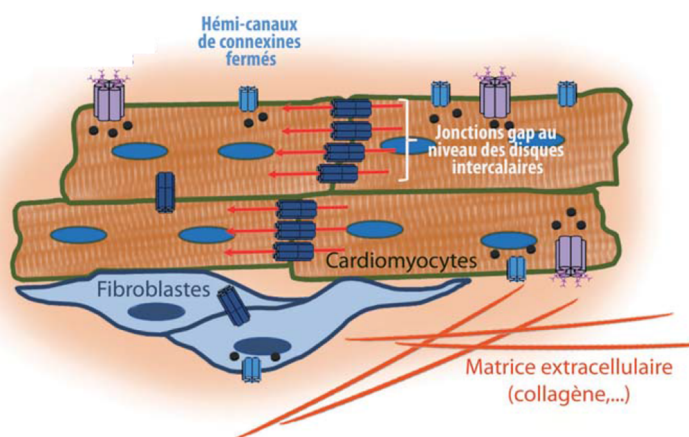


Figure 20 Répartition préférentielle des canaux jonctionnels intercellulaires dans les cardiomyocytes en conditions physiologiques (modifiée d'après Hervé *et al* 2013) (Hervé et Derangeon 2013).

D'autres facteurs peuvent réduire la vitesse de conduction, altérer ou modifier son chemin de propagation, telle que la diminution du courant sodique (I_{Na}). Une diminution de I_{Na} est d'ailleurs retrouvée, bien qu'elle soit inconstante, dans les cardiomyocytes auriculaires des

patients souffrant de FA (Bosch *et al.* 1999; Sossalla *et al.* 2010). La fibrose participe aussi au ralentissement et à l'altération de l'isotropie de la conduction (Li *et al.* 1999). Pour revue des mécanismes moléculaires gouvernant les phénomènes de réentrée dans la FA, voir Nattel et Dobrev (2016).

B. Initiation, développement et autopromotion de la FA

1. *Initiation de la FA*

Au stade initial de FA, stade dit paroxystique, le principal facteur arythmique est la présence de foyers électriques ectopiques situés, à quelques exceptions près, dans le manchon de cardiomyocytes des veines pulmonaires (Haïssaguerre *et al.* 1998).

L'activité électrique de haute fréquence, environ 340 dépolarisations par minute (alors que l'activité d'un cœur sain se situe aux alentours de 70 dépolarisations par minute), générée par ces foyers se propage dans la veine jusqu'à l'oreillette gauche. La contraction de l'oreillette est alors pilotée par deux signaux électriques : un signal physiologique en provenance du nœud sinusal, et un signal électrique anormal en provenance d'une ou plusieurs veines pulmonaires. Cette double stimulation perturbe le fonctionnement de l'oreillette et provoque l'état de fibrillation.

La partie « Les veines pulmonaires dans la fibrillation atriale » (page 69) de cet ouvrage traite de manière plus détaillée le rôle des VP dans le déclenchement de la FA paroxystique.

L'exposition répétée de l'oreillette à des épisodes de fibrillation ou à une stimulation rapide provoque un remodelage électrique et structural, ainsi que des modifications endocriniennes favorisant la transition de la FA paroxystique vers un stade persistant puis permanent. Ces modifications conduisent donc l'oreillette à devenir un substrat idéal pour les arythmies. « *Atrial fibrillation begets atrial fibrillation* » (Wijffels *et al.* 1995).

2. *Développement et autopromotion de la FA*

a. Le remodelage électrique

Le remodelage électrique est le premier mécanisme d'auto-entretien de la FA à se mettre en place. Il consiste en une modification de l'importance relative des courants ioniques constituant le potentiel d'action, et en particulier ceux portés par les ions calcium et potassium.

Ce remodelage est dit « induit par la tachycardie » car il est provoqué par une fréquence auriculaire élevée.

La haute fréquence de stimulation des cardiomyocytes atriaux entraîne une surcharge calcique intra-cytoplasmique (Goette, Honeycutt, et Langberg 1996). La cellule, pour conserver son homéostasie calcique, s'oppose très rapidement à cette surcharge par plusieurs mécanismes rétro-régulateurs tels que :

- l'inactivation calcium-dépendante des canaux calciques voltage-dépendants de type L (principalement les $Ca_v1.2$) ;

- la levée incomplète de l'inactivation des $Ca_v1.2$ dépendante du potentiel électrique transmembranaire (Lee, Marban, et Tsien 1985).

Par la suite d'autres mécanismes rétro-régulateurs interviennent plus tardivement, mais de façon plus pérenne, ils correspondent à :

- la déphosphorylation du canal calcique par les phosphatases PP1 et PP2A (Christ *et al.* 2004),

- un défaut d'adressage à la membrane de la protéine canal ainsi que la possible diminution de l'expression des gènes codant le canal $Ca_v1.2$, malgré une apparente absence de diminution de la quantité de protéines (Schotten *et al.* 2003). Ce dernier point est encore débattu.

Certains canaux potassiques subissent également un remodelage provoquant une augmentation des courants qu'ils génèrent. C'est le cas des courants I_{k1} , I_{kAch} , ainsi que des courants I_{to} et I_{kur} qui sont les deux principaux courants repolarisants de la phase plateau du potentiel d'action atrial (Cha *et al.* 2006; Voigt *et al.* 2008)(pour revue voir Hatem (2014)).

Ces deux mécanismes impliquant les canaux calciques et potassiques s'accompagnent d'une réduction significative de la durée du potentiel d'action et par conséquent de la période réfractaire. Or nous avons vu que ce phénomène favorisait les réentrées : le remodelage électrique participe donc à l'entretien de la FA.

À ces modifications des canaux dépendant du potentiel électrique membranaire s'ajoutent des modifications des jonctions gap. D'une part, l'expression de la connexine Cx-40 est diminuée, ce qui induit une réduction de la vitesse de conduction de l'influx électrique entre les cardiomyocytes (van der Velden *et al.* 2000). D'autre part, les Cx-40 et Cx-43 se délocalisent des disques intercalaires vers le pourtour des cardiomyocytes, perturbant de ce fait

la propagation du signal électrique. Celle-ci devient alors particulièrement anisotrope (Rucker-Martin *et al.* 2006). Dans les deux cas, la période réfractaire étant réduite, la vitesse de conduction diminuée et l'anisotropie de conduction augmentée, les risques de réentrée sont fortement majorés.

Ces remodelages électriques sont réversibles à long terme s'il y a retour au rythme sinusal normal (Yu *et al.* 1999; Allesie, Ausma, et Schotten 2002).

b. Le remodelage structural

Le remodelage structural est un processus plus lent à s'installer que le remodelage électrique. Il se développe à la fois au niveau tissulaire et au niveau cellulaire.

Au niveau tissulaire surviennent une dilatation de l'oreillette gauche et le développement d'une fibrose intercellulaire. Cette fibrose, générée par les fibroblastes, est due à l'activation de plusieurs voies de signalisation endocrines et paracrines parmi lesquelles le système rénine-angiotensine-aldostérone dont le rôle semble prépondérant (Li *et al.* 2001). (Pour revue des mécanismes moléculaire induisant la fibrose, voir Nattel, Burstein, et Dobrev (2008). La conduction électrique est ralentie dans les zones de fibrose, ce qui augmente l'anisotropie de conduction dans l'oreillette et favorise ainsi les phénomènes de réentrée (Spach et Dolber 1986; Li *et al.* 1999).

Dans les jours suivant les épisodes de fibrillation, une nouvelle population cellulaire pathologique fait son apparition dans le cœur : les myofibroblastes. Ils sont issus de la différenciation des fibroblastes, physiologiquement présents dans le cœur, ou d'autres cellules progénitrices. Comme les fibroblastes, les myofibroblastes participent au développement de la fibrose, mais de manière plus active en raison de leur capacité de synthèse de collagène deux fois plus importante que les fibroblastes et du large éventail de cytokines et de chemokines qu'ils produisent (Dzeshka *et al.* 2015).

Par ailleurs, il a été montré *in vitro*, que ces myofibroblastes sont en mesure de créer des jonctions gap avec les cardiomyocytes, formant donc une connexion électrique entre ces deux types cellulaires. Or, au repos, la membrane des myofibroblastes est peu polarisée (environ -30 mV) : cette connexion électrique pathologique provoquerait donc une dépolarisation membranaire des cardiomyocytes atriaux. Cette dépolarisation altérerait la propagation de l'influx électrique et raccourcirait les périodes réfractaires des cardiomyocytes, favorisant ainsi les ré-entrées (Miragoli, Salvarani, et Rohr 2007). L'apparition de ces myofibroblastes augmente donc le potentiel arythmogène de l'oreillette.

À l'échelle cellulaire, dans les jours suivants un épisode de fibrillation, les cardiomyocytes sont hypertrophiés et leur ultrastructure est altérée. Cette altération se traduit par une modification de la forme et de la taille des mitochondries, une perte de myofibrilles, une fragmentation du réticulum sarcoplasmique, une accumulation intracellulaire de glycogène et la disparition de la chromatine nucléaire (Ausma *et al.* 1997). Au niveau extracellulaire il y a également une augmentation de la quantité de matrice. Enfin, l'expression génique des cardiomyocytes retrouve des caractéristiques fœtales, comme en témoignent la réexpression de l'alpha-actinine, analogue fœtal de l'actine, et la disparition de protéines exprimées dans les cardiomyocytes matures. Parmi les protéines qui ne sont plus exprimées, on retrouve notamment des protéines du cytosquelette telles que la cardiotine et la desmine ainsi qu'une partie de la titine (Ausma *et al.* 2001; Thijssen *et al.* 2000). Ces modifications et en particulier l'augmentation de la quantité de matrice extracellulaire contribuent à l'augmentation du caractère arythmogène du tissu.

c. L'inflammation

Au-delà des remodelages électriques et structuraux, la fibrillation atriale est entretenue par une inflammation qui est à la fois la cause et la conséquence d'un épisode de fibrillation. D'une part, l'incidence de la FA est plus importante chez les individus présentant un état inflammatoire, par exemple suite à une chirurgie cardiaque (Aviles *et al.* 2003; Miyasaka *et al.* 2008). En effet, l'inflammation favoriserait le remodelage électrique de l'oreillette et donc l'altération de la conduction du signal (Ishii *et al.* 2005; Tselentakis *et al.* 2006). D'autre part, la FA génère elle-même une inflammation caractérisée par un haut niveau de protéine C réactive, lequel décroît lors du retour au rythme sinusal (Kallergis *et al.* 2008).

La physiopathologie de la FA est donc hautement complexe et multifactorielle, rendant difficile l'appréhension de ce trouble du rythme. Enfin, la FA est d'autant plus compliquée à traiter que le stade de développement est avancé.

V. Complications de la FA

A. Les accidents thromboemboliques

La complication la plus dévastatrice de la FA est l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. Le dysfonctionnement contractile de l'oreillette gauche entraîne une stase sanguine qui conduit à la formation d'un thrombus. L'AVC survient généralement lorsque tout ou partie de celui-ci est propulsé dans la circulation sanguine.

Le risque de survenue d'un accident thromboembolique chez les patients souffrant de FA est 2,5 fois plus important que chez les sujets sains (Healey *et al.* 2012). Ce risque peut être estimé avec les scores CHADS₂ et CHA₂DS₂-VASc (Keogh *et al.* 2011; Olesen *et al.* 2012). D'autres méthodes existent pour évaluer le risque thromboembolique, comme l'observation de l'oreillette gauche par écho-doppler cardiaque. Le principal paramètre estimateur est alors la taille de l'appendice auriculaire gauche : une taille supérieure à 44 mm est positivement corrélée à un accroissement significatif du risque d'AVC (Stöllberger *et al.* 1998).

B. L'insuffisance cardiaque

La FA peut conduire à l'insuffisance cardiaque par deux mécanismes :

- l'incompétence hémodynamique de l'oreillette, qui entraîne un défaut de remplissage du ventricule gauche ;
- la tachycardie chronique, provoquée par le rythme rapide de l'oreillette, peut entraîner une dysfonction systolique ventriculaire gauche appelée cardiomyopathie rythmique ou tachycardiomyopathie. Cette cardiomyopathie régresse spontanément après retour à une fréquence cardiaque normale.

En plus d'en être un facteur de risque de l'insuffisance cardiaque, de nombreuses études montrent que la FA accroît entre 1,5 et 2 fois la mortalité globale associée à cette pathologie (pour revue voir Anter, Jessup, et Callans (2009)).

C. Les chutes des patients âgés

Les chutes des patients âgés, provoquées par les syncopes, sont courantes. Elles se produisent principalement lors de la transition entre un épisode de fibrillation et un retour au rythme sinusal normal. Les baisses rapides de la fréquence cardiaque entraînent une hypo-

perfusion cérébrale transitoire induisant une perte de conscience, et en conséquence une chute (Lipsitz, Wei, et Rowe 1985).

D. Les complications neurologiques

La FA peut se compliquer de troubles neurologiques. Le déclin cognitif est plus rapide et le risque de démences est majoré chez les patients âgés souffrant de FA, même en absence d'AVC (Thacker *et al.* 2013).

E. Les morts subites

La FA peut également entraîner des morts subites par déclenchement de fibrillations ventriculaires.

VI. Traitements

Qu'il soit symptomatique ou non, le patient chez lequel une FA a été diagnostiquée doit faire l'objet d'une prévention du risque thromboembolique.

En revanche, la prise en charge du dysfonctionnement électromécanique de l'oreillette n'est en général réalisée que chez le patient symptomatique, car le rapport bénéfice-risque de ces traitements n'est pas favorable à leur mise en place. Le cas échéant, trois stratégies peuvent être envisagées : le contrôle du rythme (ou cardioversion), le contrôle de la fréquence cardiaque et l'ablation chirurgicale de la FA. Ces traitements sont d'autant plus efficaces qu'ils sont mis en œuvre à un stade précoce de la maladie.

La stratégie thérapeutique doit également tenir compte d'une éventuelle pathologie sous-jacente pouvant être responsable de la FA, qu'elle soit cardiaque ou non (*e.g.* hyperthyroïdie).

A. La prévention du risque thromboembolique

La prévention du risque thromboembolique repose sur le score CHA₂DS₂-VASC du patient.

Aucun traitement anticoagulant n'est nécessaire pour les patients présentant un score nul ; pour ceux ayant un score de 1, l'anticoagulation dépend du risque hémorragique, qui est estimé grâce au score HAEMORRHAGE (Gage *et al.* 2006). Si celui-ci est trop élevé, l'instauration d'un traitement antiagrégant plaquettaire (aspirine ou clopidogrel) est favorisée ; pour les scores égaux ou supérieurs à 2, un traitement anticoagulant par anti-vitamine K (AVK) ou anticoagulant oral direct (AOD) est systématiquement mis en place. Une attention particulière doit être portée à ces traitements, qui sont fréquemment source d'accidents iatrogènes. Le risque hémorragique associé à l'usage de ces médicaments représente donc un problème majeur.

B. Le contrôle du rythme : la cardioversion

La cardioversion consiste à arrêter la fibrillation, à restaurer le rythme sinusal normal, et à le maintenir. Généralement, celle-ci est réalisée après au moins trois semaines d'anticoagulation efficace, le changement de rythme étant particulièrement favorable à la formation d'emboles. En effet, si un caillot s'est formé dans l'oreillette, une reprise de la contraction auriculaire peut le fragmenter et le propulser sous forme d'emboles dans la circulation sanguine. Toutefois, une situation d'urgence, telle qu'une instabilité hémodynamique, peut contraindre à une cardioversion précoce. Dans ce dernier cas, une anticoagulation à dose curative est utilisée.

La cardioversion peut être électrique ou pharmacologique.

1. La cardioversion électrique

Deux méthodes requérant l'anesthésie du patient peuvent être employées pour réaliser une cardioversion électrique :

- la stimulation électrique externe, par défibrillateur, qui consiste à envoyer une décharge électrique bipolaire à l'aide d'un défibrillateur pour resynchroniser les cardiomyocytes auriculaires ;

- la stimulation électrique interne, qui consiste à stimuler localement l'oreillette avec deux électrodes guidées par un cathéter. Cette technique est généralement accompagnée d'un traitement pharmacologique anti-arythmique.

2. La cardioversion pharmacologique

La cardioversion pharmacologique est obtenue avec des anti-arythmiques de classe IC (flécaïnide ou propafénone) ou III (amiodarone ou sotalol), selon le profil de la FA. Malheureusement, en plus de leur efficacité modeste, ces traitements anti-arythmiques comportent des risques puisque paradoxalement ils peuvent être pro-arythmiques. Ainsi, pour chaque patient, le rapport bénéfice-risque doit être finement évalué et des examens de contrôle de l'efficacité et de la tolérance du traitement doivent être réalisés régulièrement.

Après la cardioversion, le traitement anticoagulant doit être maintenu pendant quatre semaines, et un traitement anti-arythmique (souvent amiodarone) peut être prescrit pour prévenir les récurrences, qui sont fréquentes.

N.B. un nouvel antiarythmique, le vernakalant, a obtenu une AMM européenne pour la cardioversion en 2010, mais son service médical rendu, réévalué en 2015 a été jugé insuffisant par la commission de transparence de la Haute Autorité de Santé, pour être remboursé par la Sécurité sociale. Il n'a actuellement pas sa place dans cette stratégie thérapeutique.

C. Le contrôle de la fréquence cardiaque

Le contrôle de la fréquence cardiaque intervient lorsque la cardioversion n'est pas indiquée ou a échoué et que le rythme ventriculaire est trop rapide. Son objectif est le retour à une fréquence cardiaque comprise entre 80 et 110 battements/minute (Haute Autorité de Santé 2014). Ce contrôle est réalisé par un bêtabloquant en première intention, ou par un inhibiteur calcique n'appartenant pas à la famille des dihydropyridine (*e.g.*, verapamil, diltiazem) en cas de contre-indication aux bêtabloquants et en absence d'insuffisance cardiaque associée.

D. L'ablation chirurgicale

Cette dernière approche est indiquée dans les cas de FA paroxystiques récurrentes symptomatiques et de FA persistantes symptomatiques. Lourde et invasive elle est utilisée généralement en cas d'échec du traitement pharmacologique. Il s'agit néanmoins du traitement le plus efficace puisqu'il a un taux de succès de l'ordre de 70 à 90 % selon les études.

Les deux objectifs de ce traitement sont :

– l'isolation électrique des veines pulmonaires de l'oreillette gauche. Elle permet de confiner dans les VP les foyers d'activité électrique ectopique déclencheurs des épisodes de fibrillation. Cette première étape est souvent suffisante dans les cas de FA paroxystique ;

– la compartimentation de l'oreillette gauche. Cette seconde étape permet, d'une part, de casser les circuits de réentrées en créant des lésions linéaires dans l'oreillette gauche ; d'autre part, de détruire des foyers arythmogènes présents dans l'oreillette gauche. Il s'agit d'une étape indispensable dans les FA persistantes et de deuxième intention dans les FA paroxystiques.

L'ablation est généralement réalisée par voie percutanée. Elle consiste à introduire deux cathéters dans l'oreillette gauche en utilisant la voie suivante : veine fémorale–veine cave–oreillette droite, puis ponction trans-septale, et enfin oreillette gauche. Le premier cathéter, en forme de lasso, sert à « cartographier » électriquement par tâtonnement la zone d'ablation et à localiser les foyers arythmiques. Cette cartographie électrique est fusionnée avec des images anatomiques de la même zone, obtenues par angioscanner (ou angio-IRM) préalable à l'intervention, et permet ainsi le guidage du second cathéter qui est une sonde d'ablation. Il peut générer une onde de radiofréquence, qui, une fois appliquée sur le tissu, crée une zone de lésion non électro-conductrice.

L'isolation électrique des VP est donc obtenue en réalisant des lésions circulaires, créées point par point aux zones de jonction entre VP et OG (Figure 21).

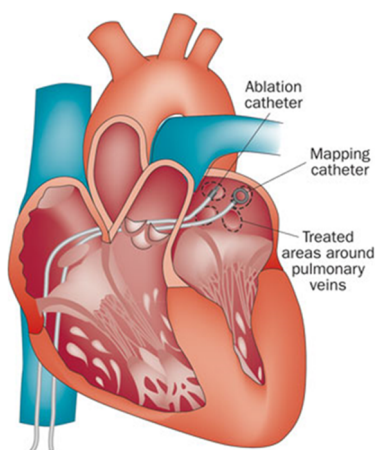


Figure 21 Ablation chirurgicale d'une fibrillation auriculaire.

Ablation réalisée par création de lésions circulaires aux zones d'abouchement des veines pulmonaires à l'oreillette gauche. Les cathéters sont amenés au niveau de la jonction VP-OG par la veine cave inférieure puis l'oreillette droite, et atteignent l'OG par ponction trans-septale.

La compartimentation de l'OG est obtenue en créant des lignes de lésion entre les VP supérieures ou entre la VP inférieure gauche et le sinus coronaire. Des lésions ponctuelles supplémentaires peuvent être réalisées pour détruire des zones arythmogènes repérées grâce au cathéter de cartographie.

En dépit d'un succès élevé pour stopper immédiatement l'arythmie, les rechutes de FA sont fréquentes après une première intervention chirurgicale : le taux de rechute à 5 ans est supérieur à 80 % (Scherr *et al.* 2015). Plusieurs interventions ainsi qu'un traitement pharmacologique antiarythmique dans certains cas sont généralement nécessaires pour supprimer durablement l'arythmie.

De plus cette pratique comporte des risques inhérents à la fois à la chirurgie et à la technique elle-même ; elle est donc réservée à un nombre limité de patients. Selon la littérature, des complications majeures précoces et tardives associées à ce traitement sont retrouvées dans 4 à 6 % des cas. Les complications précoces, immédiates ou dans les 24 heures suivant le geste, sont les tamponnades, les accidents thromboemboliques et les hémorragies. Les complications tardives sont : les sténoses des VP, les lésions nerveuses (nerf vague ou phrénique), et les fistules œsophagiennes.

VII. Conclusions

Aucun traitement actuel de la FA n'est pleinement satisfaisant. La prise en charge de cette pathologie est un exercice compliqué, le compromis entre bénéfices et risques du traitement n'étant pas toujours en faveur du traitement. Les cliniciens sont donc parfois contraints de « respecter » ce trouble du rythme quand il est asymptomatique, donc de le laisser s'installer et se développer, et par conséquent le rendre d'autant plus difficile à traiter s'il devait devenir symptomatique. De plus, chez les patients âgés – soit la population pour laquelle la prévalence de la FA est la plus élevée –, souvent atteints d'autres pathologies et donc polymédicamentées, le risque d'associations pharmacologiques dangereuses voire mortelles est accru. Une surveillance attentive du traitement et notamment des associations pro-arythmiques, pro-hémorragiques ou induisant des déséquilibres ioniques est donc de rigueur.

Un traitement pharmacologique du stade initial du développement de la FA efficace pourrait donc constituer une alternative moins lourde que les traitements chirurgicaux et permettre une rupture de la boucle d'auto-entretien de la maladie en amont des stades de remodelage. Ce traitement devrait alors cibler le principal substrat de la FA : les VP. Un tel traitement n'existe pas encore.

LES VEINES PULMONAIRES DANS LA FIBRILLATION

ATRIALE

Cette partie situe les veines pulmonaires dans leur contexte anatomique avant de décrire leur structure histologique. L'état des connaissances et des hypothèses actuelles concernant l'origine de leur potentiel arythmogène sont également présentés. Les connaissances sur les VP humaines sont privilégiées ainsi que sur les VP de rat, chez lequel nous avons obtenu la majorité des résultats expérimentaux rapportés dans ce manuscrit.

I. Anatomie des veines pulmonaires

A. Macro-anatomie

Le rôle principal des VP est de transporter le sang oxygéné en provenance des poumons vers l'oreillette gauche (OG). Selon l'espèce étudiée, et parfois même au sein d'une seule espèce, le nombre de VP en connexion directe avec l'OG varie.

Chez l'Homme, la majorité des individus possède quatre veines pulmonaires qui s'abouchent avec l'OG. Ces VP sont nommées en fonction de la position de leur abouchement avec l'OG (Figure 22) (Nathan et Eliakim 1966). Il s'agit des veines pulmonaires supérieure droite, supérieure gauche, inférieure droite et inférieure gauche.

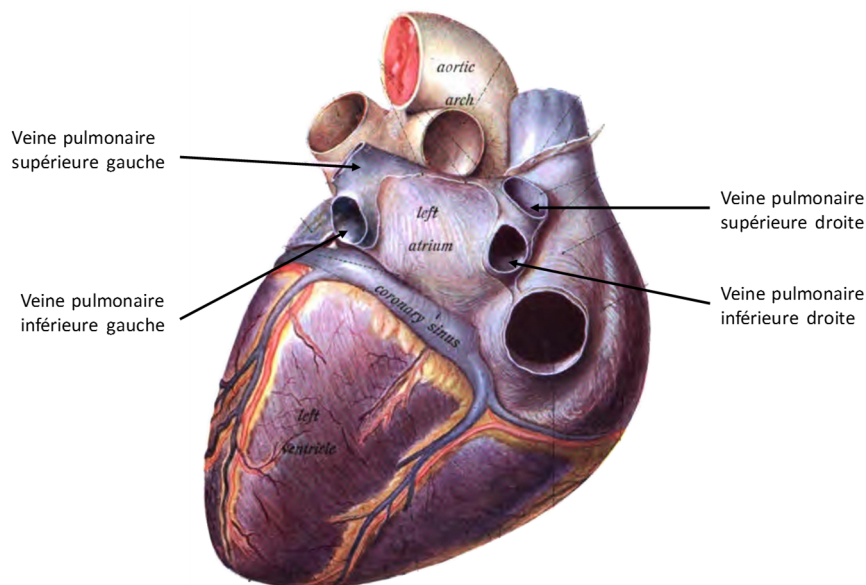


Figure 22 Dessin anatomique de la position des veines pulmonaires par rapport au cœur humain entier, modifié d'après Sobotta's Atlas and Text-book of Human Anatomy (Sobotta 1906).

Toutefois, il existe une variabilité anatomique non pathologique : les VP gauches supérieure et inférieure peuvent avoir un ostium commun (Kato *et al.* 2003). De même, une ou plusieurs VP surnuméraires peuvent s'aboucher avec l'OG.

Le rat, comme l'Homme, possède généralement quatre VP principales, mais peut également présenter une variabilité anatomique. Chaque VP porte le nom du lobe pulmonaire dont elle draine le sang (VP gauche, VP postérieure droite, VP antérieure droite et VP post-cavale) (Figure 23).

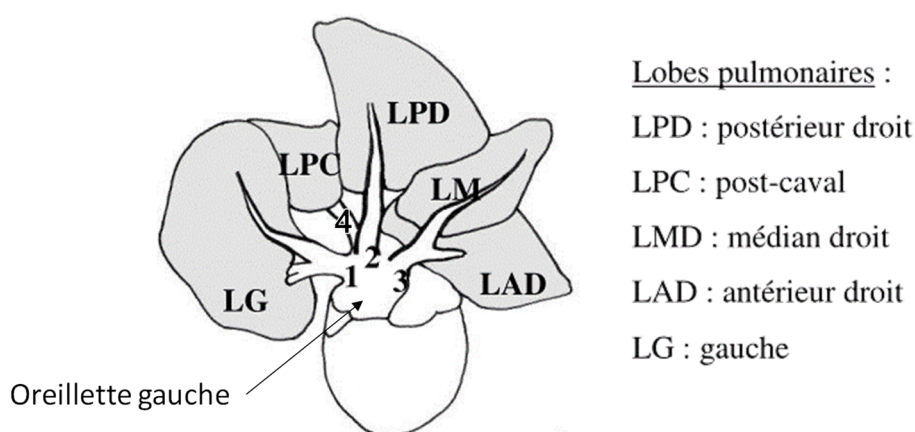


Figure 23 Schéma du bloc cœur-poumons de rat, d'après (Bronquard *et al.* 2007).
 1 : VP gauche ; 2 : VP postérieure droite ; 3 : VP antérieure droite ; 4 : VP post-cavale.

B. Structure

Les veines sont généralement constituées de trois tuniques : l'intima, la media et l'adventice.

L'intima est la couche de cellules la plus proche de la lumière du vaisseau. Elle comporte une couche unique de cellules endothéliales reposant sur la lame basale.

La media, tunique intermédiaire située entre l'intima et l'adventice, est constituée de cellules musculaires lisses et de tissu élastique.

L'adventice, tunique la plus externe, forme une couche fibreuse et élastique constituée principalement de fibres de collagène, de tissu conjonctif, de capillaires sanguins ainsi que de terminaisons du système nerveux autonome.

Les veines pulmonaires présentent une structure différente des autres veines non-thoraciques. Elles possèdent un manchon interne de cardiomyocytes situé entre la media et l'adventice (Figure 24). Ce manchon myocardique est également présent dans les veines caves inférieure et supérieure, le ligament de Marshall, et le sinus coronaire. Dans ces autres veines thoraciques il représente également une source potentielle d'arythmies, bien qu'il soit moins fréquemment impliqué que celui des VP.

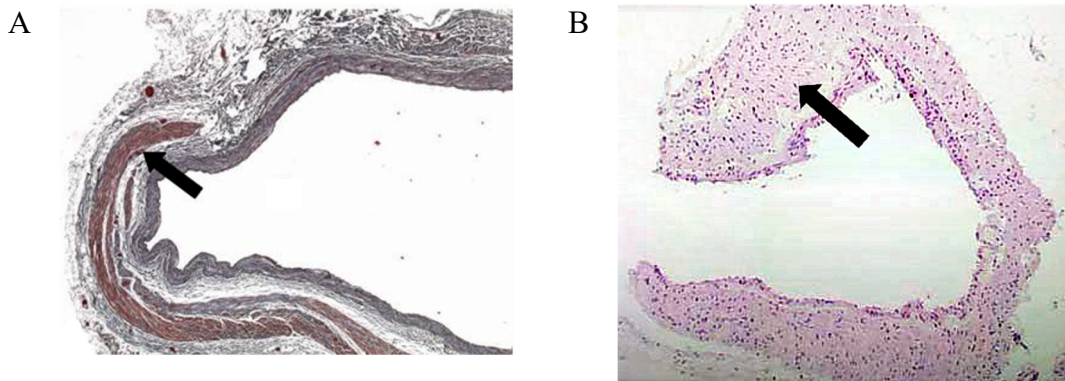


Figure 24 Coupes histologiques transversales de veines pulmonaires humaine (A) et de rat (B) après coloration pour révéler le myocarde. Modifié d'après Mueller-Hoecker *et al.* (2008) et Bronquard *et al.* (2007).

Les flèches noires indiquent la position du manchon de cardiomyocytes (coloration rouge brune pour (A) et coloration rose pâle pour (B)). La coloration rose plus foncée dans (B) correspond au marquage des cellules musculaires lisses.

II. Le manchon de cardiomyocytes des VP

A. Description générale

Le manchon myocardique des VP est en continuité anatomique avec le myocarde atrial et s'étend à partir de l'OG sur une distance variable dans les VP. Chez l'Homme, elle est généralement comprise entre 13 et 25 mm. Le manchon est constitué de plusieurs couches de fibres myocardiques ayant des orientations différentes et particulièrement complexes au niveau des ostia (Figure 25) (Nathan et Eliakim 1966).

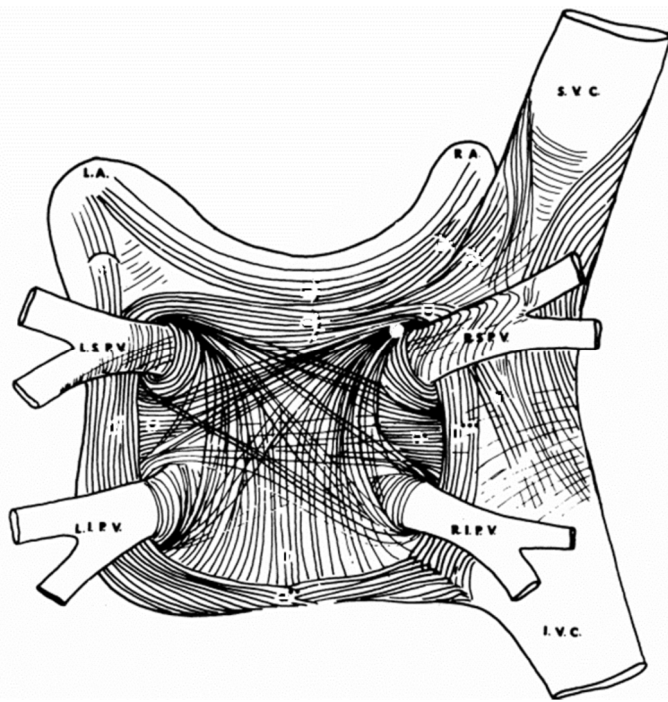


Figure 25 Orientation des fibres myocardiques (lignes noires) au niveau de la jonction des VP avec l'OG chez l'Homme (modifiée d'après Nathan et Eliakim (1966)).

LA = oreillette gauche, RA = oreillette droite, LSPV, RSPV, LIPV et RIPV sont respectivement les VP supérieures gauches et droites et les VP inférieures gauches et droites, SVC et IVC sont respectivement les veines caves supérieures et inférieures.

Chez le rat, ce manchon n'est composé que de deux couches de fibres : les fibres de la couche abluminale (couche la plus externe par rapport à la lumière de la veine), orientées de manière longitudinale par rapport à l'axe de la veine, et les fibres de la couche luminale, dont l'orientation est plutôt circulaire (Figure 26-A) (Paes de Almeida *et al.* 1975; Hashizume, Tango, et Ushiki 1998; Bronquard *et al.* 2007). Cette dernière couche disparaît progressivement à mesure que l'on s'éloigne de l'oreillette.

Le myocarde des VP est constitué quasi exclusivement de cardiomyocytes dont l'aspect en microscopie classique est semblable aux cardiomyocytes atriaux (Figure 27).

Ces cardiomyocytes sont irrigués par des capillaires sanguins et innervés par des terminaisons en provenance notamment du système nerveux sympathique et parasympathique (Figure 26-B et C et Figure 28).

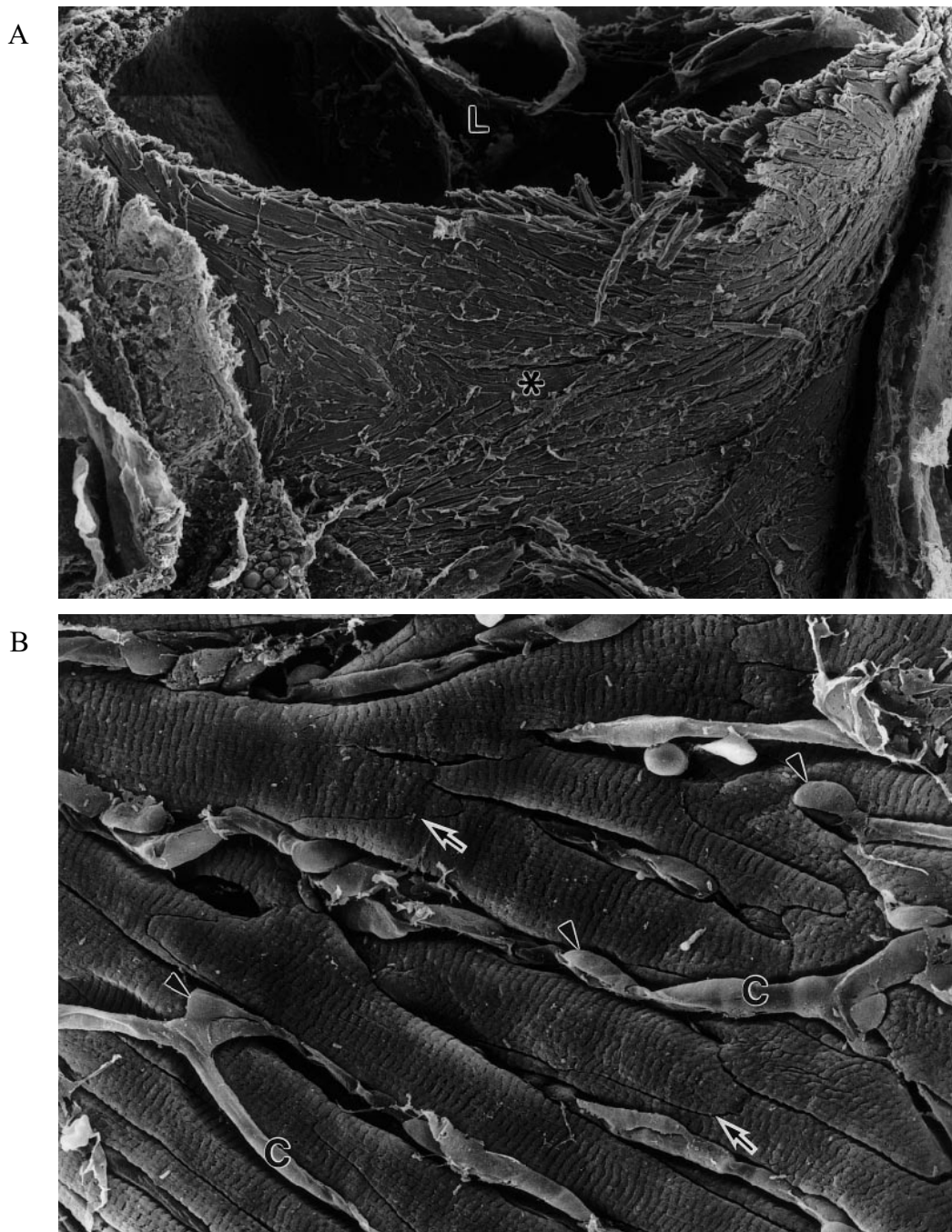
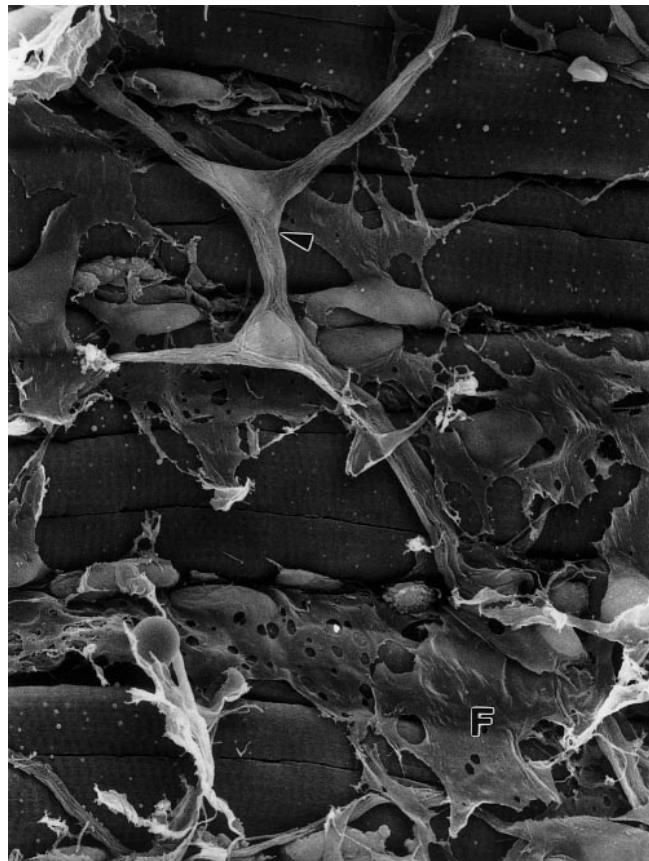


Figure 26 Structure de la veine pulmonaire de rat observée en microscopie électronique.

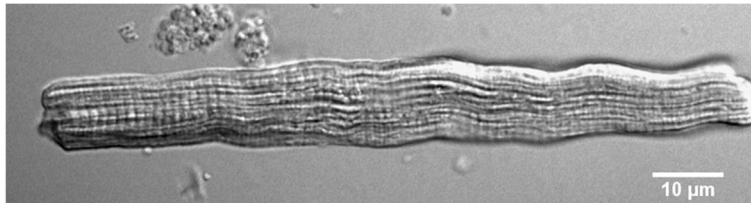
A : veine pulmonaire coupée (grossissement x70), L montre la lumière du vaisseau, l'astérisque montre la face externe du manchon de CM. Ces derniers sont orientés de manière orthogonale par rapport à l'axe longitudinal du vaisseau. **B :** cardiomyocytes de la VP (grossissement x1000). Ces CM sont connectés entre eux par des disques intercalaires (flèches). Un réseau de capillaires (C) sur lequel se trouvent des péricytes (pointe de flèche) est inséré entre les CM.

C



C : Un réseau de fibres nerveuses non myélinisées (pointe de flèche) et de fibroblastes (F) de l'adventice recouvre le manchon de CM (grossissement x800). Images modifiées d'après Hashizume et al (1998).

A



B

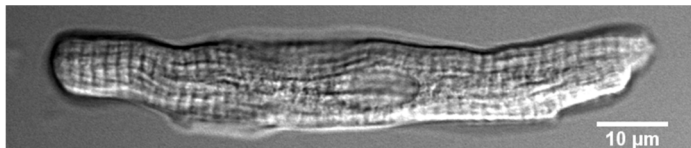


Figure 27 Cardiomyocytes isolés de veines pulmonaires (A) et d'oreillette gauche (B) de rat, observés en microscopie à lumière transmise.

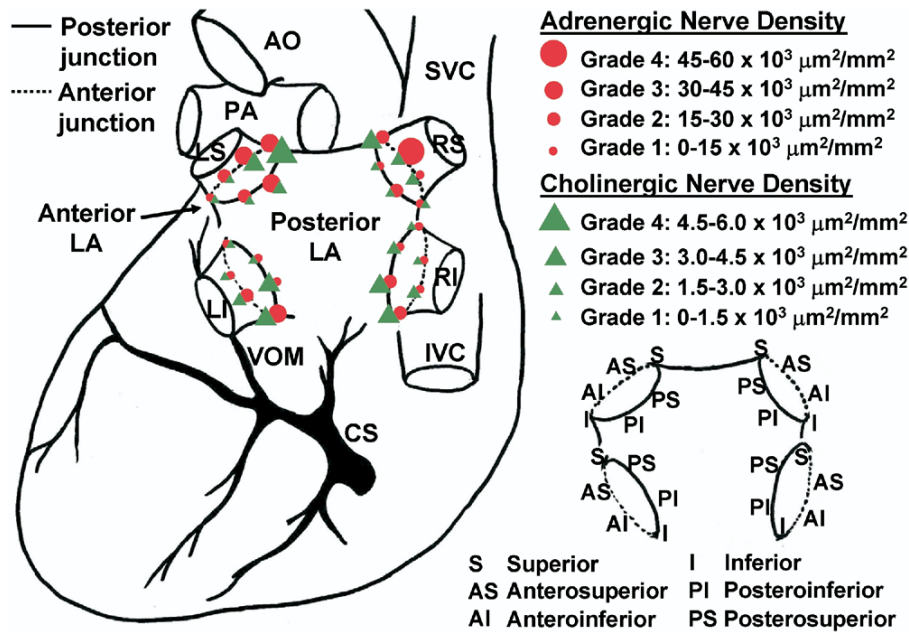


Figure 28 Distribution des fibres nerveuses adrénérquiques et cholinérquiques à niveau de l'orifice des VP chez l'Homme.

AO = aorte ; CS : sinus coronaire ; IVC : veine cave inférieure ; LA : oreillette gauche ; LI : VP inférieure gauche ; LS : VP supérieure gauche ; PA : artère pulmonaire ; RI : VP inférieure droite ; RS : VP supérieure droite ; SVC veine cave supérieure ; VOM : veine de Marshall.

B. Existence incertaine d'autres types cellulaires dans le manchon

L'existence dans ce manchon d'autres types cellulaires dotés d'activité pacemaker est encore débattue.

D'après certains auteurs, la présence de cellules de Cajal – ou *Cajal-like*, selon l'engagement des auteurs – aurait été mise en évidence dans les VP humaines (Morel *et al.* 2008; Gherghiceanu *et al.* 2008). Ces cellules, physiologiquement présentes dans le muscle lisse, seraient dotées d'une activité *pacemaker*. En effet, elles posséderaient des canaux HCN4 (Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated channel type 4), qui sont porteurs du courant I_f responsable de l'autorythmicité du nœud sinusal. En outre, les cellules de Cajal seraient présentes en plus grande quantité chez les patients souffrant de FA.

D'autres types cellulaires auraient également été identifiés dans ce tissu. Ainsi, des cellules ressemblant à des cellules nodales chez le rat et l'Homme (Masani 1986; Perez-Lugones *et al.* 2003) auraient été retrouvées dans le manchon de cardiomyocytes. Ces travaux suggèrent donc l'existence d'un tissu *pacemaker* et d'un tissu spécialisé dans la conduction électrique à l'intérieur du manchon de cardiomyocytes.

Cette hypothèse, si séduisante soit-elle pour expliquer l'origine des foyers ectopiques dans la VP, a été fortement remise en question par d'autres travaux (Anderson et Ho 2004). Chez le chien, des analyses histologiques du manchon n'ont pas permis de mettre en évidence des cellules ou tissus chargés de la conduction dans le myocarde des VP (Hocini *et al.* 2002). Toutes les cellules présentaient des propriétés histologiques semblables aux cardiomyocytes atriaux. Par ailleurs, les cellules décrites comme étant des cellules nodales par Masani *et al.* ne seraient, selon Hocini *et al.*, que des artefacts et des cellules ischémiées ou lésées lors de l'expérimentation (Masani 1986; Hocini *et al.* 2002).

C. Origine embryonnaire du manchon myocardique des VP

La première hypothèse présentait le manchon de cardiomyocytes des VP comme une extension des cardiomyocytes atriaux : ceux-ci auraient migré vers la media du vaisseau (W. K. Jones, Sánchez, et Robbins 1994). Cependant, cette hypothèse est de plus en plus délaissée au profit d'un postulat plus récent : les cardiomyocytes de VP auraient une origine embryonnaire différente de ceux d'OG. Le myocarde des VP proviendrait de la différenciation des cellules du mésenchyme pulmonaire (Mommersteeg *et al.* 2007). Cette origine embryonnaire différente pourrait ainsi expliquer en partie les différences fonctionnelles observées entre les cardiomyocytes atriaux et les cardiomyocytes de VP.

III. Mécanismes arythmiques dans la VP

A. Activités déclenchées et automatismes

1. Existence controversée d'un automatisme physiologique dans la VP

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'existence des foyers d'activité électrique anormaux dans le manchon de cardiomyocytes de la VP.

La première impliquerait la présence dans la VP de cellules de type *pacemaker* (*Cajal-like*). Cette hypothèse a été fortement remise en cause par la majorité des études (Morel *et al.* 2008).

La seconde hypothèse est fondée sur l'existence chez le lapin de deux populations de cardiomyocytes : certains présenteraient une activité *pacemaker*, d'autres non. (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002). Toutefois, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par les autres équipes de recherche travaillant sur la VP de chien (Hocini *et al.* 2002; Ehrlich *et al.* 2003). Les

résultats expérimentaux du laboratoire nous ont également permis d'écarter cette hypothèse chez le rat (Doisne *et al.* 2009).

Actuellement, l'hypothèse de l'existence d'un automatisme physiologique dans le manchon de cardiomyocytes de la VP est délaissée par la majorité des chercheurs travaillant sur le sujet.

2. Activités déclenchées dans les cardiomyocytes de VP

L'origine des foyers d'activité électrique de la VP ne pouvant pas être expliquée par un mécanisme de type « automatisme », les recherches se sont tournées vers une origine des foyers relevant d'activités déclenchées. De nombreuses études ont rapporté l'existence d'activités déclenchées de type DAD et EAD dans les cardiomyocytes de VP. Ces anomalies électriques résulteraient notamment de dysfonctionnements dans la gestion du calcium par la cellule (décrits ci-dessous).

Chez le lapin, Honjo *et al.* (2003) ont montré que l'utilisation de ryanodine à une concentration stabilisant les RyR2 dans un état de faible conductance (0,5-2 μM) induisait une fuite continue de calcium du réticulum sarcoplasmique. Le calcium libéré activerait un courant d'échange I_{Ti} capable de dépolariser progressivement la membrane plasmique (dépolarisation supposée de type DAD) jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement d'un PA puis d'activités électriques continues. Dans une préparation contenant VP et oreillettes, cette activité électrique déclenchée par la ryanodine se présenterait sous forme de foyers ectopiques qui feraient échapper la VP au rythme sinusal. Cette dernière suivrait alors le rythme imposé par les foyers ectopiques (Honjo *et al.* 2003).

Une autre étude, menée chez la souris, a montré que des libérations calciques spontanées dans les cardiomyocytes de VP pouvaient les affranchir du rythme imposé par une stimulation électrique externe. Ces travaux ont également révélé que l'activité calcique spontanée variait fortement d'une cellule à l'autre dans le manchon myocardique des VP, suggérant une hétérogénéité de la population de cardiomyocytes (Rietdorf, Bootman, et Sanderson 2014).

Chez le chien, des activités calciques spontanées à l'origine de foyers électriques anormaux dans la VP ont été mises en évidence, de même que des post-dépolarisations précoces induites par un raccourcissement du PA et une augmentation du transitoire calcique (Chou *et al.* 2005; Patterson *et al.* 2005). Selon ces auteurs, l'incidence des activités ectopiques serait renforcée par l'activation du système nerveux autonome et en particulier par le système parasympathique.

Tous ces résultats suggèrent donc l'existence d'une hétérogénéité du comportement calcique parmi les cardiomyocytes de VP aboutissant à l'apparition ponctuelle de foyers d'arythmies.

3. L'« automatisme catécholaminergique » : un mécanisme arythmique inexpliqué spécifique de la VP

a. Description générale

Au sein du laboratoire, il a été montré que la superfusion des lambeaux isolés de VP de rat par la noradrénaline induisait l'apparition d'une activité automatique générée par le manchon de cardiomyocytes et organisée en salves de PA (Figure 29).

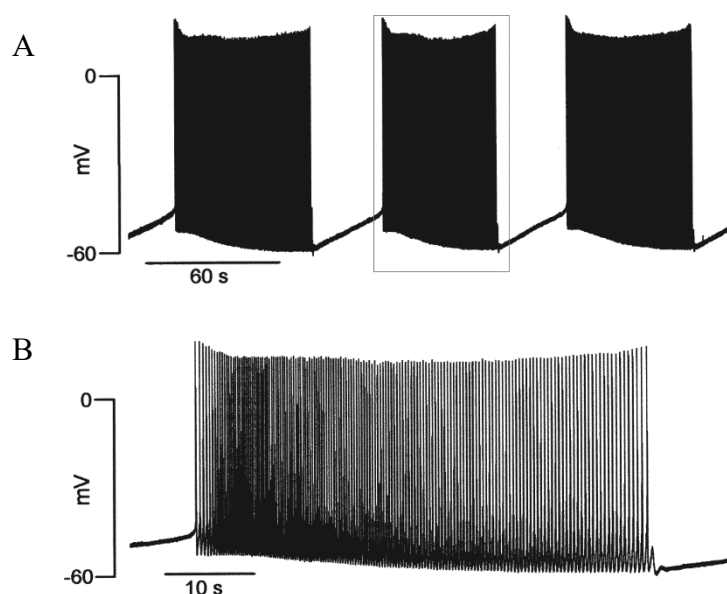


Figure 29 Salves d'activités électriques automatiques déclenchées par la noradrénaline dans le manchon de cardiomyocytes des VP (modifiée d'après Doisne *et al.* (2009)).

A : enregistrement de plusieurs salves consécutives d'activités électriques. **B :** vue agrandie de la salve encadrée du tracé (A). Ces tracés ont été obtenus avec la technique de microélectrode intracellulaire.

Cet automatisme qui dépend de la stimulation conjointe des récepteurs α_1 - et β_1 -adrénergiques, a été baptisé « activité automatique catécholaminergique » (AAC) et est spécifique des VP puisqu'il n'est pas observé au sein des lambeaux d'OG (Maupoil *et al.* 2007; Doisne *et al.* 2009).

Plus récemment, une activité automatique continue induite par la noradrénaline a été observée sur des cardiomyocytes isolés de VP de rat (Okamoto *et al.* 2012).

Les mécanismes précis à l'origine de cette AAC n'ont pas encore été complètement déterminés.

b. Origines supposées de l'automatisme catécholaminergique

i. Analogies avec l'automatisme physiologique du nœud sinusal

Un mécanisme semblable à celui responsable de l'autorythmicité cardiaque pourrait intervenir dans le déclenchement des arythmies induites par la noradrénaline.

Deux mécanismes seraient à l'origine de l'autorythmicité du nœud sinusal :

– le courant I_f induit par l'ouverture de canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation membranaire (e.g. les canaux HCN4). Ces canaux sont perméables notamment aux ions Na^+ et K^+ et induisent une dépolarisation membranaire lors de leur ouverture (DiFrancesco et Noble 2012) ;

– « l'horloge calcique ». L'activité électrique générée dans le nœud sinusal proviendrait d'une libération calcique spontanée du réticulum sarcoplasmique. Cette dernière, de type *sparks*, serait initiatrice – *via* un courant I_{ti} – de la dépolarisation diastolique conduisant au PA (Lakatta et DiFrancesco 2009).

L'implication possible du courant I_f dans l'automatisme catécholaminergique a été exclue, car d'une part, les canaux HCN4 ne sont pas exprimés dans le myocarde des VP de rat (Yamamoto *et al.* 2006) et d'autre part, un blocage d'un éventuel courant I_f par l'ivabradine n'a aucun effet sur les salves de PA anormaux (Doisne 2009). Enfin, des études électrophysiologiques des cardiomyocytes des VP suggèrent une implication des courants calcique et sodique dans le déclenchement des PA ectopiques (Malécot *et al.* 2015).

L'hypothèse de l'existence d'une horloge calcique dans les CM de VP n'a pas encore été explorée.

ii. Implication possible des récepteurs de l'IP3

Dans les cardiomyocytes, l'activation de la voie de signalisation associée aux récepteurs α_1 -adrénergiques pourrait conduire à l'activation d'une protéine G_q et finalement à la production d'inositol triphosphate (IP₃), (pour revue voir O'Connell *et al.* (2014)). Les AAC pourraient donc être causées par une activation des récepteurs de l'inositol triphosphate (IP₃R) situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, près des RyR2. L'activation des IP₃R

provoquerait une libération de calcium du réticulum sarcoplasmique suffisante pour activer des RyR2 localisés à proximité. De plus, la libération calcique due à l'ouverture des RyR2 serait renforcée par la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques qui augmente la charge calcique du réticulum sarcoplasmique. La suite du mécanisme serait équivalente à celui des DAD : le calcium libéré de cette manière engendrerait l'apparition d'un courant I_{ti} lors de son extrusion par l'échangeur sodium-calcium. Si ce courant est assez important, l'amplitude de la DAD pourrait alors être suffisante pour déclencher un nouveau PA (Okamoto *et al.* 2012).

iii. Analogies avec la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique

L'automatisme catécholaminergique présente une importante analogie avec la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC) qui est un trouble du rythme ventriculaire. La TVPC est caractérisée par la survenue de DAD qui apparaissent lors des décharges de catécholamines induites par l'activation du système nerveux sympathique. Ces DAD seraient dues à une dérégulation des RyR2 induisant une instabilité de l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes. La TVPC est généralement d'origine génétique et serait causée par une mutation du gène codant les RyR2 ou la calséquestrine (George *et al.* 2007). À notre connaissance, l'existence d'un mécanisme arythmique semblable entre TVPC et AAC n'a pas encore été explorée.

B. Les réentrées

Chez l'Homme, de nombreux travaux suggèrent indirectement que des phénomènes de réentrées pourraient initier ou perpétuer les épisodes de FA. (Pour rappel des mécanismes et facteurs prédisposant aux réentrées, voir la partie « Facteurs favorisant les réentrées » page 57)

Il s'agit principalement d'études montrant l'existence de facteurs favorisant l'apparition des réentrées. Une étude clinique de cartographie électrique par cathéter a montré notamment que chez les patients souffrant de FA, les cardiomyocytes de VP avaient une période réfractaire plus courte que les cardiomyocytes des patients sains. Des études ont également montré l'existence dans la VP de zones où la vitesse de conduction est réduite (Jaïs *et al.* 2002; Kumagai *et al.* 2004). Ces phénomènes sont connus pour favoriser les réentrées (Arora *et al.* 2003). Cette anisotropie de conduction électrique pourrait être expliquée par l'orientation complexe des fibres myocardiques dans les VP (Nathan et Eliakim 1966). Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par des études chez le chien, qui ont montré qu'un changement abrupt de

l'orientation des fibres était associé à un retard de conduction (Hocini *et al.* 2002). Chez cette même espèce, deux autres caractéristiques de la VP la prédisposent aux réentrées : d'une part les PA des cardiomyocytes de VP sont courts et, d'autre part, le potentiel électrique membranaire de repos est moins négatif (-66 mV) que dans les cardiomyocytes atriaux (-74 mV) (Ehrlich *et al.* 2003). Enfin, toujours chez le chien, plusieurs équipes ont pu déclencher des phénomènes de réentrée stables dans la VP (Po *et al.* 2005; Chou *et al.* 2005).

Une étude réalisée chez le rat a également suggéré que le myocarde de la VP présentait une forte prédisposition au déclenchement de réentrées du fait de l'hétérogénéité des propriétés de repolarisation des cardiomyocytes qui le constituent (Miyachi *et al.* 2005).

Tous ces éléments concordent pour montrer une prédisposition particulière de la VP aux phénomènes de réentrées.

C. Conclusions

Dans la FA paroxystique, aucun mécanisme expliquant l'origine des foyers arythmiques présents dans les VP ne fait actuellement consensus au sein de la communauté scientifique. Toutefois, l'hypothèse d'un mécanisme arythmique impliquant le calcium mérite des études plus approfondies.

OBJECTIFS

L'ion calcium est fréquemment impliqué dans la génération des troubles du rythme initiés par les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires ; il pourrait donc être également impliqué dans les arythmies déclenchées par les cardiomyocytes de VP (Ter Keurs et Boyden 2007; Venetucci *et al.* 2008; Gomez-Hurtado et Knollmann 2014).

Pour explorer plus en détail l'hypothèse calcique comme origine des foyers électriques ectopiques et de l'automatisme catécholaminergique dans les cardiomyocytes de VP, il est nécessaire de connaître précisément le fonctionnement du cycle du calcium dans ce type de cardiomyocyte. Or celui-ci, bien que décrit dans les cardiomyocytes ventriculaires depuis les travaux de Fabiato et Fabiato dans les années 1980 (Fabiato 1983) et dans les cardiomyocytes atriaux depuis les années 2000, a été très peu étudié et reste mal connu dans les cardiomyocytes de veine pulmonaire.

L'objectif principal de ce travail a donc été de caractériser le cycle du calcium des cardiomyocytes de VP et de le comparer à celui des cardiomyocytes d'OG et de VG à l'aide 1) d'une étude structurelle des éléments impliqués dans les échanges calciques survenant dans ces cardiomyocytes et 2) d'une étude fonctionnelle des variations de la concentration calcique cytoplasmique suite à une stimulation électrique ou apparaissant de manière spontanée.

Dans un premier temps, nous avons entrepris l'étude de l'architecture membranaire des cardiomyocytes de VP. Cette étude visait en particulier à permettre d'identifier les conséquences de l'organisation membranaire (en particulier des tubules transverses) sur la distribution spatiale des canaux calciques et des récepteurs à la ryanodine. En effet, les études menées sur les cardiomyocytes d'OG et de VG ont mis en lumière l'incidence de l'organisation de ces canaux et récepteurs sur la forme des transitoires calciques de ces cardiomyocytes (Kirk *et al.* 2003; Brette *et al.* 2004).

Nous avons dans un deuxième temps mené une étude quantitative des transitoires calciques, pour 1) déterminer l'importance relative des mécanismes d'extrusion et de recapture du calcium cytoplasmique dans les cardiomyocytes de VP par rapport aux cardiomyocytes d'OG et de VG ; 2) explorer l'effet d'agonistes des récepteurs α_1 - et β -adrénergiques.

La fréquence de survenue des événements calciques spontanés (*sparks* et *waves*) dans les cardiomyocytes isolés de VP a aussi été étudiée, puisqu'ils sont considérés comme arythmogènes dans les autres types de cardiomyocytes (Venetucci *et al.* 2008). Les *sparks* ont été étudiés en conditions basales, mais également en présence de noradrénaline – qui est responsable du déclenchement d'activités automatiques catécholaminergiques décrites dans les anneaux isolés de VP de rat (Maupoil *et al.* 2007) –, ainsi qu'en présence des deux principaux facteurs de risque de FA : l'âge et l'hypertension artérielle.

Enfin, la fonction contractile des cardiomyocytes de VP a été explorée afin de déterminer si les résultats des études des transitoires calciques menées précédemment avaient des répercussions sur la fonction mécanique des cardiomyocytes de VP. Une contraction non uniforme des cardiomyocytes de VP pourrait aussi contribuer au potentiel arythmogène de ce tissu (Wakayama *et al.* 2005; Ter Keurs *et al.* 2006; Miura *et al.* 2010).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Animaux

Les travaux d'imagerie, de fluorescence calcique, de biologie moléculaire et de contraction ont été réalisés sur des rats mâles de souche Wistar âgés de 3 et/ou 10 mois pesant entre 300 et 450 g au moment de leur utilisation pour les rats de 3 mois et entre 550 g et 650 g pour les rats de 10 mois. Certaines expériences ont été réalisées sur des rats mâles âgés de 15 mois spontanément hypertendus (SHR) pesant entre 450 et 550 g et leurs contrôles normotendus Wistar Kyoto (WKY) pesant entre 600 et 650 g. La présence (rat SHR) ou l'absence (rat WKY) d'une hypertension a été contrôlée par une mesure de la pression artérielle carotidienne. Les rats SHR avaient une pression artérielle systolique de $203,6 \pm 12$ mmHg et les rats WKY de $89,5 \pm 4,9$ mmHg.

Ces rats, obtenus auprès du centre d'élevage R. Janvier (Le Genest Saint Isle, France), ont été hébergés en animalerie (agrément E 37-261-4) et ont eu accès à une nourriture standard et à l'eau de ville *ad libitum*. Ils ont été acclimatés pendant une semaine à l'animalerie avant toute expérimentation.

Les protocoles expérimentaux réalisés sur ces animaux ont été approuvés par le comité d'éthique du Val de Loire (saisine n° 2011/04/01).

II. Prélèvement et préparation du matériel biologique

Les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital sodique (60 mg/Kg) administré par voie intra-péritonéale, puis ils ont reçu une injection intraveineuse d'héparine (500 UI/kg). Le bloc cœur-poumons a ensuite été rapidement prélevé et placé dans une cuve à dissection contenant une solution cardioplégique refroidie à 4°C (en mM : NaCl 110, KCl 16, CaCl₂ 1,20, MgCl₂ 16, NaHCO₃ 10 et glucose 10). Les VP, OG et ventricule ont été disséqués sous loupe binoculaire. Les sites de prélèvement de l'OG et des VP destinées aux travaux sur des anneaux isolés sont représentés sur la Figure 30).

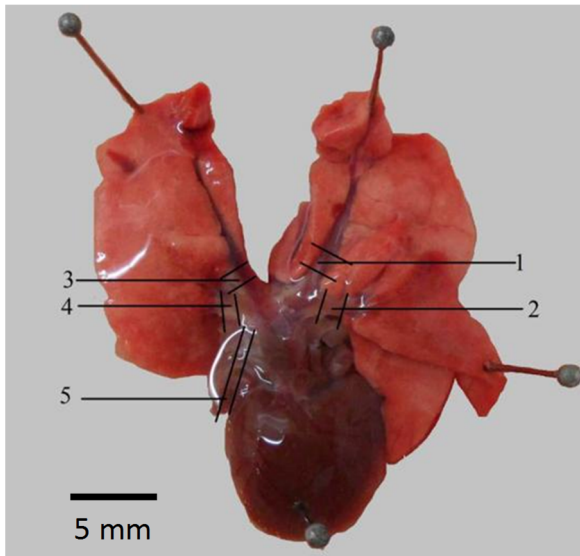


Figure 30 Bloc cœur-poumons d'un rat Wistar mâle âgé de 3 mois.

1, 2, 3 et 4 correspondent aux sites de prélèvement des veines pulmonaires postérieures et antérieures droites et de leurs deux ramifications. 5 correspond au site de prélèvement de l'oreillette gauche. Les anneaux prélevés ont une longueur d'environ 4 mm.

III. Dissociation des cardiomyocytes

A. Dissociation des CM d'OG et de VP

Les veines pulmonaires gauche et postérieure droite ainsi que l'oreillette gauche ont tout d'abord été nettoyées de toute trace de tissus étrangers. Ils ont ensuite été placés dans une solution de KRB (en mM : NaCl 35, KCl 4,75, KH₂PO₄ 1,19, Na₂HPO₄ 16, NaHCO₃ 25, Sucrose 134, HEPES 10, Glucose 10, pH=7,4 saturée par du carbogène (O₂ 95 % ; CO₂ 5 %)) contenant 2 mM d'EGTA-KOH pendant dix minutes au bain-marie à 37°C. Après rinçage avec du KRB, les tissus ont subi deux digestions enzymatiques successives à 37°C avec une solution de KRB contenant 0,6 U/mL de Libérase™ (Roche Diagnostics) et 1 U/mL de Protéase XXIV (Sigma-Aldrich) (30 minutes) puis 0,48 U/mL de Libérase™ seule (15 minutes). À la fin de la digestion enzymatique, les tissus ont été placés dans une solution de Tyrode « 0 Ca²⁺ » (en mM : NaCl 140 ; KCl 5,37 ; MgCl₂ 1 ; NaH₂PO₄ 0,33 ; HEPES 10 et glucose 11 ; pH ajusté à 7,40) contenant 1 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem, set 1), et 20 % de sérum de veau fœtal (Lonza), sous agitation, pour une étape de dissociation mécanique lente durant une à deux heures.

B. Dissociation des CM de VG

Pour isoler les cardiomyocytes de VG, le cœur entier a été monté sur un système de Langendorff. Les vaisseaux coronaires ont tout d'abord été perfusés de manière rétrograde par l'aorte pendant une dizaine de minutes avec une solution de KRB à 37°C, puis avec la même solution contenant 0,1 U/mL de Libérase™ et 0,15 U/mL de Protéase type XXIV. La digestion

a été arrêtée lorsque le cœur présentait un aspect visqueux avec des zones blanchâtres. Le ventricule gauche a alors été séparé du reste du cœur et découpé en morceaux avant de subir une étape de dissociation mécanique douce des cardiomyocytes avec une pipette Pasteur polie à la flamme. Une fois dissociés, les cardiomyocytes ont été placés dans une solution de Tyrode « 0 Ca²⁺ ».

C. Conservation des CM isolés

À la fin de l'isolement la concentration calcique de la solution de Tyrode « 0 Ca²⁺ » dans laquelle les cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG étaient en suspension a été augmentée progressivement de 0 à 1,36 mM en 1 heure. Les cardiomyocytes ont ensuite été conservés dans cette même solution à 22°C en attendant leur utilisation.

Pour limiter les biais de sélection, tous les travaux impliquant des cardiomyocytes isolés vivants et fixés ont été réalisés sur des cellules choisies en lumière transmise en fonction des critères suivants : une membrane et des sarcomères bien visibles, une forme allongée et une absence de bulles dans le cytoplasme.

IV. Microscopie confocale

A. Généralités

Hormis la mesure des transitoires calciques globaux, toutes les expériences d'enregistrement de fluorescence ont été réalisées en microscopie confocale (Figure 31). Cette technique permet de limiter la contamination lumineuse par la fluorescence provenant d'autres plans focaux que celui observé. Le diamètre du *pinhole* (petit diaphragme) est choisi de sorte à obtenir des plans focaux les plus fins possible (~400 nm) selon la longueur d'onde d'émission de la sonde utilisée, tout en conservant un rapport signal sur bruit correct.

Les microscopes utilisés étaient les Olympus FV500 et FV1000 et LEICA SP8 gSTED pour l'enregistrement des *sparks* (XT), des marquages membranaires et des immunomarquages (XY et XYZ). Un Dynascope Zeiss LSM710 NLO a été utilisé pour l'enregistrement (XYT) des transitoires calciques des cardiomyocytes entiers sur un seul plan focal. Les objectifs utilisés étaient des x60 et x63 immersion à huile ayant une ouverture d'au moins 1,4.

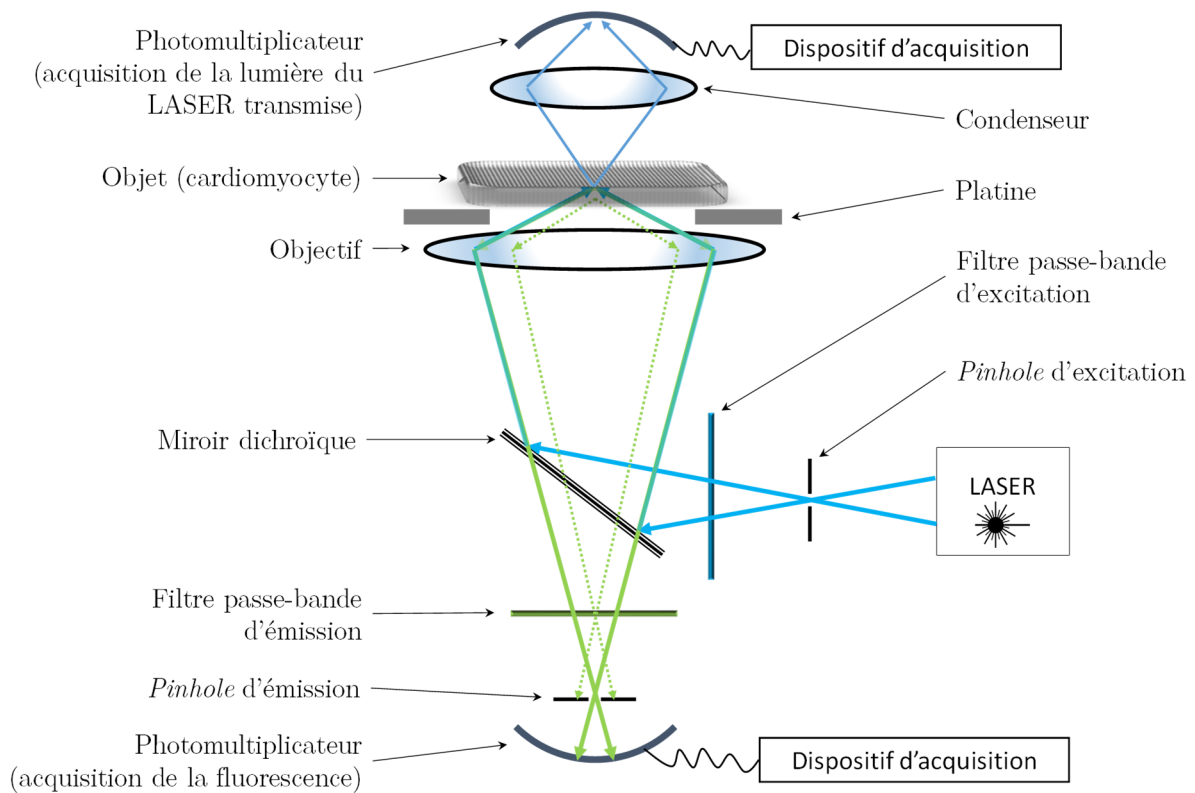


Figure 31 Schéma simplifié du trajet optique d'un microscope inversé confocal.

La présence d'un « *pinhole* » (petit diaphragme) devant la source d'excitation lumineuse permet de focaliser précisément la lumière d'excitation dans une « unité de volume » de l'échantillon. La lumière fluorescente réémise traverse également un *pinhole*, qui arrête la lumière provenant d'autres zones que celle sur laquelle est focalisée la lumière excitatrice, en particulier celle provenant d'autres plans focaux. Chaque unité de volume de l'échantillon est balayée par le LASER et la lumière de fluorescence émise est stockée dans un voxel. L'image acquise correspond à l'ensemble des voxels, elle est reconstruite à la fin du balayage de l'échantillon.

B. Marquages fluorescents sur cardiomyocytes vivants

Pour visualiser simultanément les tubules transverses et les transitoires calciques des cardiomyocytes vivants, ceux-ci ont été incubés 30 minutes à température ambiante avec 10 μM de di-8-ANEPPS (Molecular Probes) et 10 μM de Fluo-4 AM (Molecular Probes) (Kirk *et al.* 2003).

Les expériences ont ensuite été réalisées dans une enceinte thermostatée à 32°C, qui correspond dans nos conditions expérimentales à la température minimale d'apparition des activités automatiques catécholaminergiques dans le myocarde des VP. Les cardiomyocytes étaient superfusés avec une solution de Tyrode (en mM : NaCl 140 ; KCl 5,37 ; CaCl₂ 1,36 ; MgCl₂ 1 ; NaH₂PO₄ 0,33 ; HEPES 10 et glucose 11 ; pH ajusté à 7,40). Les deux sondes ont été excitées à 488 nm avec un laser Argon et leurs fluorescences collectées entre 505 et 525 nm pour le Fluo-4 et au-delà de 660 nm pour le di-8-ANEPPS. L'image des tubules transverses a été acquise de manière classique (XY) avec une taille de pixel d'environ 140 nm. Les

transitoires calciques ont été déclenchés par des stimulations électriques de champ *via* deux électrodes en platine espacés de 5 mm (65 mA, 1 Hz, 2 ms) et enregistrés en mode « linescan » (XT) le long d'une ligne dans l'axe transversal du cardiomyocyte dans un plan choisi au centre de celui-ci en évitant le noyau. La taille des pixels était d'environ 150 nm (X) x 2 ms (T).

Les images XYT ont été acquises à des fréquences supérieures ou égales à 270 Hz.

C. Marquages fluorescents sur cardiomyocytes fixés

Pour faciliter leur adhésion, les cardiomyocytes isolés ont été déposés dans une boîte de Pétri de 35 mm à fond de verre préalablement enduit de BD Matrigel™ (Dutscher) ou de collagène extrait de queues de rats préparé au laboratoire selon le protocole de Bornstein (Bornstein 1958). Ils ont été fixés pendant 1 heure avec une solution de PBS (en mM : NaCl 130 ; KCl 2,07 ; Na₂HPO₄ 1,5 ; KH₂PO₄ 8 ; pH ajusté à 7,4) contenant 4 % de paraformaldéhyde. Ils ont ensuite été perméabilisés avec une solution de PBS contenant 0,5 % de Triton X100 (Sigma-Aldrich) pendant 1 heure à température ambiante. Les sites de fixation non spécifiques des anticorps ont ensuite été saturés par du PBS contenant 4 % d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 40 minutes avant d'ajouter à cette solution les anticorps primaires dirigés contre les RyR2 (dilution : 1/200^{ème}, monoclonal de souris MA3-916, Pierce) et les Cav1.2 (dilution : 1/100^{ème}, polyclonal de lapin 818-835, dirigé contre la sous-unité α_1c du canal, Calbiochem). L'incubation avec les anticorps primaires a duré environ 12 heures à la température de 4°C. Les anticorps secondaires fluorescents (dilutions : 1/400^{ème}, poulet anti-souris AF488 et âne anti-lapin AF555, Molecular Probes) ont ensuite été incubés avec les cardiomyocytes pendant 1 heure à température ambiante. Après cela, les cellules ont été placées sous une lamelle en verre dans un milieu de montage Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich). Les anticorps secondaires fluorescents ont été excités à 488 et 543 nm ; leur fluorescence émise a été acquise de manière séquentielle respectivement à 500 ± 15 nm et à 555 ± 50 nm. L'auto-fluorescence de chaque préparation et la sélectivité des anticorps avec leurs peptides bloquants ont été préalablement contrôlées.

D. Marquages fluorescents sur tissus fixés

Les tissus de veine pulmonaire et d'oreillette gauche fraîchement prélevés ont été ouverts et étendus à l'aide de minuties, puis fixés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution cardioplégique contenant 4 % de paraformaldéhyde. Ils ont ensuite été incubés pendant une semaine à 4°C avec de l'agglutinine de germe de blé rendue fluorescente par conjugaison à la fluorescéine (Molecular Probes). Les tissus ont ensuite été montés entre lame

et lamelle avec du Mowiol 4-88. Selon l'expérience, les faces luminale ou abluminale de la VP ainsi que l'endocarde ou l'épicarde de l'OG ont été placées côté lamelle. L'excitation de la fluorescéine a été réalisée à 488 nm avec un laser Argon et l'émission acquise entre 505 et 525 nm. Comme les VP contiennent d'autres types cellulaires que des cardiomyocytes (e.g. cellules musculaires lisses et cellules endothéliales), les cardiomyocytes ont été identifiés à leur aspect strié bien visible en lumière transmise. Des contrôles de la spécificité des marquages ont été réalisés sur des coupes de tissu ventriculaire dans les mêmes conditions expérimentales.

E. Analyse des images

Toutes les images issues de microscopie confocale ont été analysées à l'aide des logiciels ImageJ (Schneider, Rasband, et Eliceiri 2012) et R (R Development Core Team 2011) dans le respect des règles tacites de bonnes pratiques de l'analyse d'image.

L'analyse de la régularité des réseaux de tubules transverses a été réalisée avec le plugin TTorg que nous avons développé pour ImageJ (Pasqualin *et al.* 2015). L'algorithme utilisé est décrit dans la partie « Résultats » page 107.

L'analyse de la distance séparant les RyR2 des Cav1.2 sur un plan focal a été réalisée avec un algorithme que nous avons développé pour ImageJ et R. Les images ont été préalablement déconvoluées avec l'algorithme de Richardson-Lucy, puis la distance euclidienne séparant chaque cluster de RyR2 de son cluster de Cav1.2 le plus proche a été mesurée. L'histogramme de distribution de ces distances a permis d'estimer la proportion de RyR2 orphelins de Cav1.2 dans un plan focal pour chaque cardiomyocyte.

V. Enregistrements photométriques des transitoires calciques globaux

A. Généralités

L'enregistrement des variations de la concentration de calcium cytoplasmique des cardiomyocytes a été réalisé par fluorescence. Les cardiomyocytes ont été incubés 30 minutes à température ambiante avec une solution de Tyrode contenant 5 μ M de Fluo-4 AM. Ils ont ensuite été disposés dans une cuve à fond de verre préalablement enduite de BD Matrigel™ pour faciliter leur adhésion, puis superfusés avec une solution de Tyrode pendant au moins 10 minutes avant le début des mesures. Les expériences ont été réalisées à une température de

32-33°C ou à température ambiante. Les observations et mesures ont été réalisées avec un microscope inversé Nikon Diaphot 300 équipé d'un objectif x40 à immersion (huile) ayant une ouverture numérique de 1,3. Le microscope était couplé à un système d'excitation – une lampe Xénon – et d'acquisition de fluorescence – un photomultiplicateur (Nikon P100) équipé d'un filtre passe-bas à 200 Hz relié à un dispositif d'acquisition (décrit dans la partie « Dispositif d'acquisition de numérisation et d'enregistrement » page 101). La bande d'excitation choisie pour le Fluo-4 était de 480 ± 15 nm et la bande d'émission acquise était de 555 ± 15 nm.

Les enregistrements des transitoires calciques des cardiomyocytes ont été réalisés suite à une stimulation électrique de champ (1 Hz, 2 ms), par une paire d'électrodes en platine espacées de 5 mm. Les impulsions électriques envoyées présentaient une intensité suffisante pour induire une réponse contractile perceptible du cardiomyocyte, généralement 65 mA. Les mesures ont été réalisées lorsque le cardiomyocyte était dans un état stable, lequel est considéré comme atteint lorsqu'il n'y a plus de variations monotones de l'amplitude du transitoire calcique pendant au moins 45 stimulations.

Les amplitudes des transitoires calciques ainsi mesurées ont été exprimées en ratio de fluorescence par rapport à la concentration calcique diastolique (F/F_0). Aucune étude ne permet d'affirmer que les environnements intracellulaires des cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG sont suffisamment semblables pour que le k_d du Fluo-4 pour le calcium soit identique dans ces trois types de cardiomyocytes. L'utilisation d'une mesure relative (F/F_0) a donc permis d'éviter cette approximation. La constante de décroissance des transitoires calciques (τ) a été calculée par un ajustement de la phase décroissante sur un modèle mono-exponentiel décroissant $[Ca]_{(t)} = [Ca]_{(0)} e^{-\frac{t}{\tau}}$. Le temps au pic (TTP) a été déterminé par la fonction native d'analyse de pic de Labchart 8 (ADInstruments).

B. Étude des mécanismes d'extrusion et de recapture du calcium cytoplasmique

Pour l'étude des mécanismes d'extrusion/recapture du calcium cytoplasmique, un protocole semblable à celui de Walden *et al.* (2009) a été utilisé. Il consiste à déterminer les constantes de cinétique de décroissance des transitoires calciques évoqués par une stimulation électrique et par une perfusion de caféine. Ces constantes ont été obtenues par l'ajustement de la phase de décroissance de chaque transitoire sur un modèle mono-exponentiel décroissant $[Ca]_{(t)} = [Ca]_{(0)} e^{-kt}$. Pour un transitoire calcique évoqué par une stimulation électrique, k représente la vitesse de sortie du calcium du cytoplasme par les mécanismes de recapture et d'élimination (SERCA, NCX, PMCA, mitochondries) ; nous l'avons donc appelée k_{globale}

(Figure 32). En présence de caféine (10 mM) et en absence de stimulation électrique, les RyR2 sont bloqués dans un état ouvert, ce qui rend la SERCA inopérante, k correspond donc à la vitesse d'élimination du calcium par le NCX et la PMCA et dans une moindre mesure, à la recapture par les mitochondries. Cette constante a donc été appelée $k_{\text{NCX+PMCA+mitoch}}$. La vitesse de recapture par la SERCA (k_{SERCA}) a alors été obtenue par le calcul de la différence entre k_{globale} et $k_{\text{NCX+PMCA+mitoch}}$. La part de calcium éliminée du cytoplasme par chacune de ces deux composantes a ensuite été calculée en fonction du pourcentage de leurs vitesses respectives par rapport à la vitesse d'élimination globale.

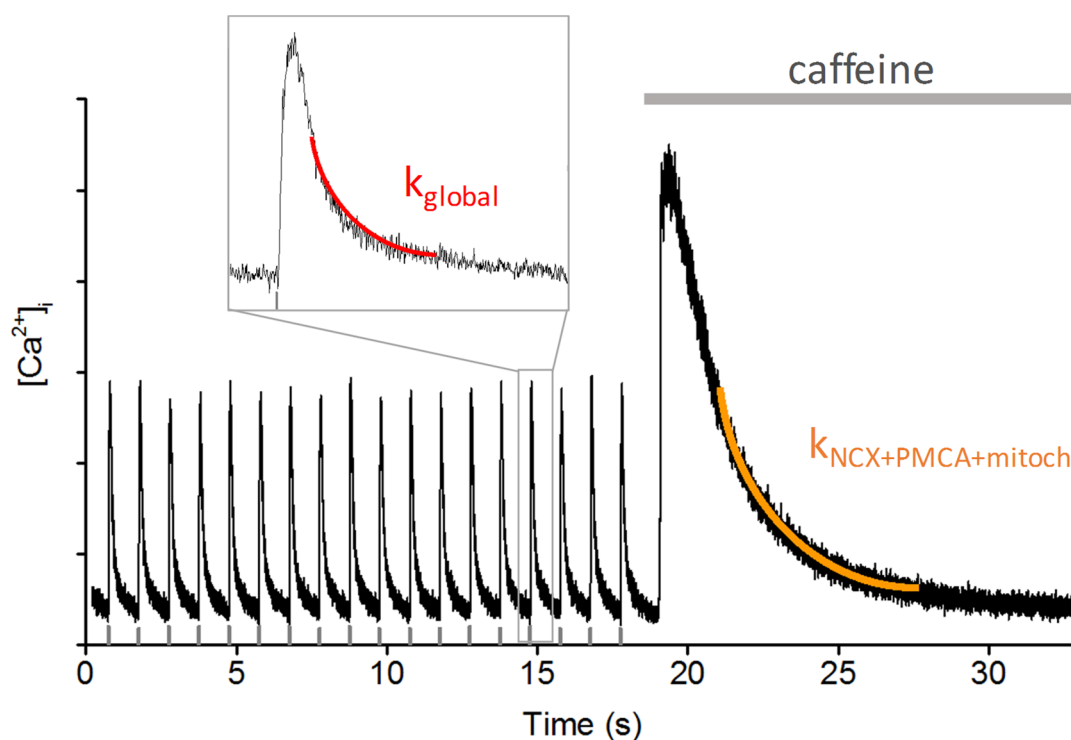


Figure 32 Méthode de détermination des constantes de cinétique de recapture et d'élimination par le NCX, la PMCA et les mitochondries.

Les traits gris sur l'axe des abscisses indiquent les moments de la stimulation électrique. Les courbes rouge et orange représentent les ajustements des phases de décroissance des transitoires calciques sur un modèle mono-exponentiel décroissant. Ces ajustements permettent de déterminer les constantes de cinétique de décroissance (k_{globale} et $k_{\text{NCX+PMCA+mitoch}}$).

C. Cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique

La cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique a été estimée selon le protocole décrit par Brette *et al.* (2005). Les cardiomyocytes, superfusés avec du Tyrode à 32°C, ont été stimulés à 1 Hz jusqu'à l'obtention d'un état stable. La stimulation électrique a ensuite été arrêtée et les cardiomyocytes ont été superfusés avec du Tyrode contenant 10 mM de caféine. À la fin du transitoire évoqué par la caféine, lorsque la $[Ca^{2+}]_i$ a retrouvé son niveau diastolique, la superfusion de caféine a été arrêtée et la stimulation électrique à 1 Hz a été reprise. Le nombre de simulations pour atteindre 50 % de la charge du RS à l'état stable a ensuite été déterminé par comptage.

D. Étude de l'effet de substances pharmacologiques

Les effets d'un agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, la cirazoline (Tocris Bioscience), et d'un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, l'isoprénaline (Tocris Bioscience), ont été étudiés sur le transitoire calcique global des cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG.

Les cardiomyocytes ont été superfusés avec une solution contrôle de Tyrode et stimulés à 1 Hz jusqu'à l'obtention d'un état d'équilibre. Une fois celui-ci atteint, la solution de Tyrode contenant la substance pharmacologique a été superfusée.

L'effet de la cirazoline (5 nM) a été étudié à la température de 32-33°C, car en dessous de cette température nous avons observé que les effets inotropes négatifs de cette substance n'étaient plus visibles sur les anneaux isolés de VP. L'effet de l'isoprénaline (10 nM) a été étudié à la température ambiante de 22°C pour favoriser la survie des cardiomyocytes.

VI. Enregistrement et analyse des événements calciques spontanés

A. Les *sparks*

L'enregistrement des *sparks* spontanés a été réalisé en microscopie confocale dans des cardiomyocytes préalablement chargés avec du Fluo-4, comme décrit dans le protocole de photométrie calcique. Ces cardiomyocytes n'ont pas été préalablement stimulés (Guatimosim, Guatimosim, et Song 2011). Les images ont été acquises en mode « linescan », qui consiste à réaliser un balayage laser d'une ligne tracée dans l'axe longitudinal du cardiomyocyte

(Figure 33). L'image réalisée présente une dimension spatiale (X) et une dimension temporelle (T). La dimension des pixels des images acquises était de 180 nm (X) et 2 ms (T). Le *pinhole* du microscope était réglé de manière à obtenir une résolution axiale de l'ordre de 400 nm. Toutes les expériences impliquant les *sparks* ont été réalisées à la température de 32°C. Pour l'étude des effets de la noradréline, les cardiomyocytes comparés sont issus du même isolement, réalisé à partir des mêmes rats que les cardiomyocytes qui servent de contrôles.

L'analyse de la fréquence de survenue et des caractéristiques des *sparks* a été réalisée avec le plugin SparkMaster pour ImageJ (Picht *et al.* 2007). Les caractéristiques qui ont été analysées pour chaque *spark* sont : l'amplitude ($\Delta F/F_0$), le temps au pic (TTP), la constante de décroissance (Tau), la largeur à 50 % du maximum (FWHM) et la durée à 50 % du maximum (FDHM). Ces caractéristiques ont permis l'estimation de la persistance cytoplasmique et de l'étalement spatial des *sparks*, qui peuvent donner un indice de leur potentiel arythmogène.

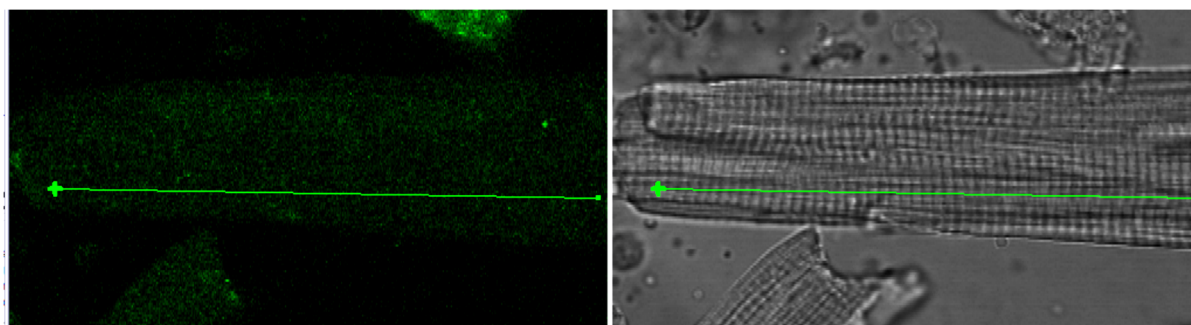


Figure 33 Axe (ligne verte) le long duquel est réalisé le balayage laser pour l'acquisition d'une image de *sparks*.

Un même cardiomyocyte ventriculaire chargé par du Fluo-4, est observé en fluorescence (panneau de gauche) et en lumière laser transmise (panneau de droite).

B. Les *waves*

Pour enregistrer les vagues calciques (*waves*), les cardiomyocytes isolés ont été chargés avec du Fluo-4 AM selon le même protocole que décrit précédemment, et observés avec le même dispositif expérimental que celui décrit pour la mesure des transitoires calciques globaux. Les cardiomyocytes ont été perfusés avec du Tyrode normal à 32°C et ont été soumis à une stimulation électrique de champ (65 mA, 1 Hz, 2 ms) jusqu'à l'obtention d'un transitoire calcique stable pendant au moins 20 secondes. La stimulation électrique a ensuite été arrêtée pendant 90 secondes, temps pendant lequel l'activité calcique spontanée a été enregistrée. Pendant cette période, les vagues calciques ont été définies par tous les pics dont l'amplitude dépassait deux fois l'écart-type au-dessus de la moyenne du signal enregistré pendant les 50 millisecondes précédentes, selon le protocole décrit par Curran *et al.* (2010) (Figure 34).

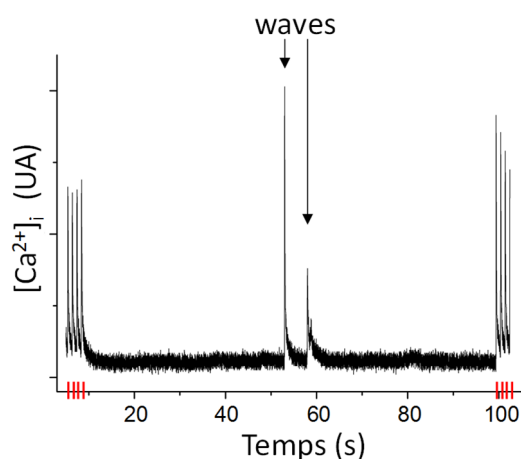


Figure 34 Exemple d'enregistrement des vagues calciques avec la technique décrite ci-dessus. Les marques rouges sur l'axe des abscisses indiquent le moment des stimulations électriques.

VII. Mesures de contractilité

A. Contractilité des cardiomyocytes isolés

La mesure de la contractilité des cardiomyocytes isolés a été réalisée avec le même dispositif expérimental que celui décrit pour la photométrie calcique. Les mesures de contractilité ont été réalisées indépendamment des mesures de variation de la $[Ca^{2+}]_i$ pour éviter l'effet de diminution de la contraction induit par la capacité tampon du Fluo-4 pour le calcium. Pendant toute la durée des expériences, les cardiomyocytes ont été superfusés avec du Tyrode normal et soumis à une stimulation électrique de champ (1 Hz, 2 ms). L'image des cardiomyocytes en lumière transmise a été acquise avec une caméra IDS UI-3060CP. Le flux vidéo a été capturé dans le logiciel ImageJ avec le plugin HF_IDS_Cam que nous avons développé (« High Frequency IDS Camera Capture plugin for ImageJ » 2016). La mesure de la contractilité des cardiomyocytes a été réalisée par analyse du raccourcissement des sarcomères des cardiomyocytes à l'aide de notre plugin SarcOptiM (décrit dans la partie « Développement d'un outil de mesure de la contractilité des cardiomyocytes de veine pulmonaire, d'oreillette gauche et de ventricule gauche » page 145 (Pasqualin *et al.* 2016)).

B. Contractilité des anneaux isolés de VP et d'OG

Toutes les expérimentations fonctionnelles sur tissus ont été réalisées dans des cuves en verre de 2 mL, remplies de solution de Krebs (en mM : NaCl 119 ; KCl 4,7 ; CaCl₂ 1,36 ; MgSO₄ 1,17 ; KH₂PO₄ 1,18 ; NaHCO₃ 25 ; Glucose 5,5 ; pH ajusté à 7,4 ; saturée par du carbogène (O₂ 95 % ; CO₂ 5 %)), maintenues à 37°C grâce à un bain-marie (Polystat, Bioblock

scientifique). Les solutions ont été superfusées à la vitesse de 0,8 mL/min grâce à deux pompes péristaltiques (entrée/sortie). L'anneau de VP ou d'OG était enfilé sur deux supports, dont l'un est fixe et l'autre mobile. Ce dernier était relié à un capteur de force isométrique (25 g, UF1, Pioden Controls) monté sur un micromanipulateur pour permettre le réglage de la tension (Figure 35). Un stimulateur asynchrone quatre voies (STM-BO1, Emka Technologies) a permis de stimuler chaque anneau indépendamment et avec une intensité fixe, par l'intermédiaire de deux électrodes en fil d'argent placées de part et d'autre de l'anneau. L'intensité de stimulation choisie correspondait à quatre fois l'intensité seuil permettant d'obtenir une contraction. L'anneau a ensuite été étiré jusqu'à l'obtention d'une tension stable, permettant d'observer les réponses contractiles maximales des tissus de VP ou d'OG dans les conditions basales et en réponse à différents agents pharmacologiques. Ceci a permis de se placer dans des conditions expérimentales définies et reproductibles.

Les CE_{50} des courbes concentration-effet ont été obtenues après ajustement sur un modèle de fonction logistique.

C. Contractilité des tissus « pelés »

L'ensemble des expériences de contractilité des tissus « pelés » a été réalisé à 22°C. Les anneaux de VP et d'OG de tailles similaires ont été incubés dans une solution de Krebs et oxygénés par du carbogène (95 % O₂, 5 % CO₂). Les anneaux ont été stimulés électriquement (1 Hz) et étirés jusqu'à l'obtention d'une réponse contractile stable et maximale des cardiomyocytes du tissu. Le Krebs a ensuite été remplacé par le milieu de pelage (solution A (décrite ci-après) contenant 0,5 % triton X100), dans lequel les anneaux ont été incubés pendant 30 minutes. À l'issue du pelage, les anneaux ont été immergés successivement dans des cuves contenant des concentrations en calcium croissantes (10⁻⁹ M à 10^{-4,5} M) obtenues par mélange dans différentes proportions des solutions A (en mM : Imidazole 30 ; K-acétate 58 ; Mg-acétate 8,1 ; CaK₂EGTA 0,035 ; K₂EGTA 9,965 ; Na₂ATP 3,3 ; Na₂CP 12 ; DTT 0,3) et B (en mM : Imidazole 30 ; K-acétate 59,4 ; Mg-acétate 7,05 ; CaK₂EGTA 9,962 ; K₂EGTA 0,038 ; Na₂ATP 3,32 ; Na₂CP 12 ; DTT 0,3). Les solutions de Ca²⁺-EGTA ont été préparées par titration, selon la méthode décrite par Tsien et Pozzan (1989). Les coefficients de dissociation utilisés pour le calcul de la concentration en ions calcium libres étaient ceux de Fabiato (1988). Le pelage ayant éliminé les membranes, le calcium libre en solution interagit directement avec les myofilaments et provoque une contraction. Celle-ci a été mesurée pour chaque concentration de calcium. La courbe obtenue a été ajustée sur une fonction de Hill, qui correspond au modèle d'ajustement classique pour les fibres pelées (Veksler *et al.* 1997; Brandt *et al.* 1998).

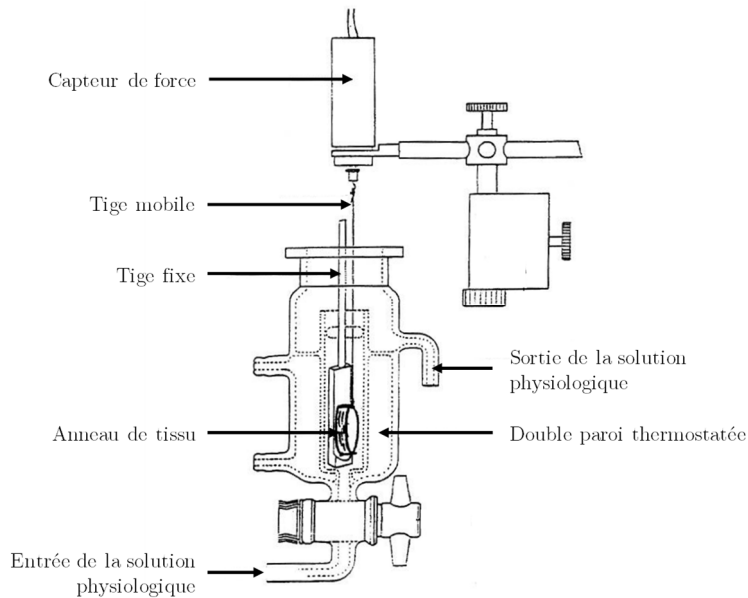


Figure 35 Schéma simplifié du dispositif de mesure de la force de contraction d'un anneau isolé de veine pulmonaire ou d'oreillette gauche.

Les électrodes en fil d'argent et le système d'oxygénation ne sont pas représentés sur ce schéma. Les électrodes sont disposées dans la cuve, de part et d'autre de l'anneau. Le système d'oxygénation consiste en l'apport de carbogène par un verre fritté disposé dans la cuve à proximité de l'anneau de tissu.

VIII. Dispositif d'acquisition de numérisation et d'enregistrement

Le dispositif d'acquisition utilisé pour enregistrer les transitoires calciques globaux et la contraction des anneaux isolés était un système comprenant une interface d'acquisition PowerLab 4/25 et le logiciel LabChart 8 (ADInstruments). Le signal analogique a été numérisé sur 16 bits. La fréquence d'échantillonnage utilisée était de 1 kHz pour toutes les expériences.

IX. Quantification de l'expression des protéines

A. Généralités

La quantification de l'expression des Cav1.2, RyR2, NCX1 et PLB a été réalisée par la technique de *Western Blot*.

Les protéines de l'échantillon sont préparées puis séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse et enfin transférées sur une membrane. Les protéines d'intérêt sont ensuite complexées à des anticorps primaires spécifiques de celles-ci, puis les anticorps primaires sont complexés à des anticorps secondaires couplés à un système de détection par chimioluminescence (peroxydase/luminol). La lumière émise est détectée par une caméra CCD à grande gamme dynamique (16 bits). La quantité de lumière qui est émise par chaque réaction de chimioluminescence est détectée par la caméra. Le nombre de photons émis est donc proportionnel à la quantité de protéine d'intérêt.

B. Extraction des protéines

Les tissus de VP, d'OG et de VG issus de deux rats ont été congelés et lysés sur glace dans un tampon de lyse (en mM : histidine 30, sucrose 250, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete ULTRA (Roche Diagnostics), fluorure de phénylméthylsulfonyl 0,6 and dithiothréitol 1). Les débris cellulaires et les noyaux ont ensuite été éliminés par centrifugation à 11000 g pendant 15 minutes. Les protéines présentes dans le surnageant ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976).

C. Séparation et transfert des protéines

Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire sur un gel (tris-glycine, Bio-rad) à gradient de polyacrylamide (4-20 %) en conditions dénaturantes (β -mercaptoéthanol, dodécylsulfate de sodium). Elles ont ensuite été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinyle (0,45 μ m, Millipore) par électrophorèse en condition humide.

D. Détection et semi-quantification des protéines

Les sites de fixation non spécifiques des anticorps sur la membrane ont été saturés pendant 1 heure à température ambiante par du lait écrémé (5%) dans un tampon TBS-tween 20 (0,1%). Les anticorps primaires dirigés contre Cav1.2 (1/2000^{ème} polyclonal de lapin, Calbiochem), RyR2 (1/2000^{ème} monoclonal de souris, Pierce), NCX1 (1/200^{ème} monoclonal de souris, Swant) et PLB (1/5000^{ème} monoclonal de souris, Santa Cruz Biotechnology) en solution dans le même tampon (lait écrémé/TBS-tween) ont ensuite été incubés avec la membrane pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. Les anticorps primaires non fixés ont été éliminés par trois lavages avec le tampon TBS-tween 20 puis les anticorps secondaires appropriés (1/10000^{ème} mouton anti-souris (GE Healthcare), chèvre anti-lapin (1/10000^{ème} Jackson ImmunoResearch)) couplés à la peroxydase de raifort ont été incubés avec la membrane pendant 1 heure à température ambiante sous agitation douce. Les anticorps secondaires non fixés ont été ensuite éliminés par lavages. La révélation des anticorps secondaires a été réalisée par chimioluminescence en incubant ceux-ci avec un mélange H₂O₂/luminol (Luminata Forte substrate, Millipore). Les signaux de chimioluminescence ont été acquis avec un dispositif G:Box Chemi XR5 (Syngene).

Les images obtenues ont été analysées avec ImageJ pour déterminer la quantité de lumière reçue par le capteur de la caméra. La densité des signaux pour chaque protéine a ensuite été normalisée par rapport à la densité des signaux correspondant à la protéine β -actine.

X. Statistiques

Toutes les statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels R (R Development Core Team 2011) et SigmaStat (Systat Software Inc.). Sauf indication contraire, les résultats sont exprimés en valeur moyennée de n préparations \pm SEM. Les diagrammes en bâtons représentent les moyennes et les barres d'erreur les SEM. Les diagrammes en boîte représentent les minimum, 1^{er} quartile, moyenne (carré), médiane (ligne horizontale), 3^{ème} quartile et maximum.

Les comparaisons de moyennes ont été réalisées à l'aide des tests statistiques de Student et de Mann-Whitney (variances non homogènes ou distribution non normale), ou par des tests ANOVA et ANOVA sur rang. Les tests post-hoc réalisés sont précisés dans les légendes des figures le cas échéant. Les comparaisons de variances ont été réalisées avec des tests de Fisher-Snedecor. Pour tous les tests, une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

I. Caractérisation du cycle du calcium dans les CM de VP : étude structurelle et fonctionnelle

A. Développement d'un outil d'analyse de la régularité de l'organisation des tubules transverses dans les cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG

1. Introduction et objectifs

Les cardiomyocytes de VP possèdent un réseau de tubules transverses qui présente une extension et un niveau d'organisation transversale inconstants au sein de la cellule (Figure 36-A) ainsi que d'un cardiomyocyte à l'autre. Il est donc différent de celui des cardiomyocytes ventriculaires qui possèdent tous un réseau de tubules homogène et bien organisé transversalement (Figure 36-B) et de celui des cardiomyocytes auriculaires qui ne possèdent pas ou peu de tubules transverses (Figure 36-C).



Figure 36 Schémas des principales organisations des réseaux de tubules retrouvés dans les populations des cardiomyocytes de VP (A), VG (B) et OG (C).

Ces caractéristiques singulières des réseaux de tubules des cardiomyocytes de VP ont rendu impossible leur analyse avec les outils traditionnels tels que ceux proposés par Guo *et al.* (Guo et Song 2014).

L'objectif a été de développer un outil robuste capable d'identifier une éventuelle régularité dans l'organisation des tubules et, le cas échéant, de la quantifier. Cet outil devait être utilisable pour les cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG, afin de permettre leur comparaison. L'algorithme a été développé sous la forme d'un plug-in (TTorg) pour le logiciel libre d'analyse d'image fourni par le National Institute of Health (NIH) : ImageJ.

2. Résultats

Ce travail a fait l'objet d'une publication :

Automatic quantitative analysis of t-tubule organization in cardiac myocytes using ImageJ. – Pasqualin C, Gannier F, Malécot CO, Bredeloux P, Maupoil V.
American Journal of Physiology - Cell Physiology 308: C237–C245, 2015.

Automatic quantitative analysis of t-tubule organization in cardiac myocytes using ImageJ

Côme Pasqualin, François Gannier, Claire O. Malécot, Pierre Bredeloux, and Véronique Maupoil

Laboratoire CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Equipe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Tours, France

Submitted 24 July 2014; accepted in final form 5 November 2014

Pasqualin C, Gannier F, Malécot CO, Bredeloux P, Maupoil V. Automatic quantitative analysis of t-tubule organization in cardiac myocytes using ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 308: C237–C245, 2015. First published November 12, 2014; doi:10.1152/ajpcell.00259.2014.—The transverse tubule system in mammalian striated muscle is highly organized and contributes to optimal and homogeneous contraction. Diverse pathologies such as heart failure and atrial fibrillation include disorganization of t-tubules and contractile dysfunction. Few tools are available for the quantification of the organization of the t-tubule system. We developed a plugin for the ImageJ/Fiji image analysis platform developed by the National Institutes of Health. This plugin (TTorg) analyzes raw confocal microscopy images. Analysis options include the whole image, specific regions of the image (cropping), and z-axis analysis of the same image. Batch analysis of a series of images with identical criteria is also one of the options. There is no need to either reorientate any specimen to the horizontal or to do a thresholding of the image to perform analysis. TTorg includes a synthetic “myocyte-like” image generator to test the plugin’s efficiency in the user’s own experimental conditions. This plugin was validated on synthetic images for different simulated cell characteristics and acquisition parameters. TTorg was able to detect significant differences between the organization of the t-tubule systems in experimental data of mouse ventricular myocytes isolated from wild-type and dystrophin-deficient mice. TTorg is freely distributed, and its source code is available. It provides a reliable, easy-to-use, automatic, and unbiased measurement of t-tubule organization in a wide variety of experimental conditions.

transverse tubules; ImageJ; automatic analysis; cardiac myocytes

THE TRANSVERSE axial tubular system is a complex network of invaginations of the plasma membrane in cardiac myocytes (CM). It is involved in excitation-contraction coupling, mediating the rapid and homogeneous calcium signal throughout the CM. Calcium channels, highly localized in t-tubules (TT), trigger calcium-induced calcium release beginning predominantly in dyads localized close to TT. In healthy ventricular myocytes, TT are well organized transversally along z-lines, thus forming a striation pattern throughout the CM. Any disorganization of the transverse-axial tubular system impairs the intracellular calcium movements, decreasing the calcium transient amplitude and speeding up its time course, thus leading to asynchronous and inhomogeneous calcium increases within the CM. These disorders impair contraction and may be responsible for some arrhythmias (11). Irregularity of TT has been described in atrial CM of several mammals (1) and occurs in a number of pathologies, including human heart failure (8, 10), atrial fibrillation (5), and chronic ischemia (3). Therefore, the measure of the TT organization level represents an

important issue for a better understanding of the physiopathology of these cardiac diseases.

To observe TT and their distribution in CM, fluorescent dyes such as di-8-ANEPPS or di-4-ANEPPS are used in living cells, and wheat germ agglutinin or antibodies against caveolin-3 in fixed tissues and cells. High spatial resolution images are recorded with confocal laser scanning or two-photon microscopy (4, 9).

To quantify TT organization, authors use fast Fourier transforms (FFT) of the cell image. The regularity of striations and TT within the cell results in the emergence of a peak in the FFT spectrum of the image. This incidence of the peak is used to determine the TT period, and its amplitude is considered as indication of a TT “organization index” (2, 10, 11). Algorithms have been developed to automate the analysis of TT organization (2, 5, 12). However, the absence of the source codes makes it difficult to understand exactly how the analysis is performed, and, to our knowledge, the analyses have not been validated on “synthetic” images with controlled features. Moreover, these analyses are performed with scripts in licensed languages such as Matlab or IDL, and require human intervention (such as cell rotation) and sometimes several other software.

Our objective was to develop an open-source plugin for ImageJ and Fiji [the freely available software developed by the National Institutes of Health (NIH)] for the automatic and unbiased analysis of most formats of raw confocal microscopy images of TT. This plugin should have an easy graphical user interface to configure analysis parameters and be able to work on Windows, Macintosh, and Linux operating systems. Finally, it should be validated with synthetic images corresponding to different experimental conditions and on real images of CM with different organization indexes. Here we describe TTorg, a plugin for automatic or semiautomatic two-dimensional analysis of the organization index of TT. This software allows the processing of any microscope image format (TIF, OIB, OIF, etc.) with the plugin Bio-Formats (6). TTorg is available in the plugin section of the ImageJ website.

Compared with existing plugins, the main strengths of TTorg lie in the possibility to analyze any image, irrespective of the orientation of the cell, making analysis quicker and easier, and the lack of human intervention during the process avoids any bias, particularly when thresholding or rotation of the image is required. Moreover, TTorg source code is available in the plugin folder for an exact understanding of how it works.

METHODS

TT Organization Analysis Algorithm

Algorithms to calculate the transverse organization level of a TT network are based on the calculation of the peak amplitude in the Fourier spectrum of the image at the TT frequency. The amplitude of this peak is called TT power and usually considered as the best

Address for reprint requests and other correspondence: C. Pasqualin, Laboratoire CNRS ERL 7368, STIM, Equipe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des Sciences, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France (e-mail: come.pasqualin@univ-tours.fr).

indicator of the transversal organization level in the transverse-axial tubular system (2, 10, 11). Figure 1 represents the flow diagram of the TTorg algorithm.

The “Preprocessing” phase consists of a 3×3 -pixel median filtering followed by a histogram normalization of the image to correct any difference in the labeling levels between images. Then the multiplication by a Hanning window minimizes the noise induced in the FFT spectrum by image edges. Finally, the “analysis” phase starts by performing the 2D FFT. Background noise of the spectrum is cleared with a high-pass filter before searching peaks. These procedures have been chosen to match the largest number of experimental conditions. Peak detection used the built-in peak detection function of ImageJ. A peak is detected when its amplitude is greater or equal to a specific value. This value is defined by the *Sensitivity and Specificity of Peak Detection* (SSPD) setting. An empiric value of 28 is recommended (see RESULTS). Peaks in the FFT spectrum are searched at the frequency interval specified by the user. If *Remove duplicate peaks* is unchecked in the option menu, peaks are identified in the real and the imaginary part of the FFT. The maximum amplitude of each peak is measured and reported in a table with its corresponding striation period and accuracy and angle relative to the horizontal. Finally, the original image multiplied by the Hanning window and the FFT spectrum with detected peaks are displayed.

Setup and Use

Setting up. Unzip the file TTorg.zip into the plugin folder of ImageJ. To load the menu, click on ImageJ > Plugins > TTorg > Striation Analysis Menu: a <<TT>> icon will appear in the main menu of ImageJ (Fig. 2A).

Menu’s main functions. The menu (Fig. 2) is divided into three sections as follows.

MODES OF ANALYSIS. The different modes of analysis are as follows. 1) *Analysis on the entire image:* performs an analysis on the entire open image(s) (Fig. 2B); 2) *Analysis on crop:* performs an analysis on selected parts of the image, such as a cell or a part of a cell; 3) *Batch mode:* performs an identical analysis to that “on entire image” but on all images contained in the specified folder; and 4) *Analysis on all slices:* performs an analysis like *Analysis on the entire image* but on all *z*-slices of a single image.

SELF-VALIDATION OF THE PLUGIN. Tools for self-validation of the plugin are as follows. 1) *Create Test Image:* creates a synthetic image with striation pattern of known features (Fig. 2D); 2) *Set Display Mode Color:* allows selection of the channel to analyze. Use this mode on composite image; and 3) *Analyze background noise level:* analyzes the selected part of background in the active image and displays mean, SD, and minimum and maximum pixel values.

GENERAL PARAMETERS FOR THE PLUGIN. General parameters for the plugin are as follows. 1) *Verbose (TT Options menu):* when checked, displays performed analysis operations in real time in a verbose window; 2) *Summarize (TT Options menu):* when checked, displays main information (image file name, measured power, period and accuracy, angle) from the analysis in a new window (Fig. 2C). This table can either be saved by “File > Save as” as a text or Excel file, or copied to the clipboard and pasted into another program for further analysis. *Summarize* is automatically activated in batch mode and the window’s content is saved as an .xls file in the working directory; and 3) *Select a working directory...:* choice of a working directory where all analysis output will be saved.

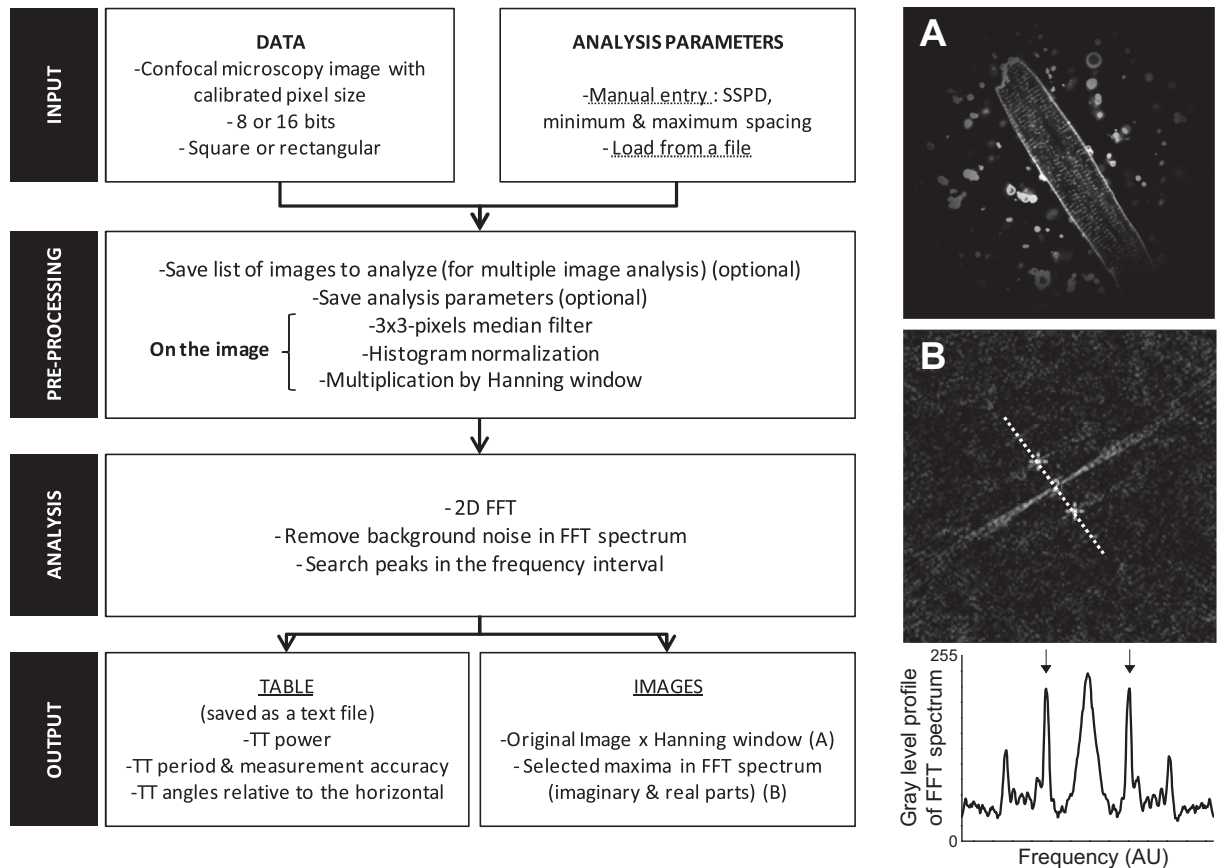


Fig. 1. Flow diagram of the TTorg algorithm. Analysis settings are selected via the graphical user interface. All other steps are automatically performed. A: an example of an original image multiplied by the Hanning window. B: 2D fast Fourier transform (FFT) spectrum of image A with its gray level profile; detected maxima are indicated by crosses on the 2D FFT spectrum and arrows on gray level profile.

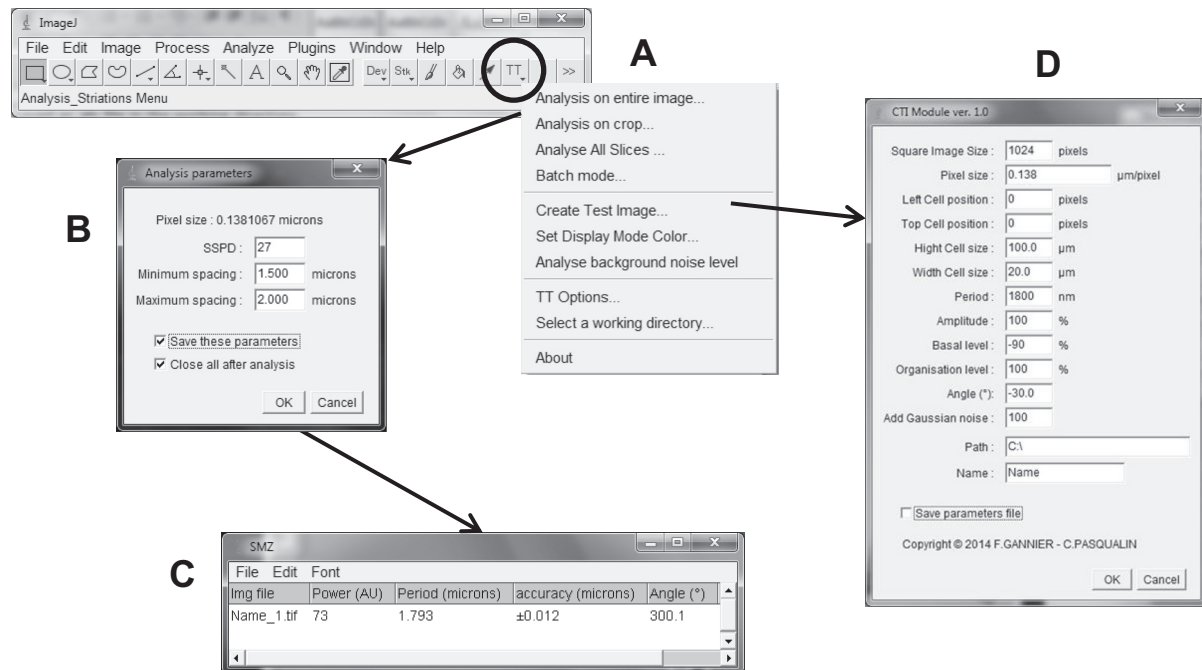


Fig. 2. Implementation of TTorg in ImageJ. *A*: after installation and loading from ImageJ plugin menu, TTorg main menu appears on clicking the “TT” icon in ImageJ toolset. *B*: graphical user interface for TT analysis on entire image. *C*: summary result window (output). *D*: dialog box to create synthetic image of cardiomyocyte (CM) with transverse tubule (TT).

Details of main functions. ANALYSIS ON THE ENTIRE IMAGE. The function *Analysis on the entire image* performs an analysis of all periodic image signals within the range defined by the user. The entire frame is analyzed without the need of selecting the cell. To set analysis parameters, either load a parameter file from the working directory or enter them manually in the dialog box (Fig. 2*B*).

If *Save parameters* is checked, these settings and pixel size are saved as a text file in the working directory and can be loaded for other analyses. When analyzing multiple images, select *Save list of images* to keep the list in the directory.

SSPD value sets the sensitivity and specificity of peak detection in the FFT spectrum. A low SSPD value increases sensitivity and decreases specificity; a high SSPD value will have the opposite effect. *Minimum and maximum spacing* of TT defines edges within the FFT spectrum where peak detection works. We recommend using a 200-nm margin around the supposed period value. Analysis is started by clicking the “OK” button.

The output consists of two images: the original image multiplied by the Hanning window (see algorithm description), and the FFT spectrum with detected maxima. The resulting log window: “image-name_log.txt” is an array containing peak amplitudes, their corresponding periods with accuracy of the measurement, and the angle of the sinusoidal signal relative to the horizontal. This file is automatically saved in the working directory.

ANALYSIS ON CROP. The use of this mode is required in some cases, e.g., when there are several CM in the image, if the CM is bent or when CM widths are significantly different between compared groups. It can also be used in particular cases. For example, if the organization level seems highly heterogeneous within the CM it is possible to repeat the analysis on different parts of the cell, and likewise, if the cell needs to be analyzed without its membrane. One disadvantage of this mode lies in the necessary rotation of the image that cancels the benefit of having no pixel interpolation.

Except for the image rotation, analyses on crop are performed like *Analysis on entire images*, but three additional settings appear in the dialog box: the crop width, height, and angular tolerance. The dialog box will automatically propose the best crop size for an optimal FFT analysis.

However, users are free to choose their own crop size. *Angular tolerance* corresponds to the maximum angular error with respect to the perpendicular of TT once the crop selection is done (see below).

The crop section needs a selection using either “Line tool” (default tool), or “Segmented Line tool” along its longitudinal axis, i.e., perpendicular to TT with a maximal angular error corresponding to *Angular tolerance*. If the CM is bent, it will automatically be straightened by TTorg (native function of ImageJ) along its longitudinal axis before analysis.

ANALYSIS OF ALL Z-SLICES. This mode is useful if the image contains several *z*-slices. Analysis is the same as *Analysis on entire image*, but it is done on all *z*-slices of the chosen channel of the opened image(s). It allows the user to test if one *z*-slice can be considered as representative of the whole cell. This mode is not available for “crop.”

BATCH MODE. This mode is optimized to work on many images in automatic mode. The images are opened and analyzed one at a time, thus limiting the use of the computer’s memory. Once the analysis is launched, no intervention from the operator is required.

To use it, select a folder containing all image files to be analyzed. All images are automatically opened, analyzed with the same parameters, and closed, and the output is saved in a file in the image folder. The mode proposes the same functions as *Analysis on entire image*, adding the option *Select analyzed slice* that allows selection of the slice to analyze on each image. This mode is not available for “crop.”

Results are automatically displayed into a summary window (SMZ, Fig. 2*C*), and its content is saved in the working directory.

ALGORITHM FOR IMAGE SYNTHESIS OF CELLS SHAPES WITH TT LIKE STRIATIONS. To test the efficiency and the limits of the analyzer, a module creating synthetic images has been implemented within this plugin. It allows the creation of “realistic” images of CM with transverse-axial tubular system either well organized or not. This mode can help with the validation of one’s own experimental conditions and illustrates the influence of different conditions on the measured parameters.

The 16-bit images of a simulated cell with TT pattern are obtained using a mathematical model based on a sinus wave (see APPENDIX). Size, striation interval, thickness of TT, spacing between TT, angle of

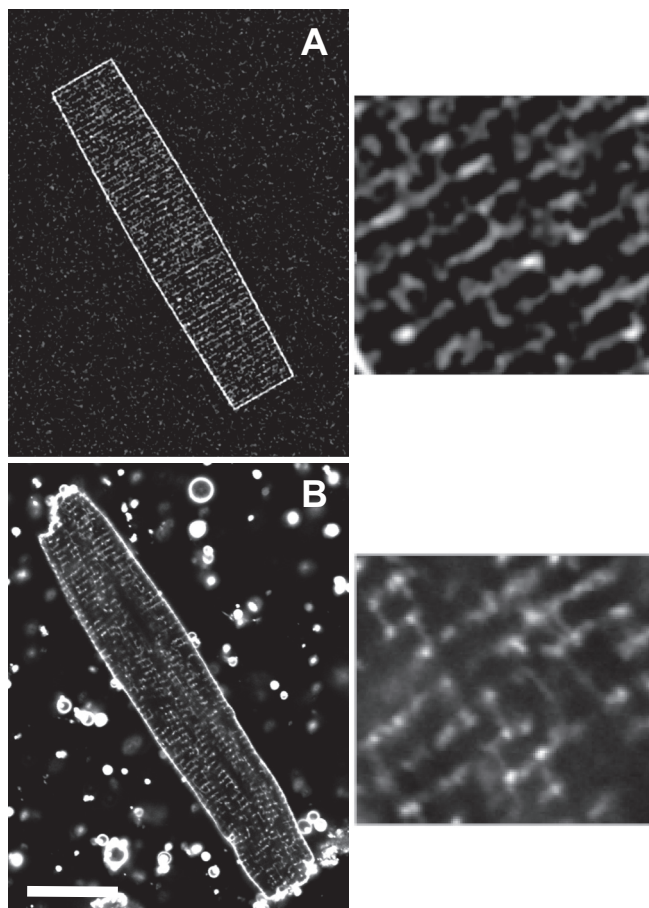


Fig. 3. Comparison of synthetic and real myocyte images. A: synthetic image from *Create_test_image* module. B: image of rat ventricular cardiac myocyte labeled with di-8 ANEPPS; white scale bar corresponds to 20 μm . Images of $\times 10$ magnification of their transverse-axial tubular system are shown at right.

the longitudinal axis of the cell, pixel size, and position of the cell within the image are user defined. The TT organization value (0–100) simulates different levels of TT organization within the CM. A value of 100 represents the best organization. The simulated cell is then inserted into a background consisting of Gaussian noise. Figure 3 illustrates a synthetic image of a CM with TT (Fig. 3A) and a real image of a rat ventricular myocyte (Fig. 3B).

Validation of TTorg

Generation of synthetic images of cell containing TT to validate analysis on images with fully controlled parameters. The following three analyses were performed in *Batch mode* with the following

parameters: SSPD = 28; Min spacing = 1.6 μm ; Max spacing = 2 μm .

DETERMINATION OF THE BEST VALUE FOR SSPD PARAMETER. First, the optimum value for SSPD parameter was determined. It allows performance of the analysis with the best sensitivity and specificity for peak detection in the FFT spectrum. At the peak search in the FFT spectrum, SSPD should allow the finding of TT power peaks of CM with the lowest TT organization, without detecting “false positive” peaks in other CM with higher organization levels.

Two groups of 10 images each, the first containing CM presenting a low organization value of 30, the second with a high organization value of 80, were created (*group 30* and *group 80*). For analysis of each group, different SSPD were tested. For each of them, specificity and sensitivity were measured. Sensitivity was defined by the number of detected peaks divided by the total number of peaks and specificity by the inverse of the number of false-positive peaks (FPP) found plus one, i.e., $1/(FPP + 1)$.

STRENGTH TEST OF THE ANALYSIS WITHIN SEVERAL SIMULATED EXPERIMENTAL CONDITIONS. Potential bias in the measurement of FFT spectrum peak amplitude of TT power and period due to modifications in the experimental conditions was then checked. For each tested parameter, several groups of cell images were created. All groups included CM with defined TT organization, and each tested group contained 10 images and presented common values (see Table 1) except for the tested parameter. The images were then embedded in the same Gaussian noise corresponding to a signal-to-noise ratio of 3. When modified, parameters were changed within a realistic range of values compared with our experimental confocal images results. These groups were compared with each other using an ANOVA test.

VALIDATION OF THE ABILITY OF TTORG TO DETECT DIFFERENCES BETWEEN TT ORGANIZATION INDEXES. To show TTorg’s ability to underline possible TT power differences, we analyzed four groups of 10 images presenting different organization levels. These images were generated with decreasing organization value from 80 to 20, all other parameters presenting common values (see Table 1).

Measurement of TT organization in WT and mdx cardiac myocytes to validate analysis on real confocal microscopy images. CM of *mdx* mice present membrane alterations due to dystrophin deficiency. Their TT organization is less regular than wild-type mice CM (C57 BL10 Scsn Mice). The original study of TT organization was performed with an IDL macro and highlights a difference within TT power between wild-type and *mdx* CM (7). To validate our algorithm on real images, 10 ventricular CM images of *mdx* and WT mice were analyzed. These images have been recorded with an Olympus FV1000 confocal microscope using a $\times 60$ 1.4-NA oil-immersion objective. TT were labeled with di-8 ANEPPS.

Statistics

Results are shown as means \pm SE. All statistics have been performed with R and SigmaStat. Differences are considered significant when the *P* value is inferior to 0.05. For the comparison between

Table 1. Tested image parameters for the simulation of different experimental conditions to control the efficiency of the TTorg measurements of TT power and period

Image Parameters	Common Values	Modified Values	P Value (ANOVA)	
			TT power	TT period
Cell size (length \times width), μm	100 \times 20	110 \times 20, 90 \times 20, 100 \times 25, 100 \times 15	0.023*	0.627
TT period, μm	1.8	1.750, 1.850	0.929	0.007†
Angle of the cell longitudinal axis, $^\circ$	324	10, 55, 100, 145, 190	0.228	0.005†
Position of the cell in the image	Center	High, low	0.957	0.085
Added Gaussian noise SD (gray levels)	0	10, 20, 50, 100	0.73	0.293

TT, transverse tubules. “Common Values” are the values of parameters that are common to all images groups. Each group corresponds to different experimental conditions, except for the tested parameter. The values of the latter for each group are listed as “Modified Values.” Two last columns show the *P* values of ANOVA tests on each image group of modified parameter. **P* < 0.05, †*P* < 0.01; *n* = 10 for each group; organization value = 80.

groups, either Student's *t*- or ANOVA tests were performed. Student-Newman-Keuls has been used as post hoc of ANOVA test. Pearson correlation tests have been used to check the potential existence of a linear correlation between two variables.

RESULTS

Context That Led to Development of a Novel Algorithm for the Measurement of TT Organization

TTorg was developed to overcome common biases encountered with previously described TT power measurement algorithms (2). Global thresholding distorts the power measurement over- or underestimating the TT area and the skeletonization of the thresholded image after background subtraction and local adaptive noise removal has been proposed to overcome this bias (2).

To examine the thresholding effect, a real TT network image has been set at two different brightness levels (Fig. 4A). Then, an automatic threshold has been applied to each image with the MaxEntropy thresholding function of ImageJ. These binary images were then skeletonized with the Skeletonize ImageJ function, and their two-dimensional FFT spectra have been calculated and compared. Even though the variability of the TT power measurement is reduced, we showed that the TT power

values remain dependent on the brightness of the image (Fig. 4A). Indeed, thresholding deletes some TT labeling in low-fluorescent areas and raises noise in high ones. It follows differences in image skeletons and resulting FFT spectrum and measured TT power. Moreover, the cell longitudinal axis needs to be parallel to the *x*-axis of the image. If not, the image should be rotated and if the rotation needed does not correspond strictly to a multiple of 90°, pixel interpolation is also required. To examine the effect of image rotation, two skeletons of TT networks were obtained from the same original image of a CM horizontally oriented and then 45° clockwise-rotated with a bilinear interpolation mode. Then the two-dimensional FFT spectrum of each skeleton were calculated and compared. As shown in Fig. 4B, this interpolation modifies the FFT spectrum, and therefore biases the TT power measurement. TTorg was developed to be, to our knowledge, the first software to overcome such biases by providing an analysis without thresholding, whatever the orientation of the cell.

Validation on Synthetic Images Representing CM and TT System

SSPD value determination. Comparison of the TT low-organization group (*group 30*) with the TT high-organization

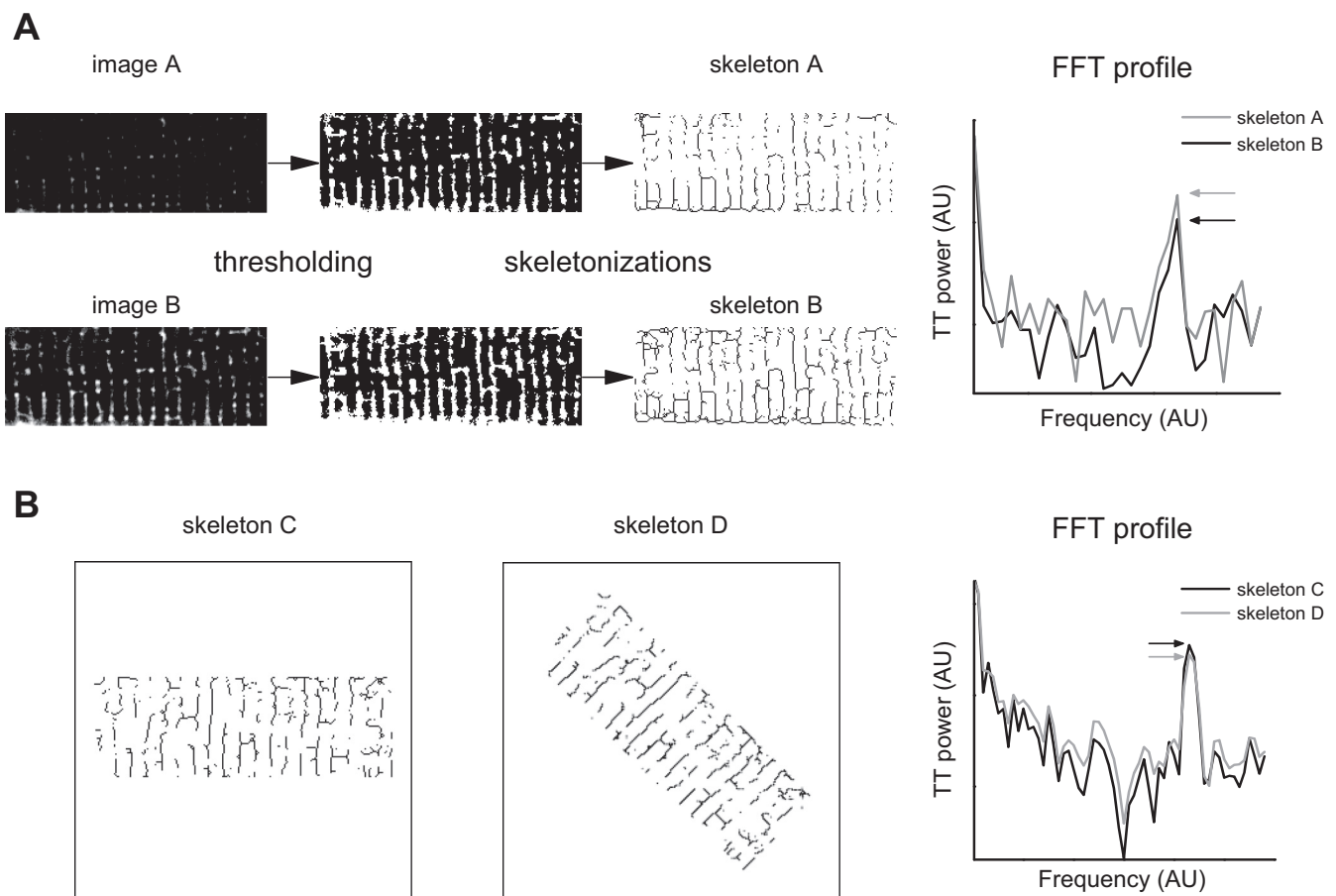


Fig. 4. *A*: images *A* and *B* were obtained from the same myocyte with 2 different brightness levels. An automatic threshold was applied to both images before the skeletonization. Skeletons of images *A* and *B* are shown at *right* with their corresponding FFT spectrum profiles. *B*: skeletons *C* and *D* were derived from the same original image. Skeleton *C* was obtained from the raw image, and skeleton *D* was obtained from the 45° clockwise-rotated image. Their FFT spectrum profiles are shown at *right*. Arrows in FFT spectrums indicate the peaks used to determine the TT organization level or TT power.

group (*group 80*) showed, in each group, the existence of a SSPD range corresponding to a sensitivity and specificity of 100% (Fig. 5). These ranges correspond to values of SSPD from 26 to 40 for *group 30* and 28 to 52 for *group 80*. The intersection of these ranges gave an optimal interval of SSPD between 28 and 40.

Thus, for the following analyses, a SSPD value of 28 corresponding to the smallest value of this interval has been used.

Specific effect of the background noise SD on the TT power and accuracy of striation interval measurement. The shape of TT in synthetic images is dependent on a random process, leading to a small variation in the measured TT power despite an identical organization value. This variation enables the reproduction of realistic experimental results, thus allowing the comparison of different groups of images. On 10 analyzed images, all presenting the same common values (see Table 1), the mean TT power measured was 79 ± 1.5 AU (see APPENDIX), and the period was $1.798 \pm \sim 0$ μm . These measured power and period values were then compared with those measured in the other groups of images, presenting one modified parameter.

Validation on synthetic images of CM recorded within different simulated experimental conditions. CM images realized with a confocal microscope are not all perfectly graded with the same size cells placed exactly at the center of the image, and absolutely horizontal. Moreover, the background noise may vary from one record to another. To overcome the consequences of these variations in the experimental conditions, we tested the influence of the parameters listed in Table 1 on TT power and period measures as reported in Fig. 6.

For TT power (Fig. 6, *Aa–Ea*), no significant differences were observed when these parameters were changed, except for CM width (Fig. 6*Da*). TT power is significantly greater when CM width is set at 25 μm instead of 15 μm . Hence, we

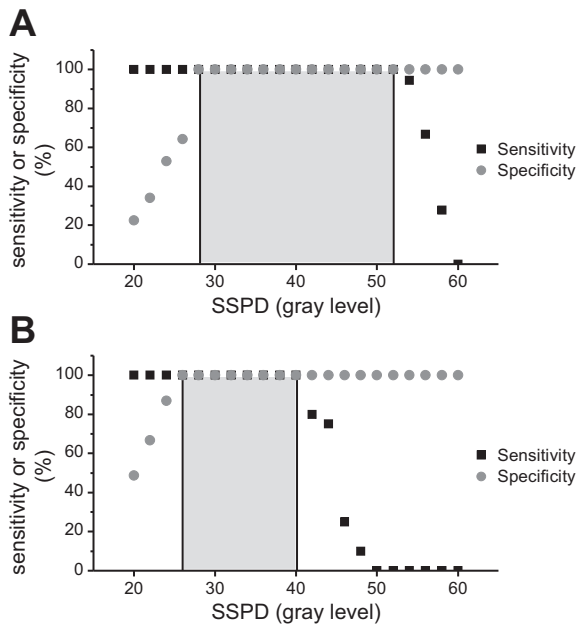


Fig. 5. Sensitivity and specificity of TTorg analysis for different values of the *Sensitivity and Specificity of Peak Detection* (SSPD) parameter. *A*: analysis of TT with high organization value (*group 80*). *B*: analysis of TT with low organization value (*group 30*); $n = 10$ in each group. Vertical bars delimit best SSPD range for each group.

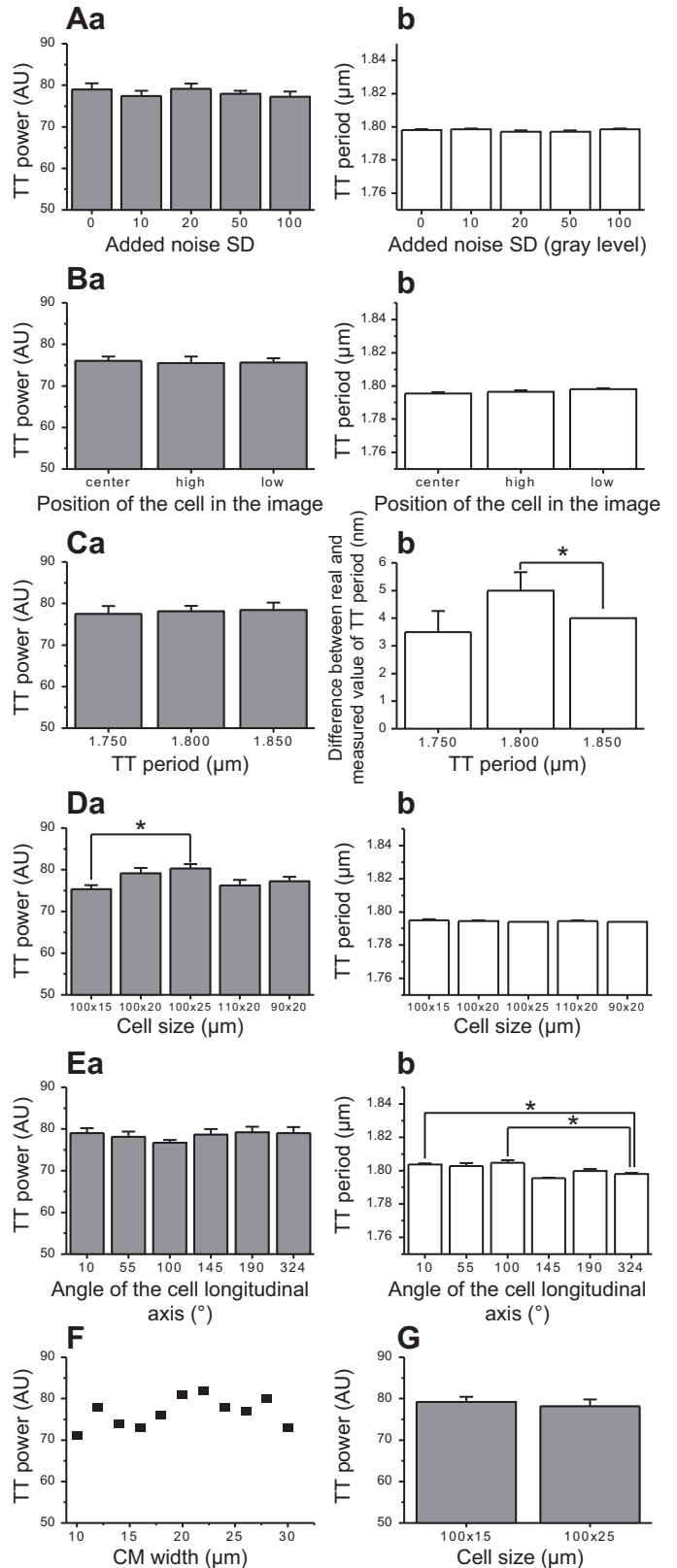


Fig. 6. *Aa–Ea*: results of TT power (gray bars) analysis in batch mode for different values of a modified image parameter (x -axis). *Ab–Eb*: results of TT period (open bars) analysis in the same conditions as TT power analysis. *F*: measured TT power for increasing values of cell width. *G*: TT power analysis on *crop* for cell widths of 15 and 25 μm . $*P < 0.05$. Characteristics of synthetic CM are common values (see Table 1) except for the studied parameter.

tested the correlation between CM width and TT power. Widths from 10 to 30 μm were tested, and no correlation was highlighted ($P = 0.275$) (Fig. 6F). Then, *analyses on crop* were performed on 25- and 15- μm -width CM groups with a crop width of 15 μm , corresponding to the narrowest CM, and a crop length of 70.6 μm , corresponding to the recommended value for an optimal analysis, smaller than CM lengths. This time, no significant differences were found ($P = 0.627$) (Fig. 6G). Therefore, if CM width between two compared groups is significantly different, *analysis on crop* mode is recommended.

Some significant differences were found between groups for a given TT period value (Fig. 6, *Cb* and *Eb*, and Table 1). However, they represent $<10\%$ of the pixel size (FFT analysis allows such a resolution), thus being considered as negligible.

Ability to detect differences between various organization levels. Having shown that TTorg does not detect significant TT power differences when there are no actual differences, we created synthetic images of CM differing only by the level of TT organization (20, 40, 60, 80) to analyze TTorg's response (Fig. 7A).

As expected, for the four different organization levels tested, TTorg detected significant differences between all groups ($P < 0.001$; Fig. 7B). Moreover, no significant differences have been found within measured TT periods ($P = 0.242$; Fig. 7C).

We showed that TTorg is able to highlight TT power differences when they actually exist, without impairing the measure of the period.

Validation on Real Images of *mdx* and WT Mice Cardiac Myocytes

To test its practicability on original experimental data, we worked on images of isolated mice CM, with labeled TT. The analysis was realized on two CM populations, the first presenting a well-organized TT network (WT mice), and the other a low-organization level of TT network due to dystrophin deficiency (*mdx* mice).

The analysis of TT power of *mdx* and WT mice CM with TTorg (Fig. 8) showed that WT mice have a better TT organization index (74.1 ± 1.6 AU) than *mdx* mice (64.6 ± 2.6 AU) ($P < 0.01$) in agreement with the results of Lorin et al. (7).

DISCUSSION

Interest in the study of TT is growing because of their implication in pathologies such as atrial fibrillation, heart failure, and arrhythmias. To efficiently and objectively analyze the regularity of TT networks, i.e., to give an indication of their organization, a parameter preferably measured without any subjective intervention of the operator on the image is needed. Diverse data-processing tools have been developed to analyze TT networks, but only one Matlab program has been published so far (2).

The TTorg plugin we developed presents several advantages. It is written for ImageJ/Fiji, the free and open-source NIH software for analysis of microscope images. Thanks to its interface, and also to the plugin Bio-formats, TTorg can analyze most microscope image formats without one having to manually enter image-acquisition settings. TTorg is user friendly, enabling a steady and completely automated analysis of images without any human intervention after selection of the analysis parameters, thus overcoming any subjective bias.

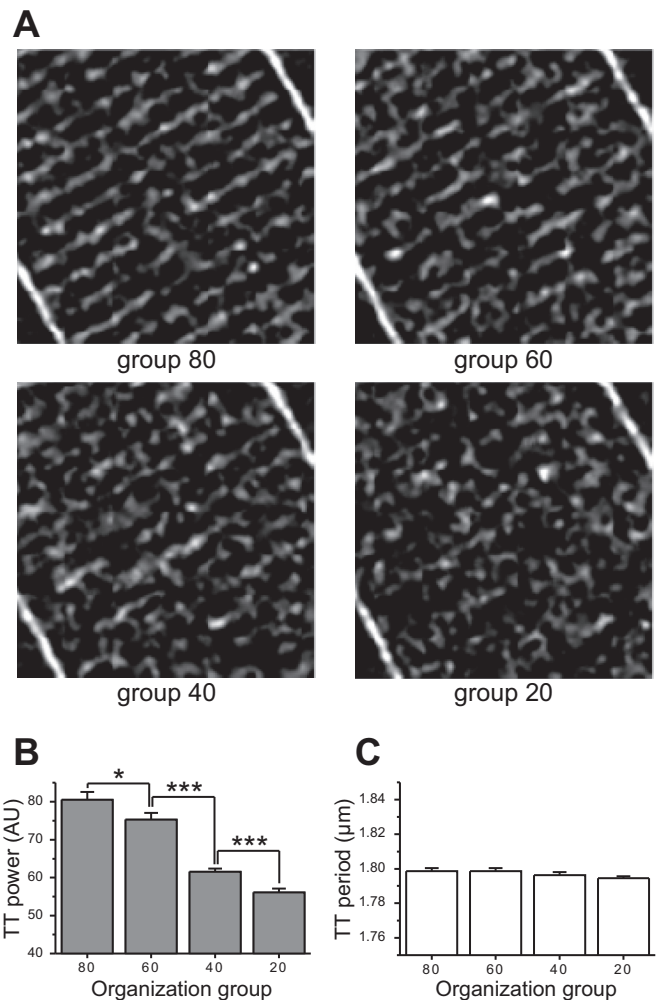


Fig. 7. Image samples of each synthetic CM group with different levels of TT organization submitted to TTorg analysis (A), and analysis results of each group of CM images for TT power (B) and TT period (C). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

During our validation test, we observed that image rotation frequently induces the apparition of spurious frequencies in the signal due to the pixel interpolation, which twists the TT power measure. Therefore we designed TTorg to analyze a cell whatever its orientation in the image, avoiding rotation and pixel interpolation bias. Moreover, TTorg runs without performing a thresholding of the image for the analysis. This allows the exploitation of all of the information contained within the image without deleting any data which could be particularly useful in cases of heterogeneous labeling or photobleaching.

The module for the creation of synthetic images of CM with (dis)organized TT networks that we integrated to the plugin allows the testing of its validity in users' own experimental conditions. With this tool, we showed that measures of TT power and TT period were not affected by either the cell position within the image, its angle, the presence of noise, or the interval between TT. However, we observed that the cell width could impact the TT power measure. Even though there is no evidence of a link between cell width and TT power, it is recommended to use *Analysis on crop* when the widths of CM

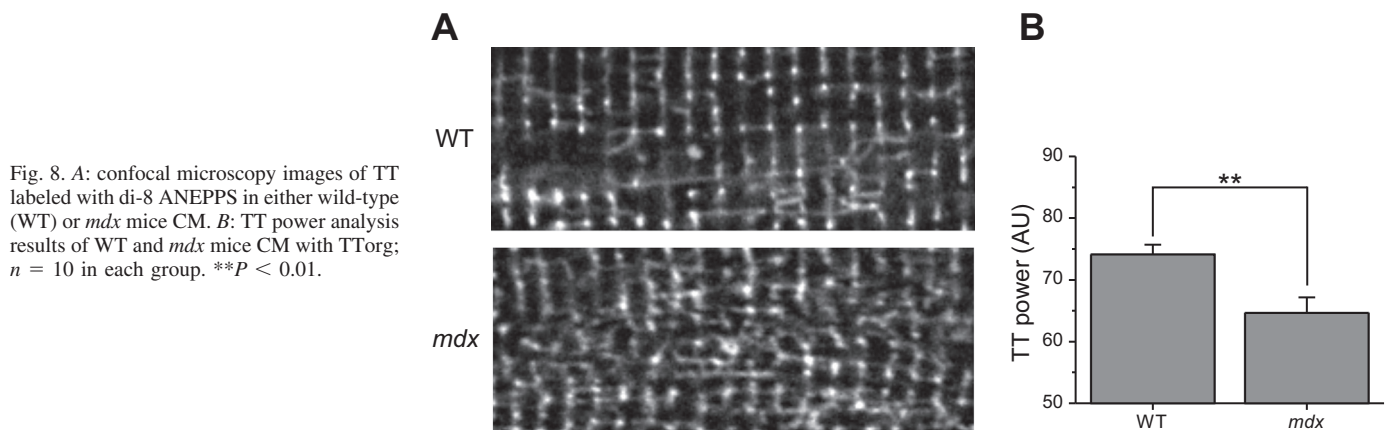


Fig. 8. A: confocal microscopy images of TT labeled with di-8 ANEPPS in either wild-type (WT) or *mdx* mice CM. B: TT power analysis results of WT and *mdx* mice CM with TTorg; $n = 10$ in each group. $**P < 0.01$.

of compared groups are significantly different: the crop width then needs to be that of the width of the narrowest cell. This analysis, despite limiting to the crop of the image, enables one to overcome any problem with CM size variations. Regarding the measure of a TT period, it was extremely precise and accurate for all tested experimental conditions, with a resolution of 10 nm for a pixel size of 138 nm. The accuracy of the measure is indicated for each analysis, allowing the user to frame the real value.

The practicability of TTorg was tested with experimental data obtained with a preparation of dystrophin-deficient and WT mice ventricular myocytes, the first being known to have a disorganized TT network compared with the second (7). As expected, significant differences were highlighted between these two groups of mice CM, demonstrating the efficiency of TTorg on real experimental data. However, to minimize the sources of variation and reinforce the analysis efficiency, it is recommended to work with the same acquisition parameters, material, and tonal resolution.

Finally, TTorg also proposes other useful options, such as automatic analysis of all z -slices of an image, analysis on crop to enable the analysis of a single cell within a tissue slice, or analysis of bent cells, frequent in the rodent atrial CM.

Conclusions

TTorg showed its efficiency and steadiness in the measurement of TT organization and period, with an accurate and adaptable validation method. It provides an easy graphical user interface to configure analysis parameters and output results. This open source plugin runs with ImageJ and Fiji and can be used with any Windows, Macintosh, or Linux operating system. It is freely available, and the source code is apparent. It is easy to use, and versatile, and thus could be used to standardize the measurement of TT organization index and period. Moreover, this plugin is adapted for other measurements such as the space between sarcomeres, for example, to characterize the cell's contracture level, or any other ultrastructure distribution with a striation pattern such as ryanodine receptors or calcium channels.

APPENDIX

Arbitrary Unit

"Power" values are log-scaled depending of the minimum and maximum of the energetic spectral density (EDS). EDS values could

be obtained directly from raw spectrum in ImageJ. Units are given in $[\text{intensity}^2/\mu\text{m}^2]$ where Intensity is the brightness of each pixel on a gray scale (for 16-bit images, each pixel is coded on 65,536 gray levels). This removes any significant variation in brightness or background illumination from one image to another and allows the comparison of images with brightness coded on 8, 16, or 32 bit. Power is given by the following equation: "power" = $1 + \{[\log(R) - \log(Mn)] \times \text{Raw_Scale}\}$, where R = values from EDS; $\log(Mn)$ = $\log(\text{Min of raw spectrum})$; $\log(Mx)$ = $\log(\text{Max of raw spectrum})$; $\text{Raw_Scale} = 253.999/(\log(Mx) - \log(Mn))$, and $(\log(Mx) - \log(Mn))$ should not be lower than 50, or otherwise the difference is set to 50.

Creation of Synthetic Cell With Transverse Tubule System

The algorithm to create synthetic cells is defined to obtain a realistic image of the TT system from a cardiomyocyte. It is based on the regularity of the TT system along the z -line (forming dyads), which we can reproduce by a sinusoidal function of the length $Y(l) = B + A \cdot \sin(2\pi \cdot f \cdot l)$, where l = length, B = basal level added to the sinus function, A = amplitude = peak deviation from zero, and f = ordinary frequency, i.e., number of oscillations per unit of length.

Basal level and amplitude values modulate the sinus wave to obtain lines with the desired thickness. Basal level can be a negative value. To reproduce different levels of organization of the TT, we apply to the sinus wave signal an algorithm of randomization based on the "organization level" value (in percent). For a value of 100%, the sinus wave signal is not changed. Depending on the "organization level" value, a variable percentage of pixels will have their value reversed or substituted by a randomly defined Gaussian noise value. The presence of this sinus wave signal is restricted to the dimension and the position selected for the cell. $Y(l)$ is then encoded on a scale of 65,536 values to create a 16-bit image. After that, the resulting image is rotated if needed, and a random Gaussian noise background is applied.

Then a median filter followed by a mean filter is applied. Finally, the value of the SD of the background noise is subtracted from all pixels.

ACKNOWLEDGMENTS

Images of mice CM have been kindly provided by Dr. C. Lorin and Dr. S. Sebille (Laboratory STIM, CNRS ERL 7368, University of Poitiers, France). The authors thank Dr. Anne Cantereau (University of Poitiers) and the ImageUP microscopy platform of the University of Poitiers.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: C.P., F.G., P.B., and V.M. conception and design of research; C.P. performed experiments; C.P. analyzed data; C.P. and F.G. interpreted results of experiments; C.P. prepared figures; C.P. drafted manu-

script; C.P., F.G., C.O.M., P.B., and V.M. edited and revised manuscript; C.P., F.G., C.O.M., P.B., and V.M. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Frisk M, Koivumaki J, Norseng PA, Maleckar MM, Sejersted OM, Louch WE. Variable t-tubule organization and Ca^{2+} homeostasis across the atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307: H609–H620, 2014.
2. Guo A, Song LS. AutoTT: automated detection and analysis of t-tubule architecture in cardiomyocytes. *Biophys J* 106: 2729–2736, 2014.
3. Heinzel FR, Bito V, Biesmans L, Wu M, Detre E, Wegner von F, Claus P, Dymarkowski S, Maes F, Bogaert J, Rademakers F, D'hooge J, Sipido K. Remodeling of t-tubules and reduced synchrony of Ca^{2+} release in myocytes from chronically ischemic myocardium. *Circ Res* 102: 338–346, 2008.
4. Jayasinghe ID, Cannell MB, Soeller C. Organization of ryanodine receptors, transverse tubules, and sodium-calcium exchanger in rat myocytes. *Biophys J* 97: 2664–2673, 2009.
5. Lenaerts I, Bito V, Heinzel FR, Driesen RB, Holemans P, D'hooge J, Heidebüchel H, Sipido KR, Willems R. Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca^{2+} influx and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ Res* 105: 876–885, 2009.
6. Linkert M, Rueden CT, Allan C, Burel JM, Moore W, Patterson A, Loranger B, Moore J, Neves C, Macdonald D, Tarkowska A, Sticco C, Hill E, Rossner M, Eliceiri KW, Swedlow JR. Metadata matters: access to image data in the real world. *J Cell Biol* 189: 777–782, 2010.
7. Lorin C, Gueffier M, Bois P, Faivre JF, Cognard C, Sebille S. Ultrastructural and functional alterations of EC coupling elements in *mdx* cardiomyocytes: an analysis from membrane surface to depth. *Cell Biochem Biophys* 66: 723–736, 2013.
8. Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 6854–6859, 2009.
9. Richards MA, Clarke JD, Saravanan P, Voigt N, Dobrev D, Eisner DA, Trafford AW, Dibb KM. Transverse tubules are a common feature in large mammalian atrial myocytes including human. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1996–H2005, 2011.
10. Shah SJ, Aistrup GL, Gupta DK, O'Toole MJ, Nahhas AF, Schuster D, Chirayil N, Bassi N, Ramakrishna S, Beussink L, Misener S, Kane B, Wang D, Randolph B, Ito A, Wu M, Akintilo L, Mongkolrattanothai T, Reddy M, Kumar M, Arora R, Ng J, Wasserstrom JA. Ultrastructural and cellular basis for the development of abnormal myocardial mechanics during the transition from hypertension to heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H88–H100, 2014.
11. Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4305–4310, 2006.
12. Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie YP, Zimmerman K, Weiss RM, Anderson ME, Cheng H, Song LS. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res* 107: 520–531, 2010.



3. Conclusion

a. Fonctionnalités

TTorg permet d'analyser des images de cardiomyocytes dont les tubules ont été marqués par une sonde fluorescente, telle que le Di-8-ANEPPS, si les images ont été acquises en microscopie confocale. L'identification et la quantification de la régularité des tubules transverses sont basées sur une analyse par la transformée de Fourier rapide bidimensionnelle de l'image. Dans le spectre de Fourier, le pic correspondant à la fréquence des tubules est identifié s'il dépasse un seuil défini par l'utilisateur ; il est ensuite mesuré. Son amplitude est d'autant plus importante que l'organisation transverse des tubules est régulière. TTorg présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes classiques et basées sur une FFT monodimensionnelle. Il permet notamment d'éviter :

- la perturbation de la mesure provoquée par la rotation de l'image et l'interpolation des pixels lorsque le cardiomyocyte n'a pas une orientation parfaitement horizontale ;
- l'intervention humaine pendant l'analyse, ce qui prévient certains biais classiques de l'analyse d'images, tels que ceux de seuillage ou de sélection.

b. Efficacité et fiabilité

L'efficacité et la fiabilité de TTorg ont été validées par des analyses réalisées sur des images de synthèse de cardiomyocytes dont les caractéristiques du réseau de tubule ont été définies, ainsi que sur de véritables cardiomyocytes de souris. L'organisation des tubules transverses des cardiomyocytes des souris de phénotype sauvage a été comparée à celle des cardiomyocytes des souris *mdx* qui sont connus pour avoir des tubules désorganisés.

c. Module de synthèse d'image de réseaux de tubules

Ce plug-in comporte également un module permettant de réaliser des images de synthèse de cardiomyocyte dont la membrane plasmique et les tubules sont marqués. Les caractéristiques des images et du cardiomyocyte virtuel peuvent être définies par l'opérateur. Ceci permet aux utilisateurs de tester ce programme dans leurs propres conditions expérimentales avant de réaliser l'acquisition des images.

d. Multiplateforme et Open source

TTorg a été développé en JAVA et ImageJ Macro Language et fonctionne sur les systèmes d'exploitation Windows, MacOS et Linux. En outre, compte tenu de l'intérêt porté par la communauté scientifique pour l'étude des tubules transverses, nous avons décidé de laisser libre l'accès à cet outil et de faciliter son utilisation en développant une interface graphique simple et claire. TTorg est disponible sur le site institutionnel du laboratoire PCCV : <http://pccv.univ-tours.fr/ImageJ/TTorg/> et sur le domaine du NIH rubrique ImageJ>plugins.

B. Structure du réseau de tubules transverses et conséquences sur la forme du transitoire calcique dans les CM de VP

1. Introduction et objectifs

La proximité spatiale des $Ca_v1.2$ et des RyR2 est un élément clé dans le CICR, car il détermine la forme et de l'amplitude du transitoire calcique (voir partie «

Optimisation du CICR par le réseau de tubules transverses » page 31). Plus les RyR2 et les $Ca_v1.2$ sont proches, plus le CICR est optimisé et efficace.

Dans les cardiomyocytes ventriculaires, les RyR2 sont regroupés en agrégats, qui sont présents de manière homogène dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, laquelle est répartie dans tout le volume du cardiomyocyte. Les $Ca_v1.2$ se trouvent à proximité immédiate des RyR2 grâce aux invaginations membranaires du réseau de tubules transverses qui permettent une étroite proximité entre la membrane plasmique et la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ainsi, le transitoire calcique initié par l'activation des $Ca_v1.2$ est homogène et synchrone dans tout le volume du cardiomyocyte.

Dans les cardiomyocytes auriculaires, les RyR2 sont répartis de manière similaire aux cardiomyocytes ventriculaires, mais les $Ca_v1.2$ sont localisés presque uniquement en périphérie de la cellule du fait de la quasi-absence de réseau de tubules transverses. Dans ce type de cardiomyocyte, l'augmentation du calcium cytoplasmique pendant le transitoire calcique ne survient généralement qu'en périphérie de la cellule, c'est-à-dire là où sont colocalisés les $Ca_v1.2$ et les RyR2.

L'objectif de ce premier travail consistait à déterminer dans les cardiomyocytes de veine pulmonaire : l'architecture membranaire, et l'organisation des $Ca_v1.2$ et des RyR2 ainsi que la conséquence de cette organisation sur les caractéristiques spatio-temporelles du transitoire calcique.

2. Résultats

Ce travail est en révision pour publication dans le journal « *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* » ; manuscrit numéro : JMCC10164.

Heterogeneity of the tubular network organization has functional consequences on calcium transient in rat pulmonary vein cardiomyocytes.

C. Pasqualin¹, A. Yu¹, C.O. Malécot¹, F. Gannier¹, C. Cognard², D. Godin-Ribuot³, J. Morand³, P. Bredeloux¹, V. Maupoil¹

¹CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Equipe Transferts Ioniques et Rythmicité Cardiaque, Groupe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Tours, France.

²CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Equipe Transferts Ioniques et Rythmicité Cardiaque, Poitiers, France.

³Laboratoire Hypoxie PhysioPathologie, INSERM U1042, Grenoble, France.

Corresponding author:

Côme Pasqualin
Laboratoire CNRS ERL 7368, STIM
Equipe TIRC
Groupe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires,
UFR Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas
31, avenue Monge
37200 - Tours, France
Phone: +33 2 47 36 73 35
Email : come.pasqualin@univ-tours.fr

Other authors e-mail addresses:

angele.yu@univ-tours.fr
claire.malecot@univ-tours.fr
francois.gannier@univ-tours.fr
christian.cognard@univ-poitiers.fr
diane.ribuot@ujf-grenoble.fr
jessica.k.morand@gmail.com
pierre.bredeloux@univ-tours.fr
veronique.maupoil@univ-tours.fr

Running title:

T-tubule heterogeneity in pulmonary myocardial sleeves

Abstract

Mechanisms underlying the ectopic electrical activity in the pulmonary vein (PV) cardiomyocytes (CM) which triggers paroxysmal atrial fibrillation are unknown. Although several studies have suggested that calcium signaling might be involved in these arrhythmias, little is known about calcium cycling in these cells. In CM, the shape of the calcium transient is highly dependent on the organization of the membranous transverse tubular (TT) system involved in the dyadic junctions between the L-type calcium channels ($Ca_v1.2$) and the type 2 ryanodine receptors (RyR2) of the sarcoplasmic reticulum. Thus, the TT system of rat PV CM and its functional consequences on the shape of the calcium transient, as well as calcium waves frequency, were investigated with confocal microscopy and compared with those of atrial and ventricular CM. In PV, there is a large heterogeneity of CM types in terms of TT networks, going from their virtual absence, as described in atrial CM, to well transversally organized tubular systems, like in ventricular CM. This variability is associated with a great heterogeneity of $Ca_v1.2$ channels localization and therefore of $Ca_v1.2$ -RyR2 coupling responsible for the multiple PV calcium transient spatiotemporal shapes. Moreover, calcium waves frequency was greater in PV CM than in LA CM, but similar to LV CM. Finally, these different types of CM are not randomly spread in PV myocardial sleeves, but gathered in interconnected islets throughout the tissue. In conclusion, these data show that PV are very heterogeneous in terms of CM membranous system, calcium dynamic and cellular distribution of the different CM types within the tissue. Such structural and functional heterogeneities might be responsible for the non-uniformity of contraction and might contribute to the anisotropy of conduction in the PV myocardial sleeves facilitating the initiation of arrhythmias triggering atrial fibrillation.

Keywords: Pulmonary vein; cardiomyocyte; transverse tubules; calcium.

Abbreviations: $Ca_v1.2$: Type 1.2 voltage operated calcium channels; CM: Cardiomyocyte; LA: Left atria; LAA: Left atrial appendage; LV: Left ventricle; PV: Pulmonary vein; RyR2: Type 2 ryanodine receptors; SR: Sarcoplasmic reticulum; TT: Transverse tubule; WGA: Wheat germ agglutinin.

1. Introduction

Ectopic electrical activity originating from the pulmonary veins (PV) myocardial sleeves has been found to trigger and maintain paroxysmal atrial fibrillation in humans [1]. Although triggered activity, re-entry mechanisms and abnormal automaticity have been proposed, the exact mechanism initiating the rapid electrical firing of PV foci that propagate to the atria remains unknown [2–5]. Nevertheless, several observations [5–8] have suggested that the calcium cycle of PV cardiomyocytes (CM) may be involved in the generation of abnormal electric signals which could trigger supraventricular arrhythmias. Moreover, in a model of catecholaminergic automatic activity in PV, repetitive bursts of slow type action potentials occur at \sim -50 mV and are not entirely suppressed by the full block of $\text{Na}_v1.5$ channels, indicating their calcium dependence [9,10].

In the heart, calcium entering the cell through voltage-activated L-type calcium channels ($\text{Ca}_v1.2$) localized on the sarcolemmal membrane and transverse tubules (TT) binds to and activates type 2 ryanodine receptors (RyR2) which release the calcium stored in the sarcoplasmic reticulum (SR). This process known as calcium-induced calcium release provokes an increase in intracellular calcium concentration called calcium transient. In ventricular CM, calcium channels localized on the well-developed and organized TT network are distributed throughout the entire cell and close to RyR2, thus provoking a homogeneous calcium release. In atrial myocytes, where the TT network is poorly developed and not transversally organized, calcium channels are mainly situated on the sarcolemmal membrane. Calcium entering the cell has to diffuse to reach the RyR2 and thus provokes a non-homogeneous calcium release [11]. Therefore, the spatial organization of $\text{Ca}_v1.2$ and RyR2 has a major impact on the spatiotemporal shape of calcium transients, which play a significant role in the cellular contractile properties and likely in arrhythmogenicity [11,12].

A better understanding of calcium dynamic in PV CM could open new ways to identify the sources of calcium-induced arrhythmias in atrial fibrillation. Therefore, the aim of this study was to explore the TT system of rat PV CM which has never been studied either at cellular or at tissue levels. Since we show heterogeneity at both levels in PV CM, comparison with left atria (LA) and left ventricle (LV) was performed to determine differences which might explain the role of PV CM in the triggering of paroxysmal atrial fibrillation. $\text{Ca}_v1.2$ and RyR2 localizations were also examined together with their functional impact on calcium transients and spontaneous calcium release.

2. Materials and methods

2.1. Cardiomyocyte isolation

All experiments involving animals were approved by the local institutional ethical committee (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire). LV, PV and LA cardiac myocytes were enzymatically isolated from 3-4 months old male Wistar rats as previously described [10]. Briefly, the heart and lungs were removed as one block from the anesthetized and heparinized rats and dissected in a cold (4°C) cardioplegic solution bath (in mM: 110 NaCl, 16 KCl, 1.20 CaCl₂, 16 MgCl₂, 10 NaHCO₃ and 10 glucose). PV and LA were chopped in small pieces and incubated at 37°C with 0.6 U/mL liberase™ Research grade (Roche Diagnostics) and 1 U/mL protease type XXIV (Sigma-Aldrich) in KRB solution (in mM: 35 NaCl, 4.75 KCl, 1.19 KH₂PO₄, 16 Na₂HPO₄, 25 NaHCO₃, 134 sucrose, 10 HEPES and 10 glucose, pH adjusted to 7.4) under 95% O₂ and 5% CO₂ until cells detachment. After enzymatic digestion, tissues were stored at room temperature in Tyrode's solution (in mM: 140 NaCl, 5.37 KCl, 1.36 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 NaH₂PO₄, 10 HEPES and 11 glucose, pH adjusted to 7.4) until use. For LV CM isolation, a similar protocol was performed using a Langendorff system with 0.1 U/mL liberase™ and 0.15 U/mL protease type XXIV in KRB solution until white areas appeared. The ventricles were then separated, cut up and stored at room temperature in Tyrode's solution until use.

2.2. Living cells confocal observations

Fluo-4 AM and di-8-ANEPPS (Molecular Probes) double-labeled cells were used to record calcium transients and TT staining. Cardiomyocytes were chosen based on their appearance in transmission microscopy to avoid bias: only myocytes with clearly visible sarcomeres and refractive membrane were used. To record calcium transients, CM were scanned with confocal microscopy (Olympus FV1000) at 500 Hz along a line perpendicular to their longitudinal axis avoiding the nuclear area. Fluo-4 and di-8-ANEPPS dyes were both excited at 488 nm and fluorescence intensities were collected between 505 nm and 525 nm and beyond 660 nm, respectively. During the acquisition, CM were electrically field stimulated with square pulses (1 Hz, 2ms) and superfused at 32°C with Tyrode's solution.

To record 2D calcium transients (XYT), the same experimental conditions were used except that the confocal microscope was a Dynascope Zeiss LSM710 NLO. Each video of calcium transients was acquired with a frame rate ≥ 270 Hz.

For calcium waves experiments, isolated myocytes were loaded with Fluo-4 AM and observed through an inverted microscope (Nikon Diaphot 300; excitation at 480 ± 15 nm, emission at 555 ± 15 nm). They were electrically field stimulated at 1 Hz under Tyrode's solution perfusion at 32°C. Following the procedure of Curran *et al.* [13], calcium fluorescence was continuously recorded, first at steady state for at least 20s and then during the 90s of rest period. Spontaneous activity was defined as a peak signal greater than two standard deviations above the average signal for the preceding 50 ms.

2.3. Isolated cells immunofluorescence

Isolated CM were plated on 35 mm bottom glass Petri dishes coated with rat tail collagen, fixed for 1h with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton X100 for 1h at room temperature. Saturation with 4% BSA for 40 min was followed by double-labeling with primary antibodies against RyR2 (mouse monoclonal, Pierce) and Ca_v1.2 (rabbit polyclonal, Calbiochem) overnight at 4°C. Secondary antibodies (chicken anti-mouse AF488 and donkey anti-rabbit AF555, Molecular Probes) were applied for 1h at room temperature. Immunostained cells were mounted using Mowiol 4-88 mounting medium (Sigma-Aldrich). Alexa Fluor dyes were excited at 488 and 543 nm and their fluorescence sequentially acquired with confocal microscopy (Olympus FV1000) at 500 ± 15 nm and 555 ± 50 nm, respectively. Autofluorescence and staining specificity has been controlled for each preparation.

2.4. Tissue immunofluorescence

Freshly dissected PV and LA roof were opened and fixed in 4% paraformaldehyde for 1h at room temperature. After 7 days incubation at 4°C with fluorescein conjugated wheat germ agglutinin (WGA, Molecular Probes), fixed tissues were mounted with Mowiol 4-88 mounting medium (Sigma-Aldrich). Image acquisition of luminal and abluminal faces was performed with confocal microscopy (Olympus FV1000) under laser excitation at 488 nm and emission sampling between 505 and 525 nm. Since PV contain several other types of cells (*e.g.*, endothelium and vascular smooth muscle cells), cardiomyocytes were identified by their striated pattern of sarcomeres in transmitted light.

2.5. Image analysis

TTorg plugin [14] for ImageJ software was used to calculate the transverse organization level of a TT network by performing a 2D FFT of a cell image. The amplitude of the peak in the Fourier spectrum at the TT frequency called “TT power” reflects this transverse organization level. The detection sensibility of TT organization (SSPD parameter) was set to 32.

RyR2-Ca_v1.2 co-localization was evaluated by two methods: image grey level profiles superposition and distance between clusters centroids. For calculations of the distance separating each RyR2 and the nearest Ca_v1.2, 2D images of longitudinal sections of cells were deconvoluted with Huygens Professional software (Scientific Volume Imaging, Brainvision). Euclidean distances between each RyR2 cluster centroid and their nearest Ca_v1.2 cluster centroid were calculated with R software.

Calcium transient activation maps within individual CM were realized with custom routines written in ImageJ Macro language. Briefly, for each pixel in the CM, the temporal first derivative profile was computed and the temporal position of the maximum of the derivative signal was considered as the activation time. A pseudo color LUT was then applied to each pixel in function of its activation time.

2.6. Statistics

Quantitative data are expressed as means ± SEM and the number of experiments as n.

Comparisons were made using Fisher tests (for variances) and Student’s t-tests or Mann-Whitney where appropriate (for means). Differences were considered significant at P < 0.05.

3. Results

3.1. Transverse tubular networks in isolated PV CM

Membrane staining with di-8-ANEPPS revealed different types of membrane invaginations in isolated PV CM chosen in light transmission. A large variety of tubular system was observed ranging from CM displaying a highly developed transversal tubular network with a regular transverse organization (Fig. 1A) as described for LV CM to CM with sparse and disrupted network (Fig. 1B) or without tubule (Fig. 1C) as observed in LA CM. Moreover, some PV CM showed heterogeneous tubular organization consisting of transversally organized tubules in one part of the cell and no tubules in the other (Fig. 1D).

Among PV CM, 34 % (n=28 among 82, n_{rats}=4) presented a regular transverse labeling similar to the transverse tubules (TT) observed in 100% of LV CM (Fig. 1E). However, TT spacing regularity, quantified by the TT power, was significantly less in PV CM (43.4 ± 0.3 , n=27) than in LV CM (48.5 ± 1.7 , n=15; $P < 0.01$; Fig. 1F).

In the remaining 66 % (n=54/82) of PV CM presenting a tubular network comparable to that of LA CM, the tubular length ($0.023 \pm 0.002 \mu\text{m}^{-1}$, n=32) was similar to that of LA CM ($0.021 \pm 0.002 \mu\text{m}^{-1}$, n=55, n_{rats}=3) and was also positively correlated to the cell width (Fig. S1 in the supplemental data) as already described in LA CM by Smyrnias *et al.* [15].

Cell widths were different among PV CM since PV CM with TT were significantly wider than those without TT (Fig. 1G). However, PV CM with TT were narrower than those of the LV ($17.7 \pm 1.0 \mu\text{m}$, n=28 vs. $21.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$, n=15; $P = 0.02$) whereas cell widths were similar in PV CM without TT and in LA CM ($15.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$, n=32 vs. $16.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$, n=55; $P = 0.68$).

Because of the heterogeneity of isolated PV CM regarding their tubular network organization (tubules with or without transverse organization, no or poorly developed tubules) we therefore investigated their spatial distribution within the pulmonary veins sleeves.

3.2. Distribution of different types of CM TT networks in PV myocardial sleeves

Cardiomyocyte membrane labeling with WGA in the whole PV myocardial sleeves showed complex and variable orientations of PV CM especially near the ostia of secondary PV branching from the main (Fig. 2A). Furthermore, consecutive CM layers were often almost orthogonally orientated (Fig. 2Ba and Bb) whereas a unidirectional orientation of consecutive cardiomyocyte layers was observed in LA (data not shown).

PV CM with the different tubular networks found in isolated cells (Fig. 1) were also observed in WGA-labeled PV tissue slices and distributed throughout in the whole sleeves in both luminal and abluminal layers (Fig. 3). Nevertheless, CM with a given tubular pattern were not scattered throughout the entire vein but grouped together in islets of various sizes (Fig. 3A-D). However, the anatomical distribution of these islets in the PV sleeves was not always identical and varied from rat to rat (n=3). It was not specific to one or several PV and was not related to the distance to the LA. Moreover, there was no evidence of an abrupt change in TT network type at the junction between PV and the roof of the LA.

Observations in PV sleeves sharply contrasted with those in the LA where the CM were more similar regarding their tubular network organization (not shown).

3.3. RyR2-Ca_v1.2 spatial coupling in PV CM vs. LA and LV CM

To examine the consequence of the variability of tubular organization on calcium-induced calcium transient, the distribution of RyR2 and Ca_v1.2 was firstly compared in PV, LA and LV CM.

RyR2 were present in the entire cell volume in PV, LA and LV CM (Fig. 4) and formed a transverse striated pattern with spacing identical to that of the sarcomere (Fig. S2) ($n > 100$ CM for each tissue).

In contrast, Ca_v1.2 distribution in PV CM varied from cell to cell ($n=36$). Some PV CM displayed a well striated pattern of Ca_v1.2 labeling (Fig. 4Aa) as in LV CM (Fig. 4B) whereas some others were only labeled at the cell periphery (Fig. 4Ac) as in LA CM (Fig. 4Cb) ($n > 25$ and $n_{rats} \geq 2$ for each tissue). As for the tubular network (Fig. 1), many intermediate distribution profiles were also observed in PV and LA CM (e.g., Fig. 4Ab and 4Ca). These findings were consistent with the study of the tubular network since Ca_v1.2 organization seemed to reflect the extent of tubules and their organization within the CM.

Co-localization of RyR2 and Ca_v1.2 varied greatly among PV CM with their different tubular organization patterns. Superimposition of the grey level profile plots of the double immunostained CM showed that RyR2-Ca_v1.2 co-localization was present in the entire cell as in LV CM (Fig. 4Aa and 4B) or as in LA CM in some locations within the cell (Fig. 4Ab and 4Ca) or only at the cell periphery (Fig. 4Ac and 4Cb). Although not shown, all intermediate types of co-localizations were found in PV CM. This was confirmed by the analysis of the distribution frequency of the RyR2-Ca_v1.2 distances showing a higher frequency for the shortest distances for some PV CM and in LV CM (Fig. 4Aa and 4B) and more equally distributed distances for other PV CM types and LA CM (Fig. 4Ab, Ac and C).

Thus, the spatial proximity of RyR2 and Ca_v1.2 was also very heterogeneous in PV CM and could therefore lead to different intracellular calcium handling. The intracellular calcium transient properties in stimulated PV CM were then studied.

3.4. Spatiotemporal shapes of electrically stimulated calcium transients in PV CM

As expected, the Ca²⁺ transient in response to field stimulation observed on linescan XT images oriented transversally to the cell longitudinal axis had different shapes in PV CM, depending on their tubular network pattern. PV CM presenting well-developed regular transverse tubules showed *I*-shaped Ca²⁺ transient like LV CM (Fig. 5Aa and 5B), *i.e.*, the calcium release was almost homogeneous across the cell. On the contrary, in cell exhibiting various degrees of tubular density and organization, the rise of cytoplasmic calcium concentration was asynchronous along the scanned line. In PV CM with poorly developed tubular network, the Ca²⁺ transient started close to the sarcolemma and spread towards the cell center, giving rise to *U*-shaped transient as observed in LA CM (Fig. 5Ac and 5Cb). In PV CM having some tubules in their center as well as in some LA CM, *W*-shaped Ca²⁺ transients, *i.e.*, originating from different points of the cell, could be observed (Fig. 5Ab and Ca).

High frequency XYT laser scanning images of PV CM planes were also recorded to have a more complete view of calcium transient spatiotemporal shapes in the whole CM. Such calcium transients recorded on a central PV CM plane are shown as "activation maps" in Fig. 6. Spatiotemporally homogeneous (uniform pseudo color; Fig. 6A) and heterogeneous (multiple pseudo

colors; Fig. 6B and C) calcium transients, corresponding respectively to *I*-shaped and to *W*- and *U*-shaped transients in XT linescans, were observed. For *W*-shaped calcium transient (Fig. 6B), calcium rise occurred early at several locations within the CM including its center. Outside these locations, the calcium rise occurred with a delay increasing with the distance from the first calcium release area. On the contrary, for *U*-shaped calcium transient (Fig. 6C), calcium rise occurred firstly near the plasma membrane at the CM periphery, and then propagates toward the center of the CM. Time courses of the calcium transients corresponding to each activation map presented in Fig. 6 could be visualized on their respective videos (slowed down 20 times for illustration purpose) provided in the supplemental data.

In PV CM, the amplitudes (F/F_0) of *I*- and *W*-shaped Ca^{2+} transients were larger than those of *U*-shaped transients in PV CM (Fig. S3).

3.5. Calcium waves frequency in PV CM vs. LV CM and LA CM

The spatial proximities of RyR2 and $Ca_v1.2$ is also determinant for the genesis of local spontaneous calcium releases which can initiate propagated waves of calcium-induced calcium release that can cause arrhythmias. Thus, we investigated the frequency of such calcium waves occurring in the three types of cardiomyocytes.

As shown in Fig. 7, wave frequency was higher in PV CM than in LA CM (5.5 ± 1.6 waves/90s, $n=40$ in PV CM vs. 0.8 ± 0.4 waves/90s, $n=22$ in LA CM), but was not different from LV CM (4.5 ± 1.0 waves/90s, $n=39$).

4. DISCUSSION

In the present study, we showed for the first time a cellular heterogeneity of isolated PV CM regarding the absence or presence and organization of the TT system. This heterogeneity was also observed in PV tissue where the different types of CM were gathered in islets randomly distributed in the entire PV sleeves. The variability of TT networks had functional consequences in terms of calcium transient shapes in isolated PV CM. Moreover, a higher calcium wave frequency was observed in PV than in LA CM.

4.1. Structural heterogeneities among PV CM

Although PV myocardial sleeves are in continuity with the left atria, the tubular system of PV CM differs from that of LA CM. In fact, we found PV CM with sparse and disrupted network or no tubule as observed in LA CM [16] but also one third of PV CM with a transversally organized tubular system similar to that of LV CM. The presence in rat PV of CM with an organized TT system was previously reported by Okamoto *et al.* (2012) [17]. Even if all isolated PV cells from their preparations were large rectangular-shaped cells with marked striation, they suggested that PV CM are structurally heterogeneous and that they analyzed only a subset of cells. To prevent bias in our study, cardiomyocytes were chosen in light transmission microscopy with appearance criteria (clearly visible sarcomeres and refractive membrane) to avoid CM selection under fluorescence microscopy. Moreover, TT organization was automatically analyzed with in house software [14]. Therefore, the cellular heterogeneity of PV CM observed in isolated cells is unlikely due to experimental artifacts. This is confirmed by the observation of the different types of CM in intact tissue stained with either di-8-ANEPPS or fluorescent WGA, excluding enzymatic membrane alteration during the isolation procedure.

This TT organization heterogeneity is associated with $Ca_v1.2$ channels localization heterogeneity among the PV CM since $Ca_v1.2$ are localized on sarcolemmal membrane and T-tubules. Therefore, $Ca_v1.2$ distribution varies from a transversal organization as in LV CM to a peripheral one as in most LA CM with all intermediate pictures reflecting the various TT organization levels. Consequently, various degrees of RyR2- $Ca_v1.2$ coupling are observed among PV CM since RyR2 localized on sarco/endoplasmic reticulum were always well transversally organized.

4.2. Tubular mediated spatiotemporal heterogeneity of evoked calcium transient and calcium waves in PV CM

The structural heterogeneities found have functional consequences in terms of calcium handling by individual CM. Several calcium transient patterns were observed in PV CM confocal linescan images: synchronous cytoplasmic calcium increase in the whole cell as in LV CM (highlighted by the classical *I* type of transient) and asynchronous cytoplasmic calcium increase (highlighted by the *U* and *W* types of transient) as depicted in LA CM [16,18]. Moreover, depending on the position of the line scanned on the CM image, *U* and *W* types of transient could be observed in a single PV CM. This was also observed in the corresponding confocal 2D scan images where several locations of calcium rise could be identified at the periphery and at the center of the cell, reflecting its heterogeneous TT organization: well organized in one part to no tubules in the other.

The higher frequency of calcium waves observed in PV CM than in LA CM could also be related to the presence of 33% of CM with transversally organized TT network in close apposition to the sarcoplasmic reticulum as demonstrated by the better RyR2- $Ca_v1.2$ coupling in the former tissue. Indeed, it has been proposed that SR–TT junctions are necessary for the initiation of Ca sparks [16,19]

which then initiates propagated waves of calcium induced-calcium release [20] in ventricular CM. However, our results suggest that RyR2-Ca_v1.2. coupling is not the only factor for calcium waves initiation (for review, see [21]) since we did not observe a calcium wave frequency higher in LV CM which present a better TT organization than PV CM. Whether PV CM have a higher SR load than LV CM and/or present differences in calcium influx/efflux which could explain their ability to generate calcium waves, despite their lower TT organization level compared to LV CM, remains to be determined.

4.3. Heterogeneity of CM in PV tissue: a singular ordered mess

The cellular heterogeneity of isolated PV CM population is associated to a heterogeneous repartition of these different cells types within the tissue. Indeed, individual PV CM with or without transversally organized TT are not randomly spread throughout the entire PV but are gathered in closely islets which themselves appear to be randomly distributed in the whole tissue.

This peculiar architecture of PV may contribute to its arrhythmogenic potential. Thereby, the cluster organization of CM together with the larger rise of cytoplasmic calcium concentration during the *I*- and *W*-shaped compared to the *U*-shaped calcium transient might lead to non-uniformity of contractions within the PV myocardial sleeves. This could lead more easily to arrhythmogenic calcium waves able to propagate within the PV as shown in a rat cardiac muscle model mimicking the non-uniformity observed during a mechanical or ischemic local damage of myocardium [22]. Moreover, the heterogeneity of RyR2-Ca_v1.2 coupling observed among PV CM may have an impact on the calcium removal processes and the replenishment of the SR as shown for detubulated rat ventricular CM [19]. Thus in PV, calcium load of the SR may differ in adjacent CM depending on their TT network extent. Consequently, some areas with high SR calcium load could present high frequency of calcium release events and calcium triggered arrhythmias as those observed in atrial CM of patients with chronic atrial fibrillation [23]. This hypothesis is strengthened by a recent observation in mice showing that spontaneous calcium releases in PV CM could prevent their normal excitation imposed by the sinus rhythm [8] and thus create spots of autonomous arrhythmogenic activity. On the other hand, the cellular and tissular heterogeneity may also have functional consequences in term of electric conduction properties. Indeed, TT are a key site for the regulation of action potential duration since rat detubulated LV CM have shorter action potential durations than control ones due to a reduced calcium influx [24]. Thus, if the presence and organization of the TT network also modulates PV CM action potential duration, then electrical conduction might be slower in clusters of PV CM with developed and organized tubular network (longer refractory period due to longer action potential duration) than in neighbouring clusters of CM devoid of organized tubular network. This should in turn facilitate the existence of ectopic foci, mostly due to re-entry phenomena. In addition, these re-entries might be reinforced by the anisotropy of conduction caused by the complex myocardial fibers orientations observed in this study and by others in rat PV [25] as well as in other species such as dog [26,27] and humans [28].

In conclusion, the present study demonstrates that despite their anatomic closeness, populations of PV and LA CM present important differences in their tubular system. The existence of a very wide range of tubular network architectures in the PV CM population involves an equally wide range of calcium transient shapes. This study also reveals a particular distribution of the different types of CM which are gathered in islets throughout the tissue. These high structural and functional heterogeneities of CM in PV sleeves might be key factors to induce electrical conduction abnormalities and trigger calcium waves, and both can lead to atrial arrhythmia induction. Considering the existence of tubular

differences in CM between species, and particularly between small and large mammals, it would be interesting but more challenging to replicate this study in human PV CM.

Disclosures

None

Acknowledgments

We thank Alexei Grichine (Institut Albert Bonniot, Grenoble) for help with high speed 2D confocal microscopy, Ian Findlay for his critical comments and correcting English, and the imageUP (Poitiers) and Microscopy Department of Bretonneau hospital (Tours) imagery platforms.

This work was supported by grants from the Région Centre Val de Loire, Université François-Rabelais de Tours and CNRS to CNRS ERL 7368.

References

- [1] M. Haïssaguerre, P. Jaïs, D.C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. Le Mouroux, P. Le Métayer, J. Clémenty, Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 659–666. doi:10.1056/NEJM199809033391003.
- [2] R. Khan, Identifying and understanding the role of pulmonary vein activity in atrial fibrillation, *Cardiovasc. Res.* 64 (2004) 387–394. doi:10.1016/j.cardiores.2004.07.025.
- [3] B. Aldhoon, V. Melenovský, P. Peichl, J. Kautzner, New insights into mechanisms of atrial fibrillation, *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 59 (2010) 1–12.
- [4] U. Schotten, S. Verheule, P. Kirchhof, A. Goette, Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 265–325. doi:10.1152/physrev.00031.2009.
- [5] J. Heijman, N. Voigt, S. Nattel, D. Dobrev, Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression, *Circ. Res.* 114 (2014) 1483–1499. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302226.
- [6] S.A. Jones, M. Yamamoto, J.O. Tellez, R. Billeter, M.R. Boyett, H. Honjo, M.K. Lancaster, Distinguishing Properties of Cells From the Myocardial Sleeves of the Pulmonary Veins CLINICAL PERSPECTIVE A Comparison of Normal and Abnormal Pacemakers, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1 (2008) 39–48. doi:10.1161/CIRCEP.107.748467.
- [7] S.J.R.J. Logantha, S.F. Cruickshank, E.G. Rowan, R.M. Drummond, Spontaneous and electrically evoked Ca²⁺ transients in cardiomyocytes of the rat pulmonary vein, *Cell Calcium.* 48 (2010) 150–160. doi:10.1016/j.ceca.2010.08.002.
- [8] K. Rietdorf, M.D. Bootman, M.J. Sanderson, Spontaneous, Pro-Arrhythmic Calcium Signals Disrupt Electrical Pacing in Mouse Pulmonary Vein Sleeve Cells, *PLoS ONE.* 9 (2014) e88649. doi:10.1371/journal.pone.0088649.
- [9] N. Doisne, V. Maupoil, P. Cosnay, I. Findlay, Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein: electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (2009) H102–108. doi:10.1152/ajpheart.00256.2009.
- [10] C.O. Malécot, P. Bredeloux, I. Findlay, V. Maupoil, A TTX-Sensitive Resting Na⁺ Permeability Contributes to the Catecholaminergic Automatic Activity in Rat Pulmonary Vein, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 26 (2015) 311–319. doi:10.1111/jce.12572.
- [11] M.D. Bootman, I. Smyrniak, R. Thul, S. Coombes, H.L. Roderick, Atrial cardiomyocyte calcium signalling, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813 (2011) 922–934. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.030.
- [12] F. Brette, C. Orchard, T-tubule function in mammalian cardiac myocytes, *Circ. Res.* 92 (2003) 1182–1192. doi:10.1161/01.RES.0000074908.17214.FD.
- [13] J. Curran, K.H. Brown, D.J. Santiago, S. Pogwizd, D.M. Bers, T.R. Shannon, Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49 (2010) 25–32. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.03.013.
- [14] C. Pasqualin, F. Gannier, C.O. Malécot, P. Bredeloux, V. Maupoil, Automatic quantitative analysis of t-tubule organization in cardiac myocytes using ImageJ, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 308 (2015) C237–C245. doi:10.1152/ajpcell.00259.2014.
- [15] I. Smyrniak, W. Mair, D. Harzheim, S.A. Walker, H.L. Roderick, M.D. Bootman, Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation–contraction coupling and inotropic stimulation, *Cell Calcium.* 47 (2010) 210–223. doi:10.1016/j.ceca.2009.10.001.
- [16] M.M. Kirk, L.T. Izu, Y. Chen-Izu, S.L. McCulle, W.G. Wier, C.W. Balke, S.R. Shorofsky, Role of the transverse-axial tubule system in generating calcium sparks and calcium transients in rat atrial myocytes, *J. Physiol.* 547 (2003) 441–451. doi:10.1113/jphysiol.2002.034355.
- [17] Y. Okamoto, M. Takano, T. Ohba, K. Ono, Arrhythmogenic coupling between the Na⁺–Ca²⁺ exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 988–997. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.01.007.
- [18] L. Mackenzie, M.D. Bootman, M.J. Berridge, P. Lipp, Predetermined recruitment of calcium release sites underlies excitation–contraction coupling in rat atrial myocytes, *J. Physiol.* 530 (2001) 417–429. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0417k.x.
- [19] F. Brette, S. Despa, D.M. Bers, C.H. Orchard, Spatiotemporal characteristics of SR Ca²⁺ uptake and release in detubulated rat ventricular myocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 804–812. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.08.005.
- [20] L.A. Venetucci, A.W. Trafford, S.C. O’Neill, D.A. Eisner, Na/Ca exchange: regulator of intracellular calcium and source of arrhythmias in the heart, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099 (2007) 315–325. doi:10.1196/annals.1387.033.

- [21] L.A. Venetucci, A.W. Trafford, S.C. O'Neill, D.A. Eisner, The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release, *Cardiovasc. Res.* 77 (2008) 285–292. doi:10.1093/cvr/cvm009.
- [22] Y. Wakayama, M. Miura, B.D. Stuyvers, P.A. Boyden, H.E.D.J. ter Keurs, Spatial Nonuniformity of Excitation–Contraction Coupling Causes Arrhythmogenic Ca²⁺ Waves in Rat Cardiac Muscle, *Circ. Res.* 96 (2005) 1266–1273. doi:10.1161/01.RES.0000172544.56818.54.
- [23] N. Voigt, N. Li, Q. Wang, W. Wang, A.W. Trafford, I. Abu-Taha, Q. Sun, T. Wieland, U. Ravens, S. Nattel, X.H.T. Wehrens, D. Dobrev, Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak and Increased Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients With Chronic Atrial Fibrillation, *Circulation.* 125 (2012) 2059–2070. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306.
- [24] F. Brette, L. Sallé, C.H. Orchard, Quantification of Calcium Entry at the T-Tubules and Surface Membrane in Rat Ventricular Myocytes, *Biophys. J.* 90 (2006) 381–389. doi:10.1529/biophysj.105.069013.
- [25] H. Hashizume, M. Tango, T. Ushiki, Three-dimensional cytoarchitecture of rat pulmonary venous walls: a light and scanning electron microscopic study, *Anat. Embryol. (Berl.).* 198 (1998) 473–480.
- [26] M. Hocini, S.Y. Ho, T. Kawara, A.C. Linnenbank, M. Potse, D. Shah, P. Jaïs, M.J. Janse, M. Haïssaguerre, J.M.T. de Bakker, Electrical Conduction in Canine Pulmonary Veins Electrophysiological and Anatomic Correlation, *Circulation.* 105 (2002) 2442–2448. doi:10.1161/01.CIR.0000016062.80020.11.
- [27] O.V. Aslanidi, M.A. Colman, M. Varela, J. Zhao, B.H. Smail, J.C. Hancox, M.R. Boyett, H. Zhang, Heterogeneous and anisotropic integrative model of pulmonary veins: computational study of arrhythmogenic substrate for atrial fibrillation, *Interface Focus.* 3 (2013) 20120069. doi:10.1098/rsfs.2012.0069.
- [28] S.Y. Ho, J.A. Cabrera, V.H. Tran, J. Farré, R.H. Anderson, D. Sánchez-Quintana, Architecture of the pulmonary veins: relevance to radiofrequency ablation, *Heart Br. Card. Soc.* 86 (2001) 265–270.

Figure legends

Fig. 1. Confocal microscopy of tubular networks in isolated PV, LA and LV CM. A-D, represent examples of the different types of tubular networks found in the PV CM population. A, CM with clearly organized TT, B, CM with randomly distributed tubules, C, CM without apparent tubular system and D, CM with partially transversally organized TT. Scale bars represent 10 μm . E, the percentage of CM with visually apparent TT network in LA (n=55), PV (n=82) and LV (n=15) cells. F, transverse regularity of the TT network (TT power) in PV and LV CM. G, width of PV CM with and without TT.

Fig. 2. Myofibril orientation in the PV. Myocardial sleeves were labeled with wheat germ agglutinin (WGA) and observed in confocal microscopy. A, complex orientations of CM on the luminal surface of one of the right superior PV (inset). Scale bar represents 200 μm . 'b' indicate ostia of small veins bifurcating from the main. B, the orthogonal arrangement of consecutive layers of CM in the PV. In the zone indicated by the white box in A. a) was recorded from the luminal surface and b) 25 μm deeper into the tissue towards the abluminal surface. Scale bars represent 20 μm . The results shown in this figure were representative of those found in 3 rats.

Fig. 3. The distribution of different types of CM in PV myocardial sleeves. A, a whole-mount PV stained with fluorescent WGA and viewed from the luminal surface with confocal microscopy. The scale bar represents 200 μm . The solid line boxes indicate areas with TT CM as illustrated in B. The dashed line boxes indicate areas where CM are without TT as illustrated in C. D, an example of abrupt transition between CM with and without TT. The four patterns of tubular system found in isolated PV CM (Fig. 1) are also seen in the intact pulmonary vein: a) CM with transverse tubules; b) CM with randomly distributed tubules; c) CM without or with low extended tubular system; and d) CM with partially transversally organized tubular system. Scale bars represent 30 μm . Similar results were observed in whole-mount PVs from 3 rats.

Fig. 4. Representative images of isolated CM of PV (A), LV (B) and LA (C) with fluorescent RyR2 (green) and $\text{Ca}_v1.2$ (red) double immunostaining recorded in confocal microscopy. For each cell, RyR2 and $\text{Ca}_v1.2$ fluorescence intensity profiles along the white line were traced in a graph and the histograms represent the distribution of the distances between each RyR2 cluster and its nearest $\text{Ca}_v1.2$ cluster calculated across the entire cell slice. Aa and B, illustrate a high level of RyR2- $\text{Ca}_v1.2$ colocalization. Ab and Ca, illustrate CM where RyR2 and $\text{Ca}_v1.2$ are only partially colocalized. Ac and Cb, show CM where RyR2 and $\text{Ca}_v1.2$ are colocalized only at the sarcolemmal membrane. n>25 for CM from each tissue.

Fig. 5. Different forms of calcium transient in PV, LA and LV CM. Linescan images of Ca^{2+} transients recorded transversally to the longitudinal axis of rat isolated PV (A), ventricular (B) and atrial (C) cardiomyocytes. Three shapes of Ca^{2+} transients are illustrated: *I*-shaped (Aa and B), *W*-shaped (Ab and Ca) and *U*-shaped (Ac and Cb). Horizontal arrows indicate the Y-axis (space) position of calcium increase for *W*- and *U*-shaped Ca^{2+} transients. Vertical arrows indicate the onset of the electrical field

stimulation pulse. Vertical and horizontal scale bars represent respectively 10 μm and 200 ms. $n > 25$ for CM from each tissue.

Fig. 6. Examples of activation maps of distinct spatiotemporal forms of calcium transient recorded in PV CM. Pseudo colors indicate the delay between the start of the electrical field stimulation and the rise of calcium in the cytoplasm. A, homogeneous and rapid increase of calcium in the whole CM following stimulation. B, following stimulation calcium rise occurs rapidly in some parts of the CM and later in others. C, calcium rises first near the plasma membrane at the periphery of the CM. Then it propagates centripetally to the center of the CM.

Fig. 7. Isolated CM were stimulated with a train of 20 (1 Hz) electrical pulses. Spontaneous Ca^{2+} waves were noted for the 90 s following the stimulus train.

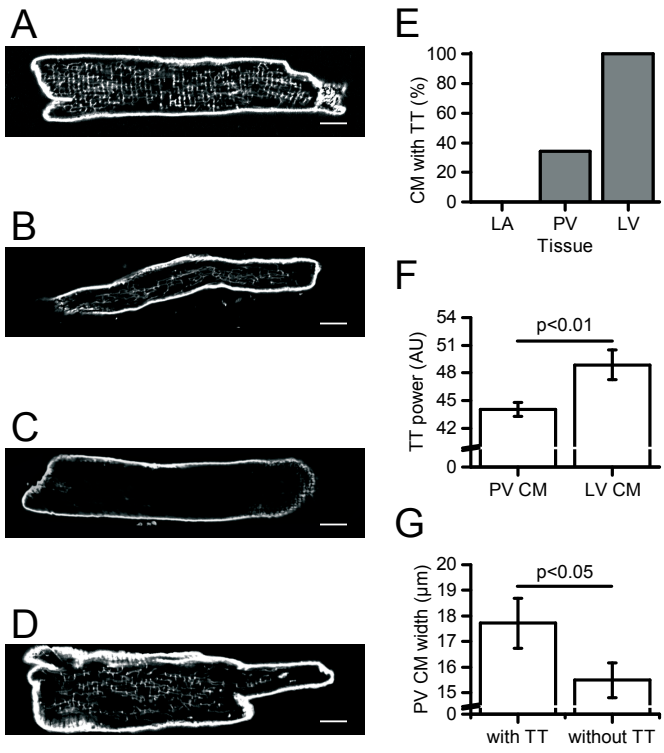


Figure 1

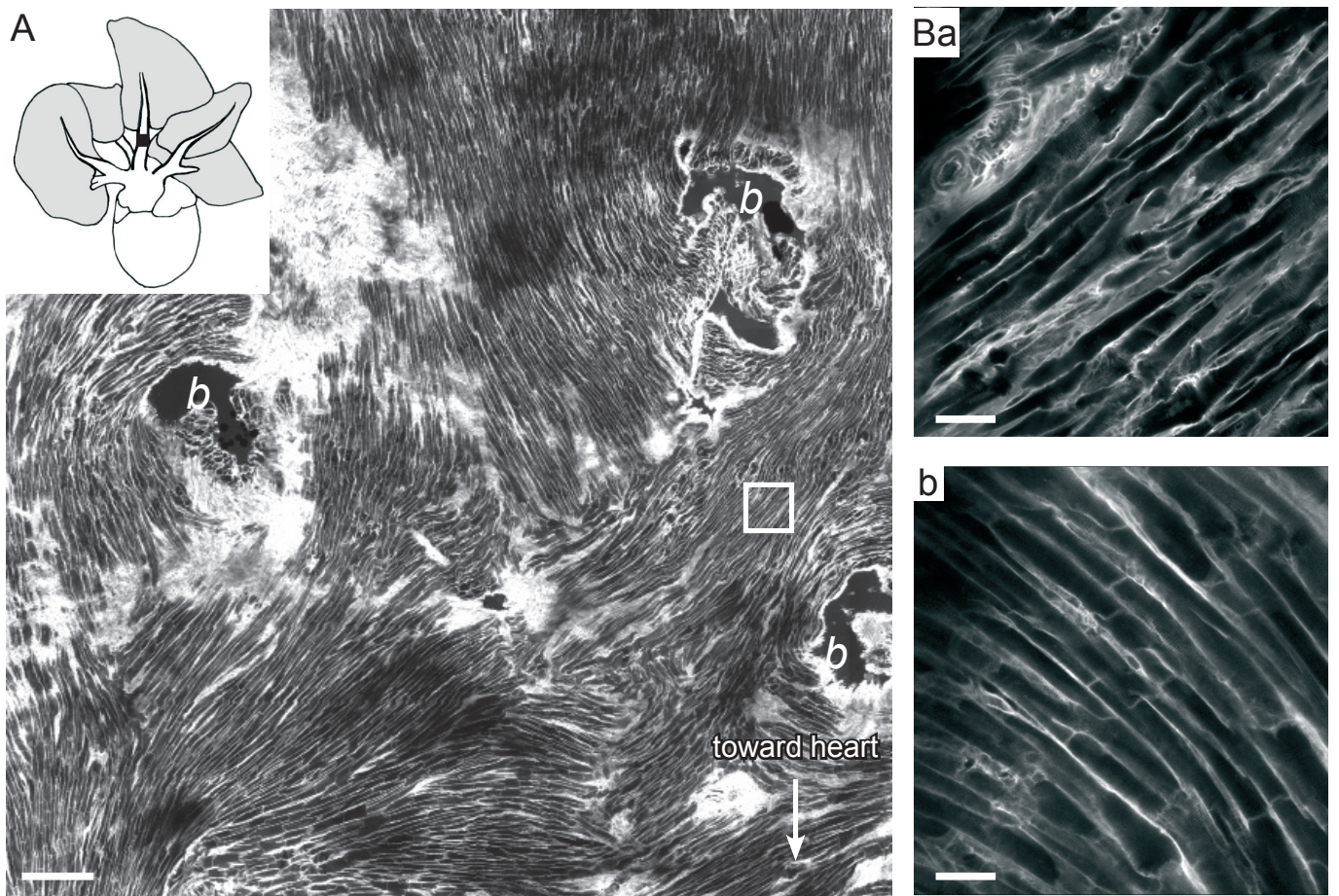


Figure 2

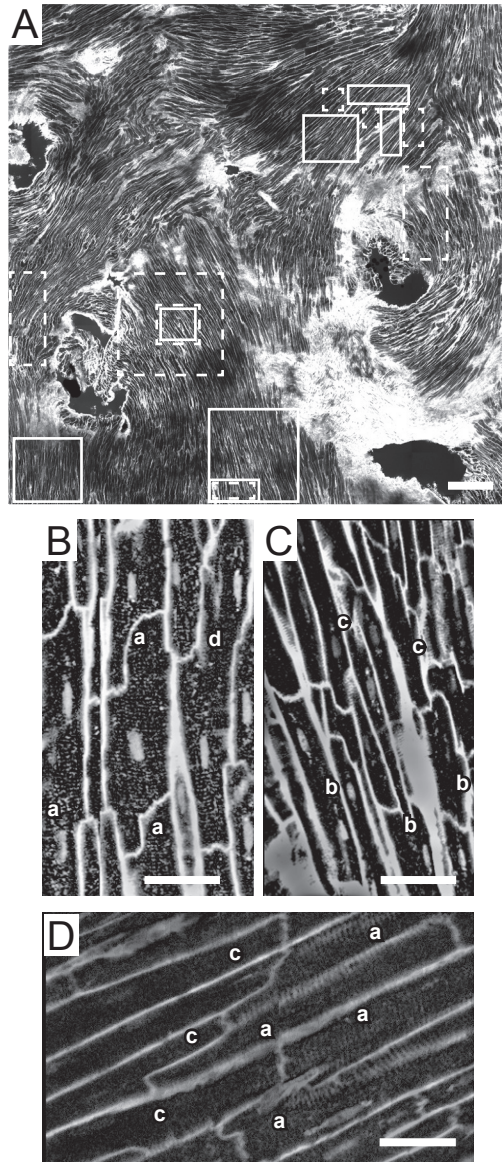
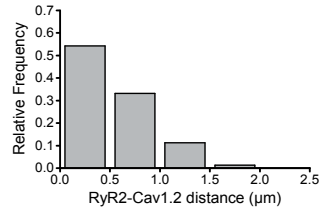
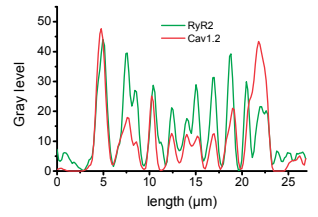
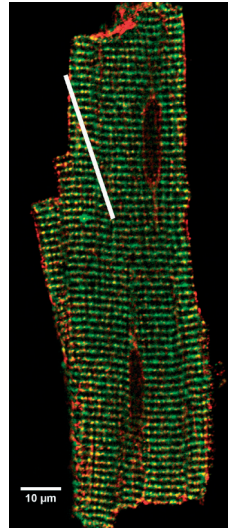
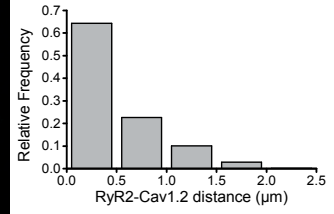
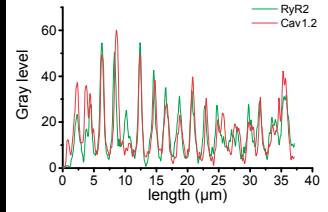
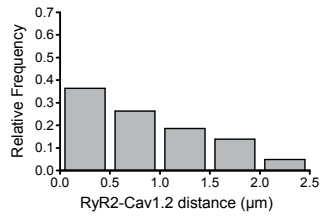
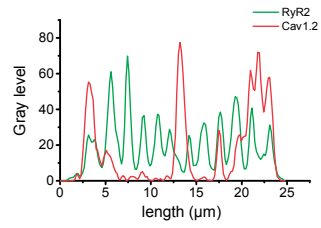
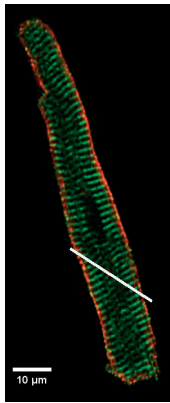
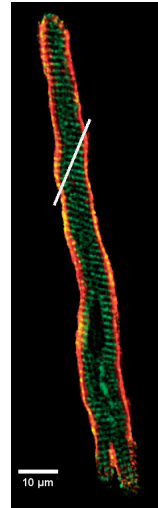
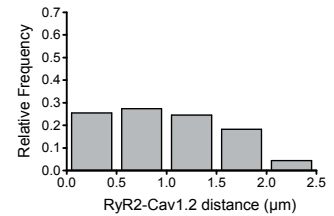
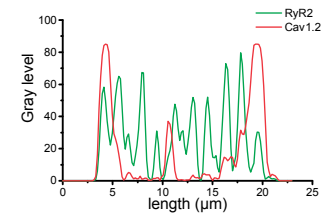
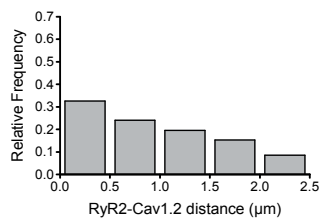
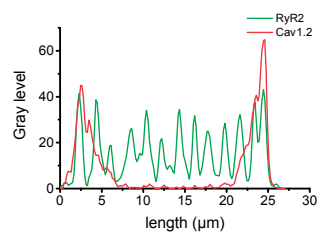
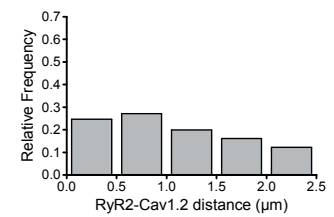
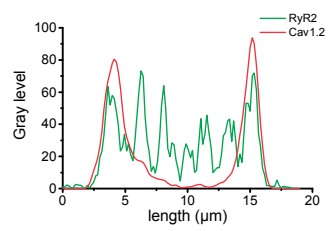


Figure 3

Aa**PV CM****B****LV CM****b****Ca****LA CM****c****b****Figure 4**

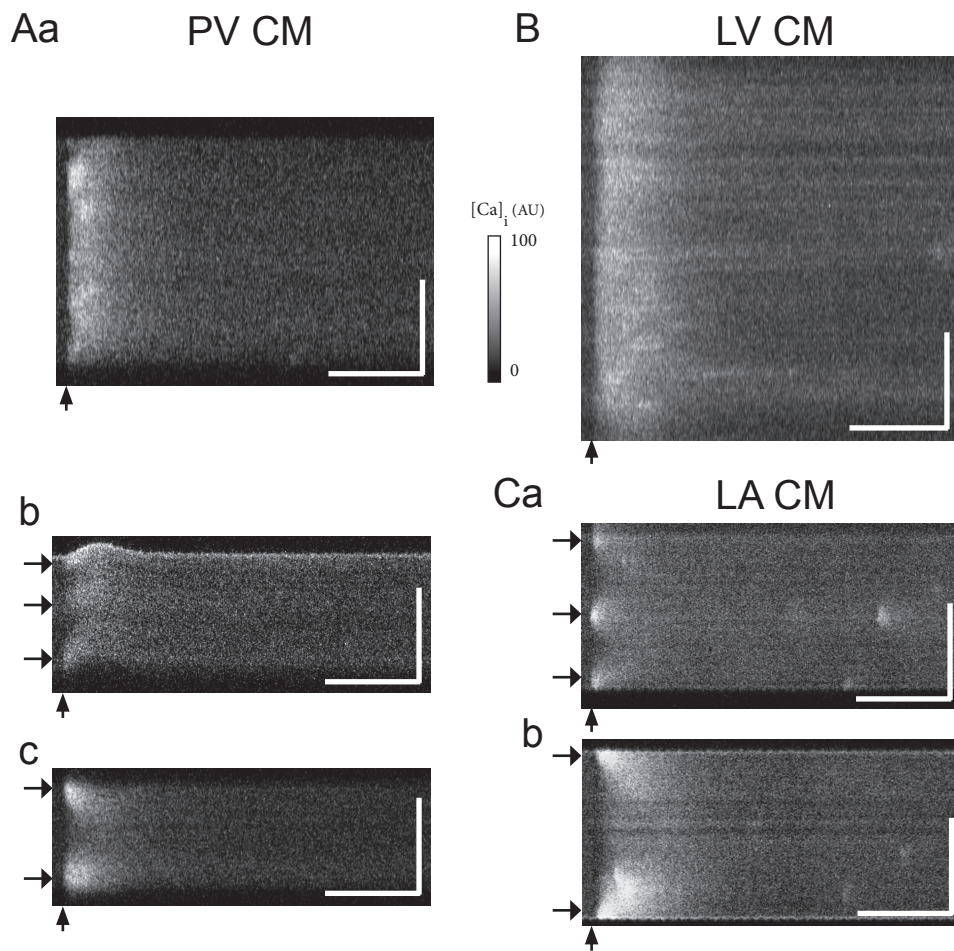


Figure 5

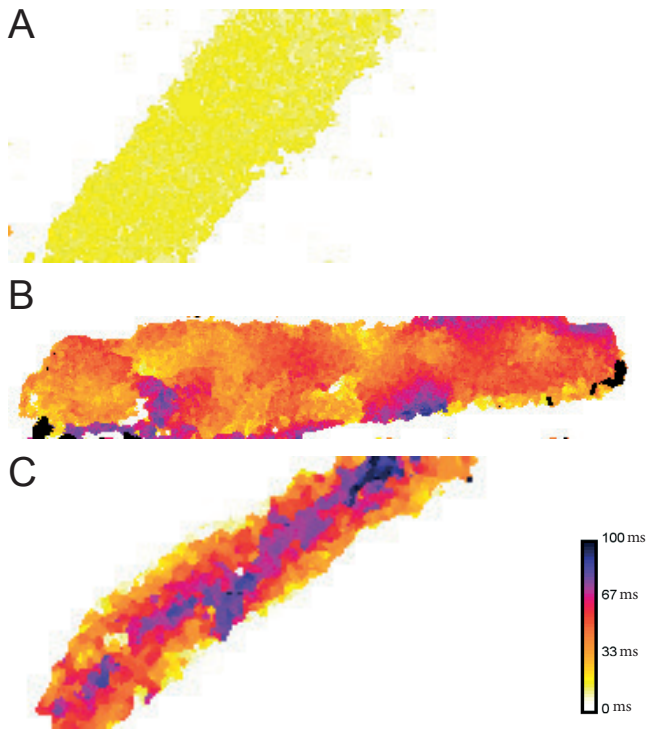


Figure 6

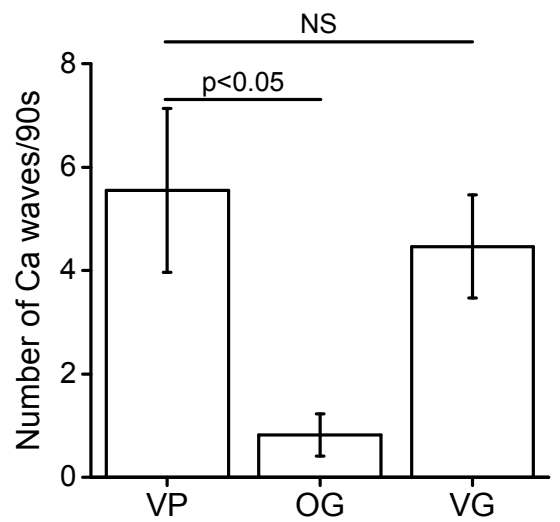


Figure 7

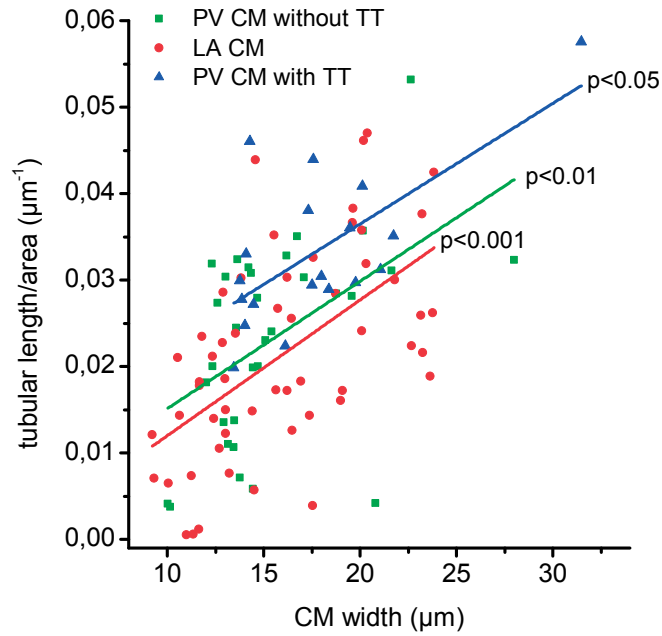


Figure S1: Relation between the tubular network length/area ratio and the cardiomyocyte width in PV CM with TT (blue), without TT (green) and in LA CM (red) cardiomyocytes. For each type of cardiomyocyte, correlation was tested with Pearson's correlation test.

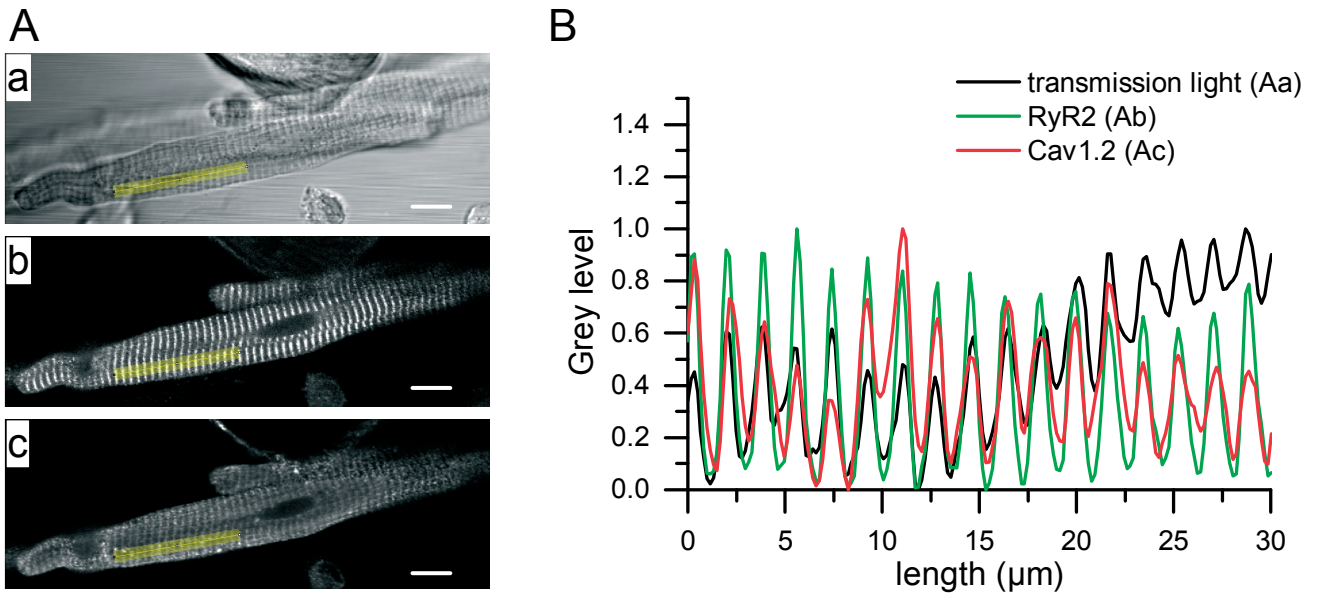


Figure S2: (A) PV cardiomyocyte in transmitted light microscopy (a) and in confocal microscopy with labeled RyR2 (b) and Cav1.2 (c). Scale bars represent $10 \mu\text{m}$. (B) grey level profiles along the yellow line drawn in A images.

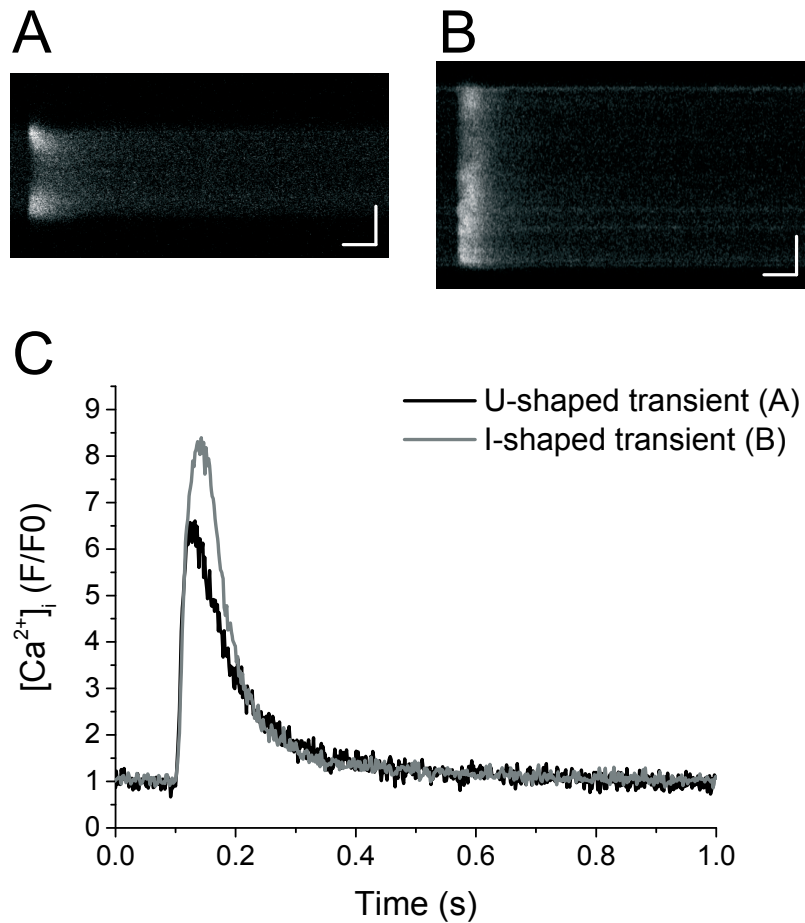


Figure S3: Comparison of the amplitudes of the cytoplasmic calcium rise for *U*- and *I*-shaped electrically stimulated calcium transients in PV cardiomyocytes. (A and B) *U*- and *I*-shaped calcium transients recorded along a line drawn transversally across two different PV CM. Vertical and horizontal scale bars represent respectively 5 μ m and 100 ms. (C) Y axis projection of A and B calcium transients.

3. Conclusion

D'un cardiomyocyte de VP à l'autre, les réseaux de tubules présentent une grande variabilité. Un éventail d'architectures du réseau tubulaire allant d'un réseau bien organisé de manière transversale – comparable à celui des cardiomyocytes ventriculaires –, jusqu'à une quasi-absence de tubules – comme dans les cardiomyocytes d'oreillette est observé. Par ailleurs, dans la population des CM de VP, un même cardiomyocyte peut présenter, une importante variabilité d'organisation des tubules transverses au sein de son cytoplasme.

Environ 34 % des cardiomyocytes de VP ont un réseau de tubules organisé de manière transverse. Toutefois, cette organisation est moins régulière que celle des cardiomyocytes ventriculaires. Les 66 % restants ressemblent aux cardiomyocytes atriaux. La longueur de leurs réseaux de tubules est d'ailleurs similaire à ces derniers.

Ces différents types de CM ne sont pas dispersés aléatoirement au sein du tissu, mais regroupés en îlots de tailles variables dans tout le manchon myocardique de la VP, à la fois dans la partie luminale et abluminale.

Cette grande hétérogénéité d'organisation tubulaire dans la population des CM de VP conduit à une grande hétérogénéité de couplage spatial des $Ca_v1.2$ avec les RyR2 et donc à un large éventail de formes des transitoires calciques. En effet, dans les CM présentant un réseau de tubules transverses fortement développé et bien organisé comme dans les CM de VG, le transitoire calcique débute de manière synchrone dans tout le volume de la cellule. À l'inverse, dans les CM avec un réseau de tubules absent ou faiblement développé – comme c'est le cas dans les CM d'OG –, il est restreint à la périphérie et présente parfois une faible propagation centripète. Un gradient de formes intermédiaires de transitoires calciques entre les deux formes extrêmes décrites précédemment pour les CM d'OG et de VG a également pu être observé dans les CM de VP. Ceci marque une différence importante avec les populations des CM d'OG et de VG, qui présentent des formes de transitoires assez homogènes.

Outre les conséquences sur la forme des transitoires, l'existence de CM présentant un bon couplage des RyR2 avec les $Ca_v1.2$ dans les CM de VP pourrait être à l'origine de la plus grande fréquence des *waves* calciques dans les CM de VP, et donc à l'origine du potentiel arythmogène accru au sein de cette population de CM.

C. Niveaux d'expression des RyR2, Cav1.2, NCX1 et PLB

1. Introduction et objectifs

Le niveau d'expression des protéines impliquées dans le cycle du calcium a ensuite été exploré et comparé entre les différents types de cardiomyocytes afin de compléter les travaux d'imagerie.

2. Résultats

La quantification de l'expression des RyR2, Cav1.2, NCX1 et PLB a été réalisée avec la méthode de western blot (cf partie « Quantification de l'expression des protéines » du Matériels et méthodes, page 101) La protéine de référence utilisée pour l'ajustement de la quantification est la β -actine, qui est exprimée de manière constitutive dans les trois tissus.

Le niveau d'expression des RyR2, Cav1.2 et NCX1 ne sont pas significativement différents entre les tissus d'OG et de VP. En revanche, une plus forte expression des Cav1.2 dans le tissu de VG ($p < 0,01$) par rapport au tissu de VP est constatée.

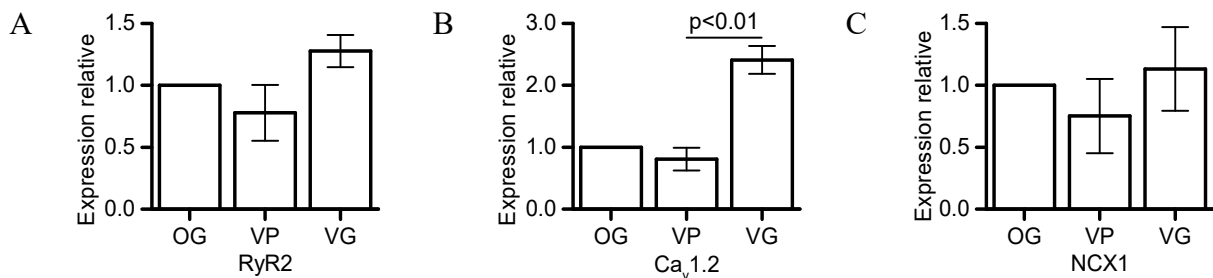


Figure 37 Niveaux d'expression des protéines RyR2.

(A), Cav1.2 (B) et NCX1 (C) dans les tissus d'OG, de VP et de VG. Le niveau d'expression est exprimé par rapport à celui obtenu dans le tissu d'OG. $n=4$ pour chaque tissu ; chaque échantillon correspond à 2 rats.

Les résultats d'une unique quantification du phospholamban (PLB) ont montré une expression légèrement plus importante dans le tissu de VP que dans celui d'OG. D'autre part, l'expression du PLB dans le tissu de VG était très supérieure à celle retrouvée dans les tissus de VP et d'OG.

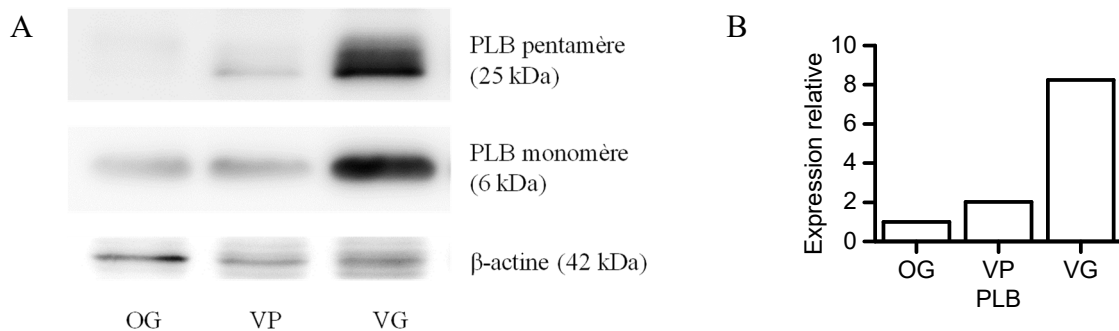


Figure 38 Niveaux d'expression du phospholamban dans les tissus d'OG, de VP et de VG.

A : résultat de la révélation du western blot ; B : quantification de l'expression du PLB total (forme monomère et pentamère) d'après A.

3. Discussion, limites et perspectives

Comme chez le chien (Melnik *et al.* 2005), l'expression du $Ca_v1.2$ et du NCX1 n'est pas différente dans les tissus de VP et d'OG chez le rat.

Malgré une expression identique des $Ca_v1.2$ dans les CM de VP et d'OG, il a été montré au laboratoire que la densité de courant calcique de type L (I_{CaL}) est plus grande dans les CM de VP que dans ceux d'OG (Malécot, Pasqualin, et Maupoil 2016). La densité de courant I_{CaL} est identique dans les CM de VP et de VG malgré une plus forte expression des $Ca_v1.2$ dans les CM de VG. Ceci suggère donc la participation de mécanismes régulateurs conduisant à une conductance ou à une probabilité d'ouverture augmentée des $Ca_v1.2$ en conditions basales dans les CM de VP, ou à la contribution d'autres types de canaux calciques (*e.g.* les $Ca_v1.3$) dans le courant I_{CaL} . La participation de tels canaux devra donc être explorée, ainsi que la conductance unitaire des $Ca_v1.2$ en conditions basales dans les CM de VP. L'immunomarquage des $Ca_v1.3$ dans les CM isolés de VP et leur observation en microscopie confocale ont été tentés, mais les expériences n'ont pas été concluantes.

Le niveau d'expression des RyR2 et du NCX1 est identique entre les trois types de CM. Toutefois, ces protéines étant soumises à de nombreuses régulations, leur fonctionnalité devra être caractérisée.

Conformément à ce qui a été précédemment décrit, nous trouvons une plus forte expression du PLB dans le VG que dans l'OG (Walden, Dibb, et Trafford 2009). Toutefois, ces expériences doivent être reproduites pour confirmer les résultats obtenus pour les VP.

Le niveau d'expression des autres protéines impliquées dans le cycle du calcium devra également être examiné (*e.g.* $Ca_v1.3$, SERCA2a, sarcolipine, calséquestrine). L'ensemble des résultats obtenus devra néanmoins être considéré avec prudence compte tenu de l'existence de types cellulaires autres que des CM dans le tissu de VP. En effet, l'extraction des protéines de VP ne permet pas de séparer celles issues des cardiomyocytes de celles issues des autres types cellulaires (*e.g.* cellules musculaires lisses). Ces dernières, bien que largement minoritaires sont donc prises en compte dans la quantification des protéines.

D. Étude des transitoires calciques globaux dans les cardiomyocytes de VP vs. OG et VG

1. Introduction et objectifs

Le transitoire calcique des CM de VP a été très peu étudié par rapport à celui des CM d'OG et de VG. Seules deux études comparent le transitoire des CM de VP à celui des CM

d'OG. Une première étude, réalisée chez le chien, ne montre pas de différence de transitoire entre ces deux types de CM (Coutu, Chartier, et Nattel 2006). A l'inverse, une étude réalisée chez le lapin montre une décroissance plus lente du transitoire calcique des CM de VP par rapport à celui des CM d'OG (Jones *et al.* 2008). A ce jour, aucune étude n'a été réalisée chez le rat.

Dans cette espèce, l'existence d'une architecture membranaire singulière associée à différentes formes de transitoires calciques observées en microscopie confocale dans les CM de VP nous a conduit à mesurer le transitoire calcique global et à étudier les mécanismes d'extrusion et de recapture du calcium cytoplasmique dans ces cellules. Pour cela, les CM de VP de rat ont été comparés aux CM d'OG et de VG.

2. Résultats

a. Amplitude et cinétique des transitoires calciques évoqués par une stimulation électrique dans les cardiomyocytes de VP

Trois paramètres ont été mesurés pour caractériser le transitoire calcique global des CM de VP et le comparer à ceux d'OG et de VG : l'amplitude, le temps au pic (TTP) et la constante de décroissance Tau. L'amplitude des transitoires calciques – exprimée en ratio par rapport au niveau de fluorescence diastolique (F/F_0 ; cf partie « Enregistrements photométriques des transitoires calciques globaux » page 94) – des cardiomyocytes de VP stimulés à 1 Hz est en moyenne plus grande ($4,16 \pm 0,43$; $n=22$) que celle des cardiomyocytes d'OG ($1,96 \pm 0,17$; $n=24$) et de VG ($2,63 \pm 0,17$; $n=33$) (Figure 39-AB). Ceci suggère l'existence de différences dans les mécanismes responsables de l'augmentation, de l'élimination et/ou de la recapture du calcium cytoplasmique entre les CM de VP, d'OG et de VG.

De plus, la variabilité de l'amplitude des transitoires calciques – estimée par la variance dans chaque population de CM – est plus grande dans les CM de VP (Figure 39-B) que dans ceux d'OG et de VG, ce qui indique une plus grande hétérogénéité d'amplitude des transitoires calciques des CM de VP (variances (F/F_0) : 4,7 (VP) vs. 1,4 (OG ; $p<0,01$) et vs. 1,1 (VG ; $p<0,001$) ; F-test).

La cinétique d'augmentation et de diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ pendant les transitoires présente également des différences entre les CM de VP, d'OG et de VG :

– le TTP est plus grand dans les cardiomyocytes de VP que dans les deux autres types de CM (37,7 ms vs. 28,4 ms (OG) et 27,3 ms (VG)) (Figure 39-C) ;

– la constante Tau de décroissance du transitoire calcique est plus petite dans les CM de VP que dans les deux autres types de CM (94,7 ms vs. 116 ms (OG ; $p < 0,05$) et 170 ms (VG ; $p < 0,001$)) (Figure 39-D). La cinétique de décroissance du transitoire est donc plus rapide dans les CM de VP, ce qui indique que l'élimination et/ou la recapture du calcium cytoplasmique est également plus rapide dans ce type de CM. Cette dernière observation nous a conduit à étudier ces deux mécanismes.

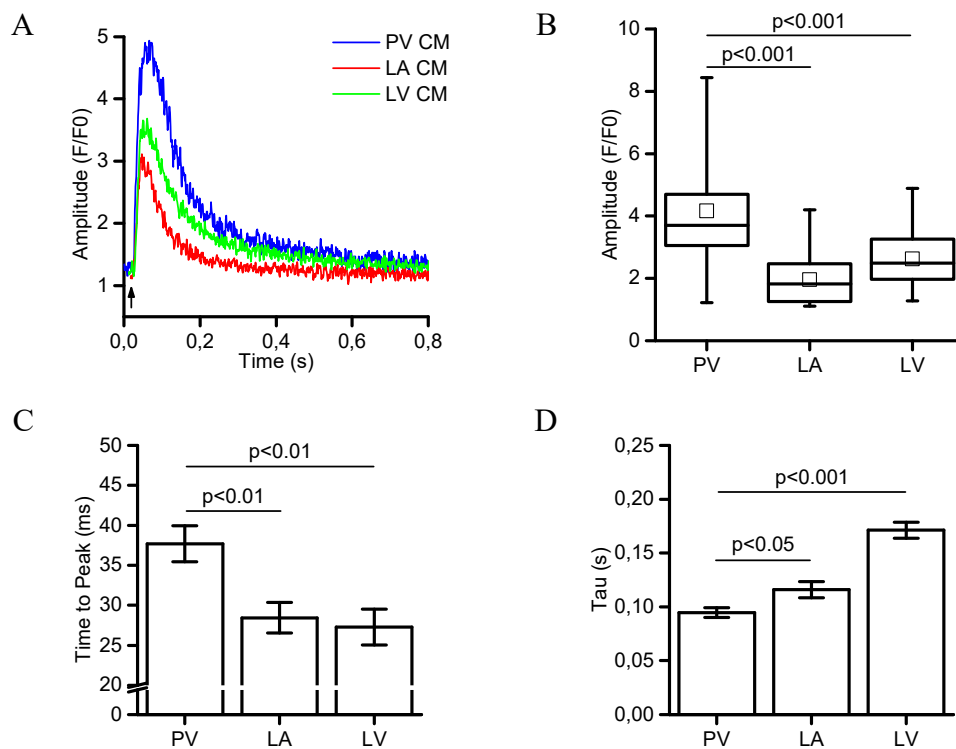


Figure 39 Amplitude et cinétique des transitoires calciques évoqués par une stimulation électrique dans les cardiomyocytes de VP.

A : Exemples représentatifs de transitoires calciques évoqués par une stimulation électrique (1 Hz) dans les CM de VP, OG et VG. La flèche indique le moment de la stimulation électrique ; **B :** diagramme en boîte (minimum, 1er quartile, médiane/moyenne, 3ème quartile, maximum) décrivant l'amplitude des transitoires calciques dans les trois types de CM ; **C et D :** représentent respectivement la moyenne \pm SEM des temps au pic et des constantes de décroissance des transitoires calciques dans les trois types de CM. Les tests statistiques de B, C et D sont des comparaisons de moyennes par test-t.

b. Mécanismes d'élimination et de recapture du calcium cytoplasmique

La vitesse de recapture par la SERCA a été estimée par différence des cinétiques de diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ lorsque les SERCA sont opérantes et lorsqu'elles sont rendues inopérantes par la caféine (cf partie « Étude des mécanismes d'extrusion et de recapture du calcium cytoplasmique » page 95). Les vitesses de recapture par la SERCA sont identiques dans les CM de VP et d'OG ($10,39 \pm 0,82 \text{ s}^{-1}$ vs. $10,32 \pm 1,42 \text{ s}^{-1}$) (Figure 40-Aa). De plus, elles sont supérieures à celle des CM de VG ($5,37 \pm 0,39 \text{ s}^{-1}$, $p < 0,001$ vs. VP et OG), ce qui explique pourquoi la décroissance du transitoire est plus rapide dans les CM de VP que dans ceux de VG.

Les autres mécanismes, soit l'ensemble de l'élimination du calcium par le NCX, la PMCA et de sa séquestration par les mitochondries, sont plus rapides dans les CM de VP que dans les CM d'OG ($0,36 \text{ s}^{-1}$ vs. $0,30 \text{ s}^{-1}$, $p < 0,01$), mais restent plus lents que dans les CM de VG ($0,55 \text{ s}^{-1}$, $p < 0,01$) (Figure 40-Ab). La décroissance plus rapide du transitoire calcique dans les CM de VP par rapport aux CM d'OG pourrait donc être expliquée par une élimination plus rapide du Ca^{2+} par ces mécanismes, que nous qualifierons par la suite de mécanismes « mineurs ».

La détermination des vitesses d'extrusion de la SERCA et des mécanismes mineurs a permis d'évaluer la proportion de calcium éliminé du cytoplasme par chacun d'eux pendant le transitoire calcique (Figure 40-B). Ainsi, dans les CM de VP comme dans les CM d'OG, la majorité du calcium cytoplasmique (respectivement 96,5 % et 97,2 %) est recapturée dans le réticulum sarcoplasmique par la SERCA. Dans les conditions basales, l'élimination plus rapide du calcium par les mécanismes mineurs dans les CM de VP par rapport aux CM d'OG (respectivement 3,5 % et 2,8 %) n'a que peu d'incidence puisqu'elle ne contribue qu'à une élimination très modeste du calcium libéré pendant transitoire. Dans les CM ventriculaires, ces mécanismes d'élimination mineurs jouent un rôle plus important, puisque seulement 90,7 % du calcium est recapturé par le RS.

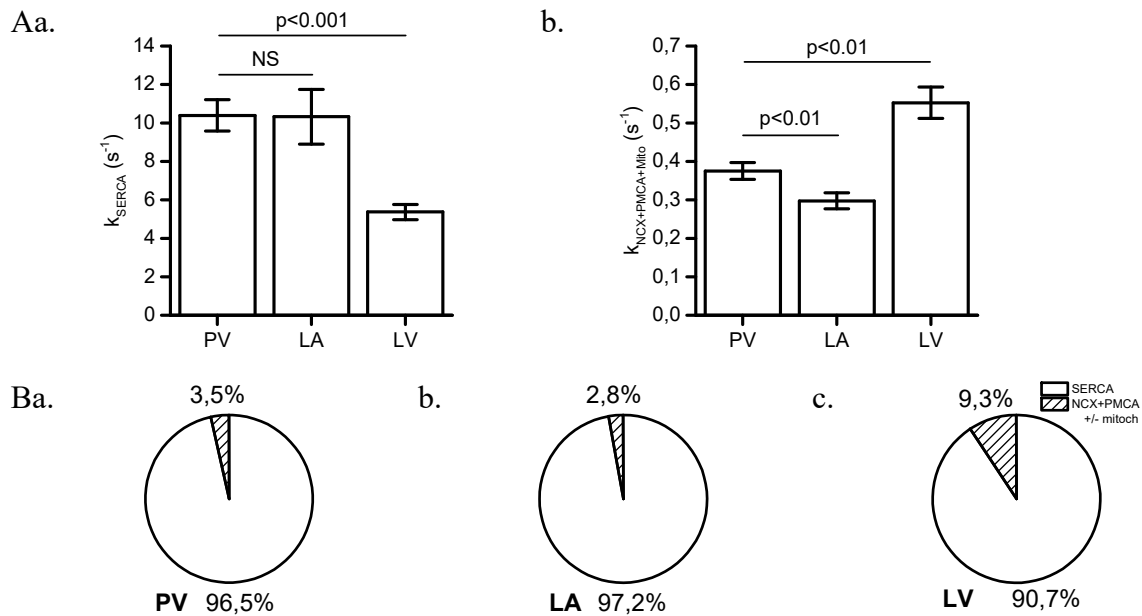


Figure 40 Élimination et recapture du calcium cytoplasmique.

Aa et Ab : représentent respectivement les moyennes \pm SEM des constantes de cinétique d'élimination du calcium cytoplasmique par la SERCA et de l'ensemble des mécanismes mineurs (NCX, PMCA et mitochondrie) dans les trois types de CM ; B : part relative du calcium recapturé par la SERCA et par les mécanismes mineurs pendant la phase de décroissance du transitoire calcique dans les trois types de CM.

c. Cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique

La cinétique de remplissage en Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, a été évaluée par le nombre de stimulations électriques nécessaires pour atteindre 50 % de sa charge à l'équilibre après sa déplétion calcique par la caféine (cf partie « Cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique » page 97). Comme le montre la Figure 41, le nombre de stimulations nécessaires pour atteindre 50 % de la charge du RS à l'équilibre est plus grand dans les CM de VP que dans ceux d'OG et de VG, ce qui indique que la cinétique de remplissage est plus lente dans les CM de VP que dans ceux d'OG et de VG (VP : 43 ± 4 stimulation (n=18), OG : 30 ± 5 (n=16 ; p < 0.05 vs. VP) et VG : 9 ± 1 (n=16 ; p < 0,001 vs. VP)).

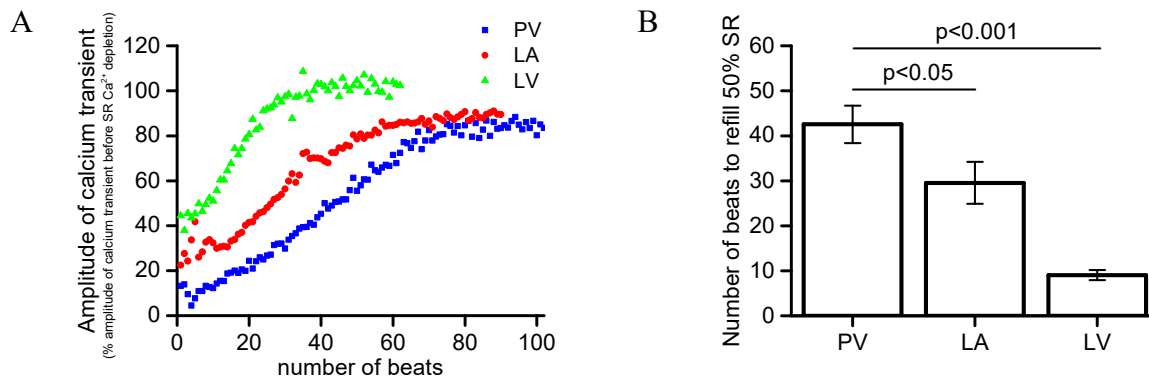


Figure 41 Cinétique de remplissage du réticulum sarcoplasmique.

A : exemples représentatifs de retour à l'état d'équilibre de l'amplitude du transitoire calcique après déplétion des stocks calciques par 10 mM de caféine dans les trois types de CM ; **B :** nombre moyen de battements requis pour atteindre 50 % de l'amplitude du transitoire calcique à l'équilibre dans les trois types de CM.

d. Effet de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques sur le transitoire calcique

La stimulation des récepteurs β -adrénergiques par 10 nM d'isoprénaline induit une augmentation identique de l'amplitude du transitoire calcique dans les CM de VP ($62 \pm 13 \%$, $n=7$) et d'OG ($69 \pm 13 \%$, $n=9$). Toutefois, dans ces deux types de CM, l'augmentation de l'amplitude est moins importante que dans les CM de VG ($129 \pm 11 \%$, $n=10$) (Figure 42-A, B-D et Figure 43). Cette augmentation de l'amplitude du transitoire est parfois associée à une faible augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique, dans les CM de VP ($n=3/7$) et d'OG ($n=7/9$) (Figure 42-C et Figure 43-Bb). Au contraire, dans les CM de VG (Figure 42-D), on constate plutôt une diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique ($n=8/10$) (Figure 42-D et Figure 43-C).

L'isoprénaline augmente significativement le temps au pic des transitoires calciques des cardiomyocytes de VP et du VG, mais pas de ceux d'OG (Figure 43-E).

L'isoprénaline (10 nM) ne change pas la valeur de Tau dans les CM de VP et d'OG, ce qui semble indiquer une absence d'augmentation de la vitesse des mécanismes de recapture et d'extrusion du calcium cytoplasmique. Au contraire, la valeur de Tau est diminuée dans le VG, ce qui indique une augmentation de la vitesse de décroissance du transitoire, et donc une accélération de l'extrusion/recapture du calcium cytoplasmique. De plus, en présence d'isoprénaline 10 nM, Tau est identique dans les CM de VP, d'OG et de VG (Figure 42-F).

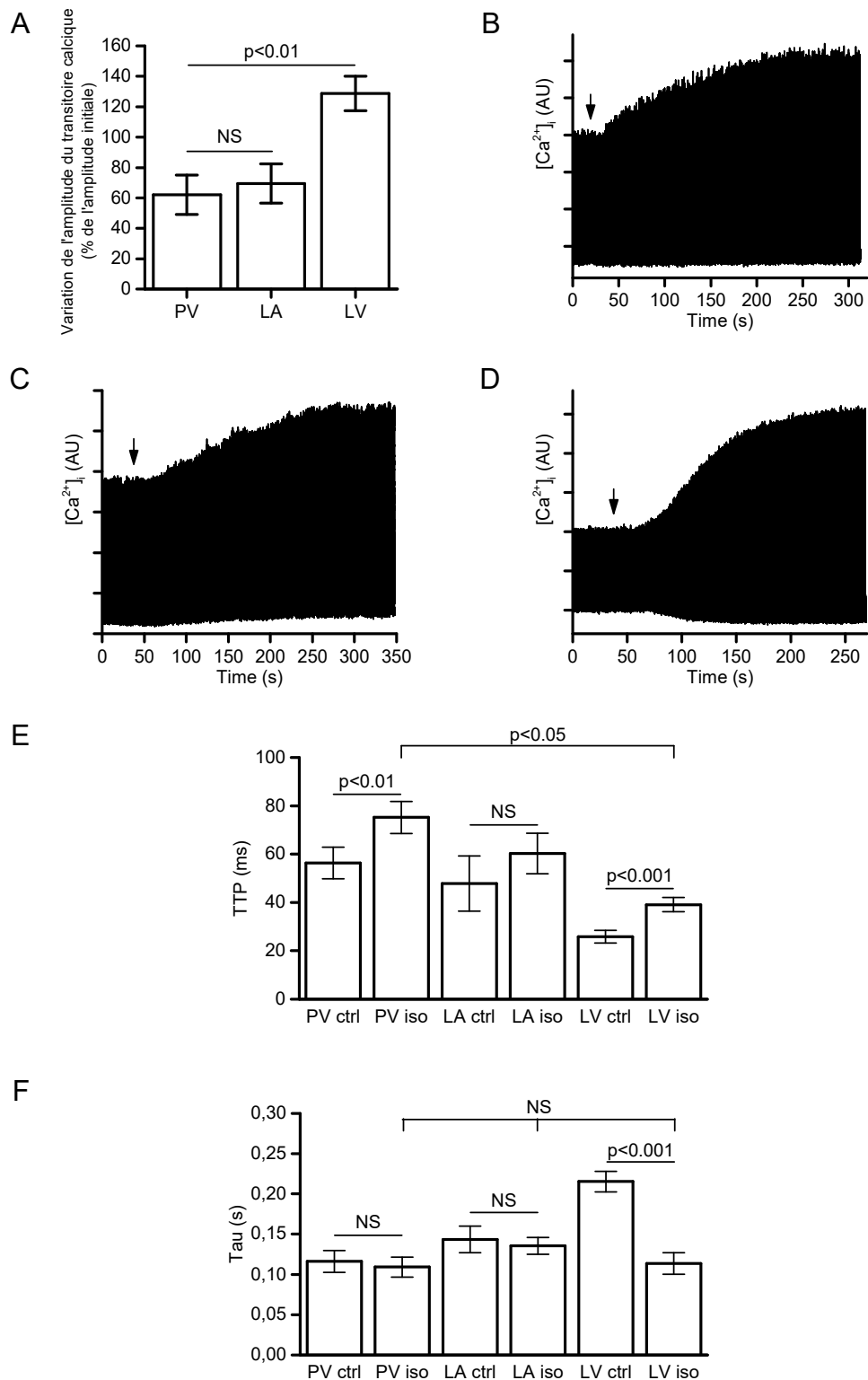


Figure 42 Effet de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques sur le transitoire calcique. **A** : variation de l'amplitude du transitoire calcique induit par 10 nM d'isoprénaline dans les cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG ; **B** à **D** : tracés représentatifs de l'effet de l'isoprénaline sur les transitoires calciques, dans les CM de VP (**B**), d'OG (**C**) et de VG (**D**). La flèche indique le début de la superfusion d'isoprénaline. Les transitoires calciques ont été évoqués par une stimulation électrique de champ à 1 Hz ; **E** : valeurs des temps au pic des transitoires calciques en condition contrôle et en présence d'isoprénaline ; **F** : valeurs de la constante de décroissance du transitoire calcique en condition contrôle et en présence d'isoprénaline. Les expériences ont été réalisées à 22°C.

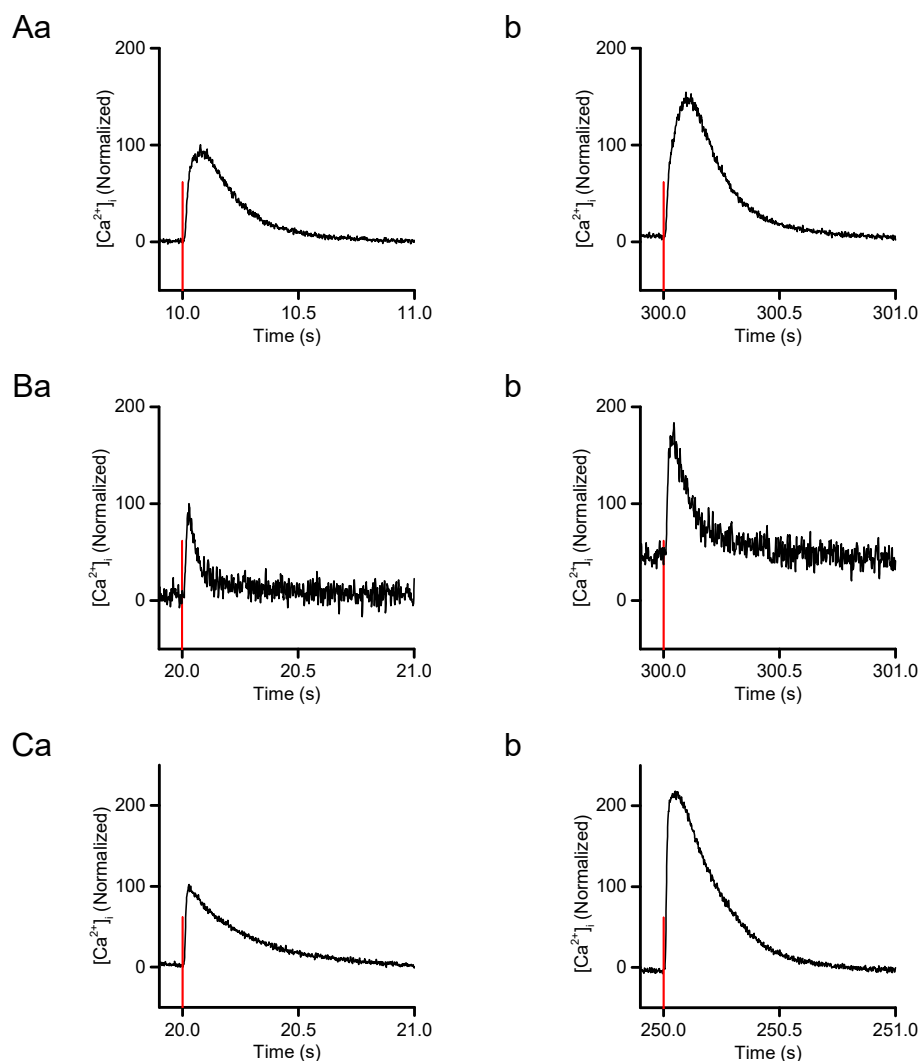


Figure 43 Effet de l'isoprénaline sur les transitoires calciques. (Aa, Ba et Ca) transitoires calciques en conditions contrôles dans les cardiomyocytes de VP, d'OG et de VG ; (Ab, Bb et Cb) transitoires calciques en présence de 10 nM d'isoprénaline. Les transitoires ont été normalisés par rapport aux transitoires en conditions contrôles. Les transitoires représentés sont issus des tracés représentés sur la Figure 42. Les lignes rouges indiquent le moment de la stimulation électrique.

e. Effet de la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques sur l'amplitude du transitoire calcique

La stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques est nécessaire au déclenchement des salves d'activités automatiques induites par la noradrénaline dans les anneaux isolés de VP. De plus, l'activation sélective des récepteurs α_1 -adrénergiques induit un effet inotrope négatif (I-) (Maupoil *et al.* 2007) et dépoliarise la membrane des CM de VP (Doisne *et al.* 2009), alors qu'elle ne modifie pas significativement la polarité membranaire des CM d'OG. Nous avons donc exploré l'effet de la cirazoline, un agoniste sélectif de ces récepteurs, sur le transitoire calcique des cardiomyocytes isolés de VP et d'OG.

La cirazoline induit une diminution lente et progressive du transitoire calcique des CM de VP et d'OG stimulés à 1 Hz. Cet effet débute environ 5 minutes après la superfusion de 5 nM de cirazoline et est plus important dans les CM de VP ($-77 \pm 7 \%$, $n=9$) que dans les CM d'OG ($-43 \pm 13 \%$, $n=9$) (Figure 44 A). Il est parfois accompagné d'une augmentation plus ou moins importante de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique dans les deux types de CM (Figure 44). Cette diminution de l'amplitude du transitoire calcique est associée à une diminution visible de l'amplitude de la contraction des deux types de CM. Cette diminution n'a pas été quantifiée, car la présence de la sonde calcique perturbe la contraction, et la charge cytoplasmique en sonde calcique varie d'une cellule à l'autre.

L'effet de la cirazoline sur la cinétique de décroissance du transitoire n'est pas clair. D'une cellule à l'autre, celle-ci (Tau) diminue, reste stable, ou augmente (Figure 44-B). De ce fait, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les CM d'OG et de VP, et l'effet de l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques sur les mécanismes d'extrusion/recapture du calcium cytoplasmique est incertain.

Enfin, aucun lien n'a été constaté entre la variation de la vitesse de décroissance du transitoire et l'augmentation légère de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique, car cette dernière est présente à la fois dans des CM présentant une augmentation et une diminution de Tau.

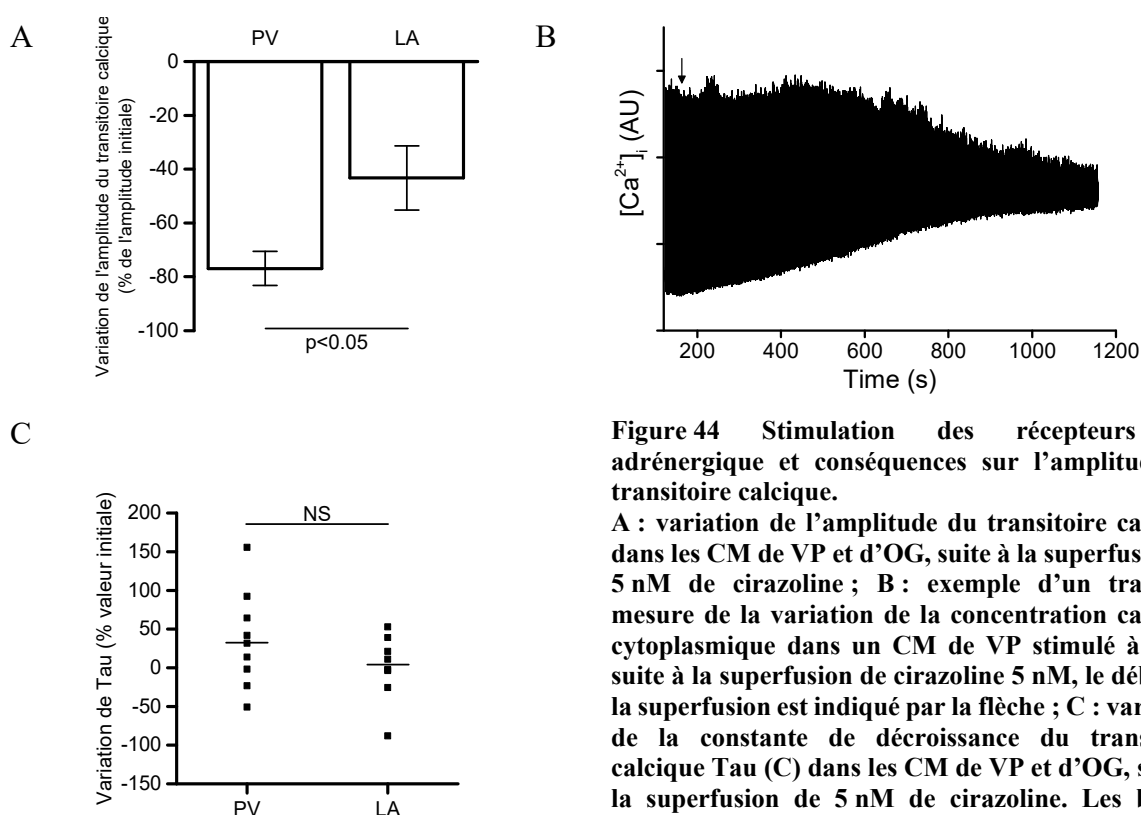


Figure 44 Stimulation des récepteurs α_1 -adrénergique et conséquences sur l'amplitude du transitoire calcique.

A : variation de l'amplitude du transitoire calcique dans les CM de VP et d'OG, suite à la superfusion de 5 nM de cirazoline ; **B** : exemple d'un tracé de mesure de la variation de la concentration calcique cytoplasmique dans un CM de VP stimulé à 1 Hz, suite à la superfusion de cirazoline 5 nM, le début de la superfusion est indiqué par la flèche ; **C** : variation de la constante de décroissance du transitoire calcique Tau (**C**) dans les CM de VP et d'OG, suite à la superfusion de 5 nM de cirazoline. Les barres horizontales indiquent la moyenne de chaque population de CM.

3. Discussion

a. Amplitude du transitoire calcique

Les transitoires calciques évoqués par une stimulation électrique des cardiomyocytes de VP ont une amplitude plus grande et plus variable que ceux des cardiomyocytes d'OG et de VG.

Le transitoire calcique en moyenne plus grand dans les CM de VP que dans les CM d'OG peut être expliqué par l'existence d'un réseau de tubules portant des canaux calciques Cav1.2 plus développé et mieux organisé transversalement dans les CM de VP que dans ceux d'OG. Ceci conduit à un meilleur couplage spatial des Cav1.2 avec les RyR2, donc à une mobilisation des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique plus homogène et plus complète et ainsi à un transitoire calcique plus grand et plus homogène dans la cellule. De plus, contrairement à ce qui a été observé Ehrlich *et al.* chez le chien et par Okamoto *et al.*, chez le rat, nous avons montré au laboratoire que la densité de courant calcique dans les CM de VP était plus grande que dans les CM d'OG (Malécot, Pasqualin, et Maupoil 2016), ce qui conduit également à la génération par le CM d'un transitoire calcique plus grand.

Cependant, ni le réseau de tubule ni le courant calcique ne permettent d'expliquer pourquoi le transitoire calcique est plus grand dans les CM de VP que dans ceux de VG. En effet, ce réseau est en moyenne mieux développé dans les CM de VG et nous avons montré que la densité de courant calcique des CM de VP est identique à celle des CM de VG (Malécot, Pasqualin, et Maupoil 2016). Dans ces conditions, la plus grande vitesse de recapture du calcium cytoplasmique par la SERCA concomitante à une moindre vitesse des mécanismes d'extrusion du Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire dans les CM de VP par rapport aux CM de VG suggère que la charge calcique du RS pourrait être plus importante dans les CM de VP. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que pour un même courant calcique et une vitesse de recapture plus grande par la SERCA, il faut un plus grand nombre de battements pour remplir en calcium le RS à son niveau d'équilibre dans les CM de VP par rapport aux CM de VG. Il est donc envisageable qu'une plus grande charge en Ca^{2+} du RS dans les CM de VP permette une libération calcique plus importante et conduise à un transitoire calcique plus grand dans les CM de VP que dans les CM de VG.

Il est à noter que les résultats que nous avons obtenus dans les CM de VP de rat sont différents de ceux obtenus par Coutu *et al.* chez le chien, et de Jones *et al.* chez le lapin, qui ne montrent pas de différences significatives d'amplitude des transitoires calciques entre les CM de VP et d'OG (Coutu, Chartier, et Nattel 2006; Jones *et al.* 2008). Il semble donc exister une

variabilité interspèce de la dynamique calcique dans les CM de VP par rapport aux CM d'OG. Cette expérience devra donc être reproduite chez l'Homme.

La plus grande variabilité d'amplitude du transitoire calcique dans les CM de VP par rapport aux autres types de CM est donc cohérente avec ce que nous avons montré en microscopie confocale (cf partie « Structure du réseau de tubules transverses et conséquences sur la forme du transitoire calcique dans les CM de VP » page 110). Ces résultats montraient d'une part, que l'amplitude du transitoire calcique était d'autant plus grande que le réseau de tubule était développé et homogène dans les CM de VP, et d'autre part, qu'il existait une très grande hétérogénéité des réseaux de tubules dans ce type de CM. Ainsi, dans la population des CM de VP, la grande variabilité d'organisation des réseaux de tubules transverses conduit à une grande variabilité d'amplitude des transitoires calciques globaux.

Limites de l'étude :

Les résultats obtenus en photométrie calcique permettent seulement d'affirmer que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ pendant le transitoire relativement à la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique est plus grande dans les CM de VP que dans ceux d'OG. Donc, la comparaison des augmentations de la $[Ca^{2+}]_i$ au pic du transitoire entre les trois types de CM n'est valide que pour des $[Ca^{2+}]_i$ diastoliques semblables. La mesure de la longueur des sarcomères au repos identique dans les CM de VP et d'OG soutient ce postulat. Néanmoins, une mesure absolue de cette concentration dans les trois types de CM avec une sonde ratiométrique – le Fura-2 – est en cours pour le confirmer. Chez le lapin, aucune différence de $[Ca^{2+}]_i$ diastolique n'a été constatée entre les CM de VP et d'OG (Jones *et al.* 2008).

b. Caractéristiques de cinétique du transitoire calcique

i. Le temps au pic du transitoire calcique

Le temps au pic retardé dans les CM de VP par rapport aux CM d'OG et de VG peut être expliqué par nos précédents résultats obtenus en microscopie confocale montrant que la majorité des CM de VP présente un transitoire calcique en W. En effet, ce type de transitoire conduit à une augmentation asynchrone de la $[Ca^{2+}]_i$. Dans les zones du cytoplasme se trouvant à distance de la membrane plasmique, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ présente une amplitude importante et est plus tardive que dans celles situées à proximité des tubules, ce qui retarde le temps au pic du transitoire calcique global. Ce n'est pas le cas dans les CM d'OG, qui présentent

principalement des transitoires en U (Mackenzie *et al.* 2001; Kirk *et al.* 2003). Dans ce type de transitoire, le signal calcique est majoritairement restreint à la périphérie de la cellule. Ainsi, la légère augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au centre du CM, bien que plus tardive que celle observée en périphérie, n'a pas une amplitude suffisamment grande pour retarder le temps au pic du transitoire global (Mackenzie *et al.* 2001).

Enfin, dans les CM de VG, le réseau de tubule homogène conduit à une augmentation synchrone de la $[Ca^{2+}]_i$ dans tout le volume du myocyte, le temps au pic est donc également plus court que dans les CM de VP.

ii. Phase de décroissance

La décroissance plus rapide du transitoire dans les CM de VP et d'OG que dans ceux de VG peut être expliquée par le fonctionnement plus lent de la SERCA dans les CM de VG. La vitesse légèrement plus rapide des mécanismes mineurs dans les CM de VG par rapport aux CM de VP ne permet pas de compenser la vitesse de recapture beaucoup plus lente de la SERCA, qui est le mécanisme majoritairement responsable de la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$.

Le fonctionnement plus rapide des SERCA des CM d'OG par rapport aux CM de VG est conforme à ce qui est décrit dans la littérature (Walden, Dibb, et Trafford 2009). Cette différence est expliquée par une plus forte expression de la SERCA et une moindre expression du phospholamban (PLB) dans les CM d'OG, et donc par une moindre inhibition de la SERCA en conditions basales (Walden, Dibb, et Trafford 2009). Nos résultats obtenus avec la technique de *western blot* montrent que le PLB est, comme dans les CM d'OG, plus faiblement exprimé dans les CM de VP que dans ceux de VG. Il est donc probable que cette faible expression du PLB soit également la cause du fonctionnement plus rapide de la SERCA dans les CM de VP que dans les CM de VG. Ces résultats pourraient être complétés par l'étude comparative de l'expression de la SERCA.

Par ailleurs, la vitesse de décroissance du transitoire calcique est plus grande dans les CM de VP que dans les CM d'OG. Cette différence n'est pas due à une recapture plus rapide du calcium par la SERCA, puisque la vitesse de fonctionnement de cette dernière est identique dans les deux types de CM. En revanche, elle peut être expliquée par un fonctionnement plus rapide des mécanismes d'élimination mineurs (NCX, PMCA ± mitochondrie) dans les CM de VP.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Jones *et al.* chez le lapin, qui montrent une décroissance plus lente du transitoire calcique dans les CM de VP que dans ceux d'OG qui serait due en partie à une moindre expression du NCX1.

Nos travaux obtenus chez le rat ne montrent pas de différence d'expression du NCX1 entre les CM de VP et les CM d'OG. L'étude de la position des NCX1 dans les CM de VP a été tentée par immunomarquage, mais les résultats n'ont pas été concluants.

Toutefois, dans les CM de VP, une expression des PMCA plus grande que dans les CM d'OG et plus faible que dans les CM de VG pourrait en partie expliquer ces différences. La quantité de PMCA devra donc être déterminée dans les trois types de CM. De plus, les NCX et les PMCA sont situés dans la membrane plasmique, y compris dans les tubules transverses. Or, dans les CM de VP, le réseau de tubules présente un niveau d'organisation supérieur à celui des CM d'OG et inférieur à celui des CM de VG, il est donc envisageable que l'extrusion calcique par les mécanismes mineurs soit plus homogène et de ce fait plus rapide dans les CM de VP que dans les CM d'OG. À l'inverse, elle serait moins homogène et moins rapide que dans les CM de VG.

Une séquestration calcique plus importante dans les mitochondries pourrait également contribuer à la différence de cinétique OG-VP des mécanismes mineurs. Toutefois, leur contribution dans la phase de diminution du transitoire est généralement considérée comme négligeable puisqu'il a été montré qu'elle était plus de 30 fois moindre que celle du NCX dans les CM ventriculaires chez le lapin (R. A. Bassani, Bassani, et Bers 1992). De plus, un marquage des mitochondries des cardiomyocytes de VP et d'OG observé en microscopie confocale n'a pas montré de différences évidentes de quantité ou de forme de celles-ci (Figure 45).

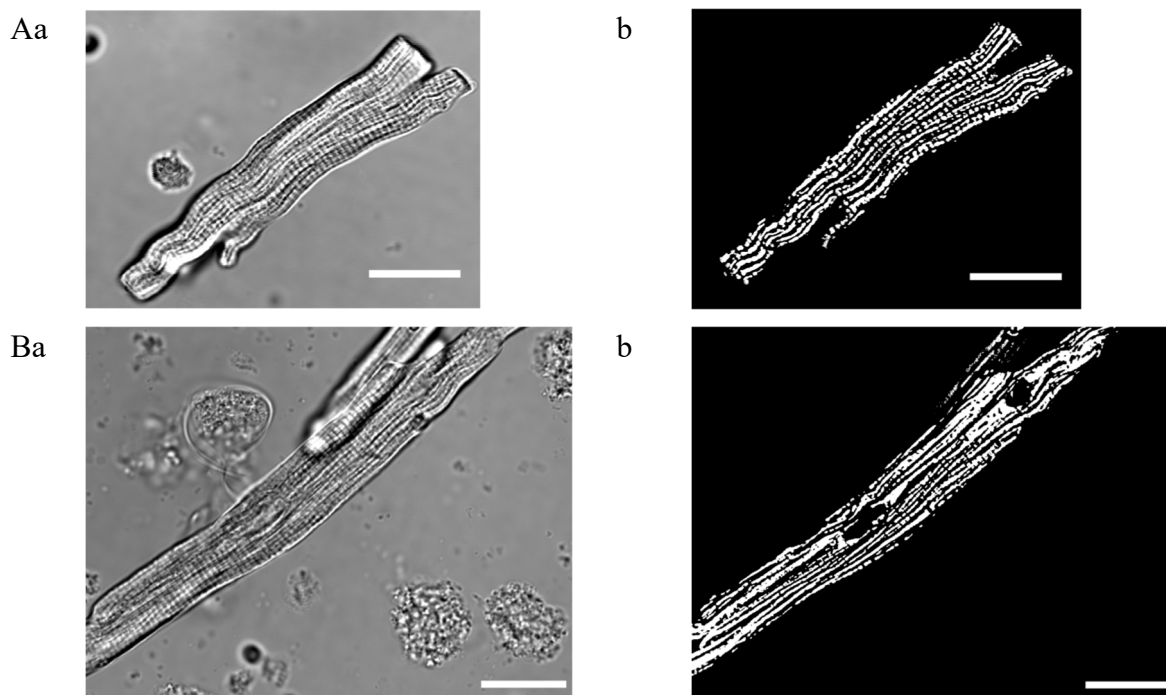


Figure 45 Marquage des mitochondries dans des cardiomyocytes de VP et d'OG vivants. Cardiomyocytes de VP (A) et d'OG (B) observés en microscopie de lumière transmise (Aa et Ba) et marquage de leurs mitochondries observé en microscopie confocale (Ab et Bb)). La sonde utilisée est le MitoTracker® Red CMX Ros (Molecular Probes). Les barres d'échelle représentent 25µm.

c. Effet de la stimulation β -adrénergique sur le transitoire calcique

La concentration de 10 nM d'isoprénaline a été choisie, car elle entraîne une augmentation sub-maximale de l'amplitude du transitoire calcique dans les cardiomyocytes de VG chez le rat (Collins et Rodrigo 2010). Dans les CM de VP, l'amplitude du transitoire calcique, suite à la superfusion de 10 nM d'isoprénaline, augmente de la même façon que dans ceux d'OG. Cette augmentation est toutefois beaucoup moins importante que celle observée dans les CM de VG. Des résultats similaires ont été obtenus chez le chien et chez le rat, suite à la superfusion des CM de VP et d'OG par 1 µM et 10 µM d'isoprénaline (Coutu, Chartier, et Nattel 2006; Smyrnias *et al.* 2010).

De plus, contrairement à ce qui a été observé dans les CM de VG, nous n'avons pas constaté d'augmentation de Tau dans les CM de VP et d'OG. Cela suggère donc qu'à la concentration de 10 nM, l'activation des récepteurs β_1 -adrénergiques n'augmente pas la vitesse de diminution du calcium cytoplasmique dans ces deux types de CM chez le rat. Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Coutu *et al.* chez le chien, qui montrent une augmentation de Tau dans les CM de VP et d'OG en réponse à 1 µM d'isoprénaline. Cette différence pourrait être expliquée entre autres par la plus forte concentration d'isoprénaline

utilisée par ces derniers, ce qui suggérerait plutôt une moindre sensibilité à l'isoprénaline des CM de VP et d'OG par rapport à ceux de VG. Pour valider cette hypothèse, ces expériences devront être reconduites avec des concentrations plus élevées d'isoprénaline.

La diminution de Tau dans le VG est certainement due en grande partie à l'activation par l'isoprénaline de la PKA, qui en phosphorylant le phospholamban (PLB) conduit à une augmentation de l'activité de la SERCA et donc de la recapture du calcium cytoplasmique (Ambudkar et Shamoo 1984). Cette augmentation de la recapture est suffisante pour entraîner un abaissement de la concentration calcique diastolique en présence d'isoprénaline.

Comme le montrent nos résultats, l'expression du PLB est plus faible dans les CM d'OG et de VP que dans ceux de VG. Cela expliquerait pourquoi dans les conditions de base, la vitesse de recapture du calcium par la SERCA est plus rapide dans les CM de VP et d'OG par rapport aux CM de VG, et pourquoi celle-ci n'est pas augmentée en présence d'isoprénaline à la concentration testée dans nos expériences. Ainsi, le fait que la vitesse d'élimination/recapture du calcium dans les CM de VG en présence d'isoprénaline soit très proche de celle des CM de VP et d'OG en présence et en absence d'isoprénaline est cohérent avec le fait que ces 2 derniers types de cardiomyocytes possèdent très peu de PLB.

Contrairement aux autres expériences qui ont été réalisées à 32°C, les expériences portant sur les effets de l'isoprénaline sur le transitoire calcique ont été réalisées à la température de 22°C, pour favoriser la survie des cardiomyocytes isolées qui sont plus sensibles aux effets délétères de l'isoprénaline lorsque la température de travail est plus élevée.

Ainsi, les valeurs moyennes de Tau et de TTP des transitoires calciques observées en conditions contrôles à 22°C (Figure 42-E et F) sont plus grandes que celles obtenues lors de l'étude des transitoires calciques (Figure 39-C et D) à 32°C. Ceci est cohérent avec d'autres études menées sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat montrant un ralentissement de l'entrée et de la sortie du calcium du cytoplasme pendant le transitoire calcique à 22°C par rapport au transitoire calcique à la température physiologique de 37°C (Chung et Campbell 2013). Ces différences seraient dues à une recapture plus lente du calcium cytoplasmique par la SERCA, et à une extrusion également plus lente par le NCX et la PMCA à 22°C (Mackiewicz et Lewartowski 2006; Liu, Belke, et Wang 1997). Toutefois, à 22°C, comme à 32°C, l'extrusion/recapture du calcium est plus lente dans les CM de VG que dans les CM de VP.

d. Potentiel arythmogène des CM de VP

Dans un système à l'équilibre, au cours d'un transitoire calcique, la $[Ca^{2+}]_i$ augmente puis diminue pour retrouver son niveau initial en fin de transitoire. La somme des échanges qui ont eu lieu entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme pendant le cycle est nulle : la quantité de calcium entrée dans le cytoplasme est égale à la quantité de calcium qui en est sortie. Or dans la VP, la quantité de calcium entrant dans le cytoplasme lors d'un transitoire est plus grande que dans l'OG, puisque la densité de courant calcique est plus élevée. Par conséquent, la quantité de calcium qui sort du cytoplasme vers le milieu extracellulaire lors du cycle devrait être également plus grande dans la VP que dans l'OG (Figure 46-A).

Les deux mécanismes responsables de la sortie de calcium des myocytes sont le NCX et la PMCA. La PMCA est un mécanisme de faible capacité, consommateur d'ATP et donc saturable, qui dans les CM d'OG participe beaucoup moins à la phase de décroissance du transitoire calcique que le NCX (Walden, Dibb, et Trafford 2009). Ainsi, la plus grande quantité de calcium qui sort des CM de VP par rapport aux CM d'OG devrait donc être majoritairement éliminé par le NCX, qui est un mécanisme de forte capacité non consommateur d'ATP, et donc non limitant. Comme chaque ion Ca^{2+} qui sort par le NCX induit une dépolarisation membranaire (cf partie « L'élimination du calcium par l'échangeur sodium-calcium » page 40), l'impact de la sortie de calcium sur la polarité membranaire serait donc plus important dans les CM de VP. Ainsi, le fonctionnement plus rapide du NCX dans les CM de VP les rendrait plus sujets à la dépolarisation que les CM d'OG. En effet, un courant I_{ti} plus grand dans les CM de VP pourrait être à l'origine d'une plus grande probabilité de survenue des DAD et donc d'un plus fort potentiel arythmogène de ces CM (Figure 46-B). Par ailleurs, ces DAD auraient une probabilité de survenue d'autant plus grande que les échanges calciques seraient importants, par exemple lors d'une stimulation des récepteurs β -adrénergiques. Pour confirmer cette hypothèse, une comparaison des courants d'échange (I_{NCX}) dans les CM de VP et d'OG est en cours au laboratoire.

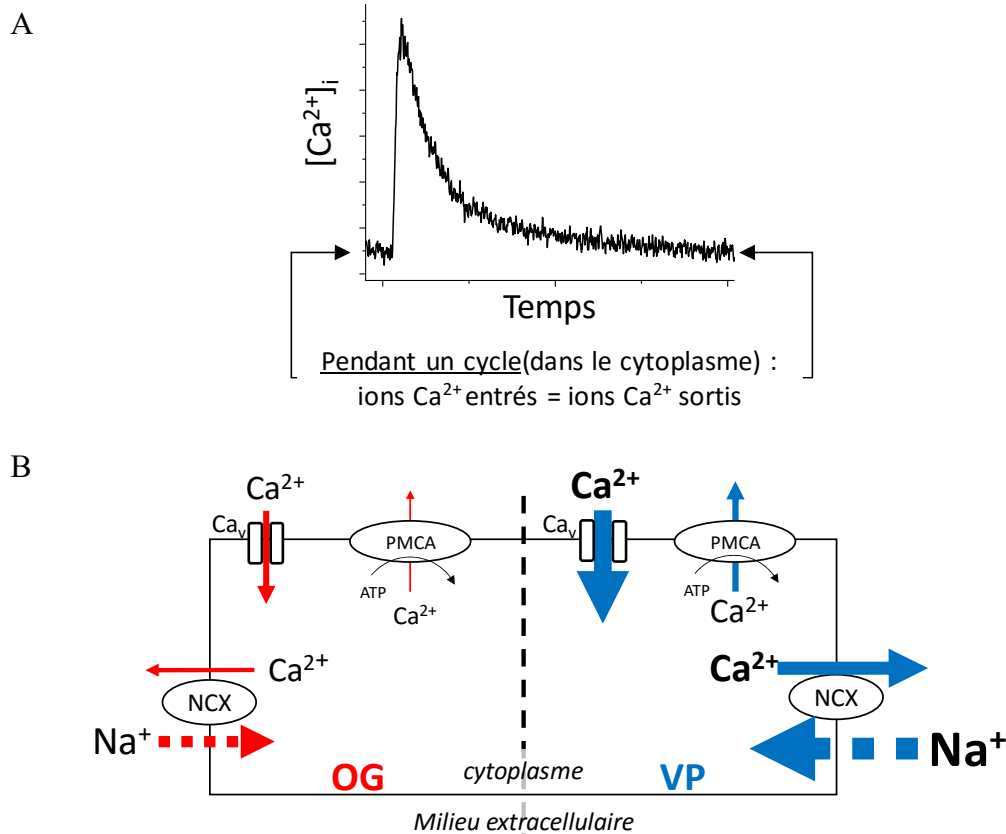


Figure 46 Schéma de comparaison des flux calciques entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme dans les cardiomyocytes d'OG et de VP.

(A) Dans les cardiomyocytes de VP et d'OG, pendant un cycle de transitoire calcique, la quantité de calcium qui entre dans le cytoplasme est égale à la quantité qui en sort. (B) Flux calciques trans-sarcolemmaux dans les cardiomyocytes d'OG et de VP pendant un cycle. La taille des flèches est proportionnelle à l'importance des flux. Ca_v correspond aux canaux calciques voltage-dépendants.

Le courant calcique des CM de VP n'est cependant pas différent de celui des CM de VG, et la part d'extrusion calcique par les mécanismes mineurs est plus importante dans les CM de VG. Le potentiel arythmogène des CM de VG devrait, selon notre hypothèse, être plus important. Toutefois, le fonctionnement des SERCA dans les CM de VG est fortement freiné par le PLB dans les conditions basales. Ainsi, lors d'une stimulation β -adrénergique, la phosphorylation du PLB par les PKA augmente la vitesse de transport du calcium dans le RS par les SERCA. Ce qui permet donc de diminuer l'impact de l'augmentation du courant calcique sur l'augmentation de la sortie de calcium par le NCX dans les CM de VG. Au contraire, dans les CM de VP et d'OG, le fonctionnement des SERCA est d'emblée très rapide, car les niveaux d'expression du PLB sont plus faibles que dans les CM de VG. Si les SERCA des CM de VP ne possèdent que peu de réserve fonctionnelle, comme semble l'indiquer notre étude de l'effet de l'isoprénaline sur le transitoire calcique, l'augmentation du courant calcique

induite par une stimulation β -adrénergique (montré au laboratoire) induira une forte augmentation de la sortie de calcium par le NCX. Le potentiel arythmogène des CM de VP sera donc fortement augmenté. Il serait donc intéressant de comparer l'impact de la sortie de calcium par le NCX sur le potentiel électrique transmembranaire dans des conditions basales et en présence d'un agoniste des récepteurs β_1 -adrénergiques dans les CM de VP et de VG.

e. Effet de la stimulation α_1 -adrénergique sur le transitoire calcique

Dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que la superfusion d'un agoniste sélectif des récepteurs α_1 -adrénergiques, la cirazoline, diminue l'amplitude du transitoire calcique de façon plus importante dans les CM de VP que dans ceux d'OG. Une telle diminution du transitoire calcique est associée à une diminution de l'amplitude de contraction des CM. Ces résultats sont partiellement en accord avec ce qui a été précédemment observé au laboratoire sur des anneaux de VP et d'OG, puisque l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques entraîne un effet inotrope négatif seulement dans les anneaux de VP (Maupoil *et al.* 2007). La diminution de l'amplitude du transitoire calcique des CM de VP et d'OG en réponse à la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques pourrait donc être expliquée par :

1 – l'activation des PKC. Dans les CM ventriculaires de rat, il a été rapporté que l'activation des PKC, qui sont des effecteurs de la voie de signalisation α_1 -adrénergique, conduisait à une diminution de l'amplitude du transitoire calcique qui pourrait être due à une inhibition du courant calcique (Nicolás, Renard-Rooney, et Thomas 1998; Kamp et Hell 2000, 2000). Il est donc probable qu'il en soit de même dans les CM de VP et d'OG. Cette hypothèse est renforcée par des résultats préliminaires du laboratoire montrant qu'un activateur des PKC, le phorbol dibutyrate (500 nM) diminue plus fortement l'amplitude du transitoire calcique dans les CM de VP que dans les CM d'OG. Des expériences complémentaires sont actuellement en cours pour déterminer si ces deux mécanismes contribuent effectivement à la diminution de l'amplitude du transitoire calcique.

2 – une dépolarisation membranaire plus importante dans les CM de VP que dans ceux d'OG. La stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques induit une forte dépolarisation membranaire qui est plus importante dans les CM de VP que dans les CM d'OG comme montré dans les tissus de VP et d'OG non stimulés. En effet, dans ces tissus, la cirazoline diminue la polarité membranaire jusqu'à environ -30 mV pour les CM de VP et n'est presque pas modifiée (\sim -80 mV) pour les CM d'OG (Doisne *et al.* 2009). À ces valeurs de potentiel dans les CM de VP, le courant calcique est inactivé à environ 10 % et le courant sodique est entièrement inactivé. Au contraire, dans les CM d'OG, au potentiel de -80 mV, le courant calcique n'est pas

inactivé (Malécot, Pasqualin, et Maupoil 2016) et le courant sodique n'est inactivé qu'à environ 70 % (Malécot *et al.* 2015). Ainsi, l'amplitude du pic potentiel d'action est beaucoup plus réduite par la stimulation des récepteur α_1 -adrénergiques dans les CM de VP que dans les CM d'OG (Résultats non publiés obtenus au laboratoire), et peut donc conduire à une moindre activation du courant calcique – le pic du courant I_{Ca} étant observé pour des valeurs de potentiel voisin de +15 mV (Malécot, Pasqualin, et Maupoil 2016).

Limites de l'étude :

Il doit également être noté que le délai d'obtention de l'effet maximum de la cirazoline est de l'ordre de 15 à 20 min, ce qui est très long pour des expériences de fluorescence calcique sur cellules vivantes maintenues à 32°C. Des enregistrements contrôles de 20 min, réalisés sur des CM de VP et d'OG sans perfusion de cirazoline ont montré qu'il y avait une élimination ou une dégradation spontanée du Fluo-4, qui est variable d'une cellule à l'autre. Bien que la diminution spontanée de l'amplitude du transitoire calcique soit faible (<10 % en 20 min) par rapport à celle induite par la cirazoline, une estimation précise de cette diminution est impossible.

E. Étude de l'effet de facteurs arythmogènes sur les *sparks* calciques spontanés dans les CM de VP et d'OG

1. Introduction et objectifs

Les *sparks* spontanés sont des libérations calciques du réticulum sarcoplasmique par les RyR2, qui ne sont pas déclenchées par une entrée de calcium par les canaux calciques. Une importante fréquence de survenue des *sparks* dans les CM est un facteur prédisposant l'apparition de « *waves* » calciques par activation de proche en proche des RyR2 qui elles-mêmes sont capables d'engendrer des dépolarisations membranaires de type DAD (cf partie « Les post-dépolarisations tardives (DAD) » page 46).

L'objectif de cette partie était d'analyser la fréquence de survenue des *sparks* et leurs caractéristiques spatiotemporelles dans les CM de VP et d'OG en conditions basales, puisque la fréquence de survenue des *waves* est plus grande dans les CM de VP que dans ceux d'OG. Ces études ont ensuite été réalisées sur des CM isolés de rats présentant des facteurs de risque de fibrillation atriale (âge et hypertension artérielle) ou sur des CM incubés avec de la noradrénaline, substance qui déclenche les activités automatiques catécholaminergiques au sein des lambeaux de VP.

2. Résultats

a. Comparaison des *sparks* des CM de VP et d'OG en conditions basales

Les *sparks* ont été enregistrés en microscopie confocale à la fréquence d'échantillonnage de 500 Hz sur des cardiomyocytes quiescents sélectionnés selon des critères observés en microscopie de lumière transmise (cf partie « Enregistrement et analyse des événements calciques spontanés » page 97).

Les *sparks* ont tout d'abord été enregistrés dans des CM de VP et d'OG issus de rats âgés de 3 mois (Figure 47).

La fréquence des *sparks* est plus grande dans les CM isolés de VP que dans ceux d'OG ($15,7 \pm 0,7 \text{ sparks} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ vs $10,9 \pm 0,7 \text{ sparks} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $p < 0,001$) (Figure 47-A et C).

En conditions basales, certaines caractéristiques des *sparks* diffèrent entre les CM de VP et les CM d'OG. Le temps au pic moyen (TTP, pour *time to peak*) est plus court dans les CM de VP que dans ceux d'OG (Figure 47-E). En revanche, la FWHM, qui caractérise l'étalement spatial, y est plus grande (Figure 47-G). Cependant, les différences constatées sont minimes.

Les autres caractéristiques (amplitude, constante de décroissance Tau et FDHM) sont similaires.

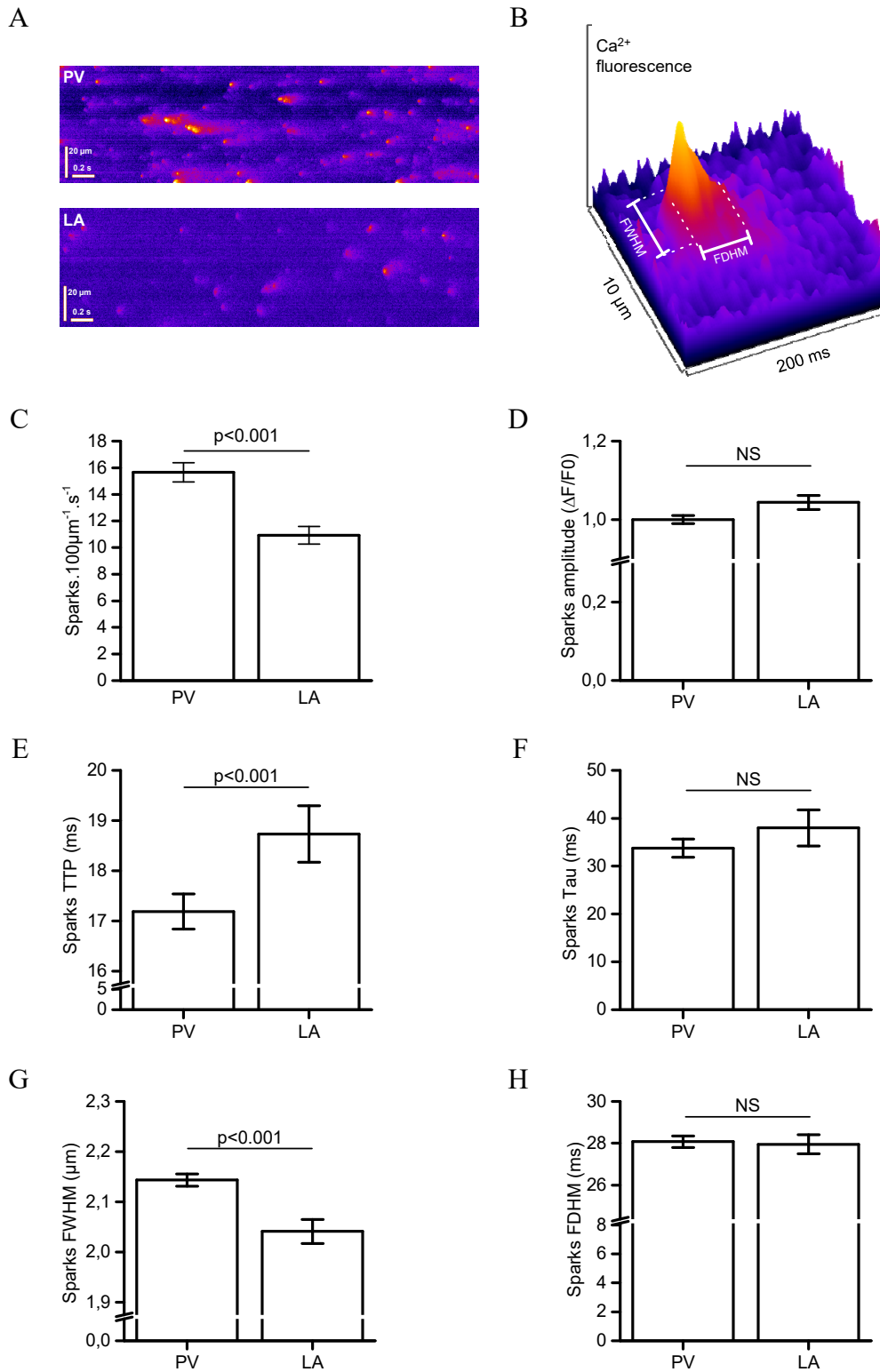


Figure 47 Sparks des CM de VP et d'OG.

A : Exemple représentatif d'enregistrement des *sparks* en microscopie confocale en mode « linescan ». **B :** Illustration en pseudo-3D et fausses couleurs d'une *spark* d'un CM de VP. Plus la couleur est chaude, plus la concentration calcique est élevée. Les segments blancs indiquent ce que représentent les valeurs de FWHM et FDHM ; **C, D, E, F, G et H** représentent respectivement les moyennes \pm SEM de la fréquence, de l'amplitude, du temps au pic, de la constante de décroissance, de la largeur à 50 % du pic et de la durée à 50 % du pic des *sparks* dans les CM de VP et d'OG. $n_{\text{rats}} = 3$ (VP), 3 (OG) ; $n_{\text{CM}} = 90$ (VP), 76 (OG) ; $n_{\text{sparks}} = 4005$ (VP), 1760 (OG).

b. Effet de la noradrénaline sur les *sparks* des CM de VP et d'OG chez les rats âgés de trois mois

La noradrénaline (NA) à la concentration de 1 μM ne modifie pas la fréquence de survenue des *sparks*, ni dans les CM de VP, ni dans ceux d'OG. Les *sparks* sont donc toujours plus nombreux dans les CM de VP que dans ceux d'OG (Figure 48-A).

Toutefois, la noradrénaline modifie certaines caractéristiques des *sparks* des CM de chaque tissu (Figure 48). Dans les CM de VP, la noradrénaline entraîne une diminution de l'ensemble des caractéristiques des *sparks* qui ont été étudiées : amplitude, TTP, constante de décroissance Tau, FWHM et FDHM. En revanche, dans les CM d'OG, la noradrénaline diminue seulement la FWHM et la FDHM (Figure 48-E et F).

En présence de NA, comme en conditions basales, l'étalement spatial des *sparks* des CM de VP est plus important que ceux des CM d'OG (Figure 48-E). En revanche, l'amplitude, le TTP, Tau et la FDHM des *sparks* des CM de VP sont inférieurs à ceux des CM d'OG (Figure 48-C, D et F). Les *sparks* des CM de VP persistent donc moins longtemps que ceux des CM d'OG dans le cytoplasme de ces cellules.

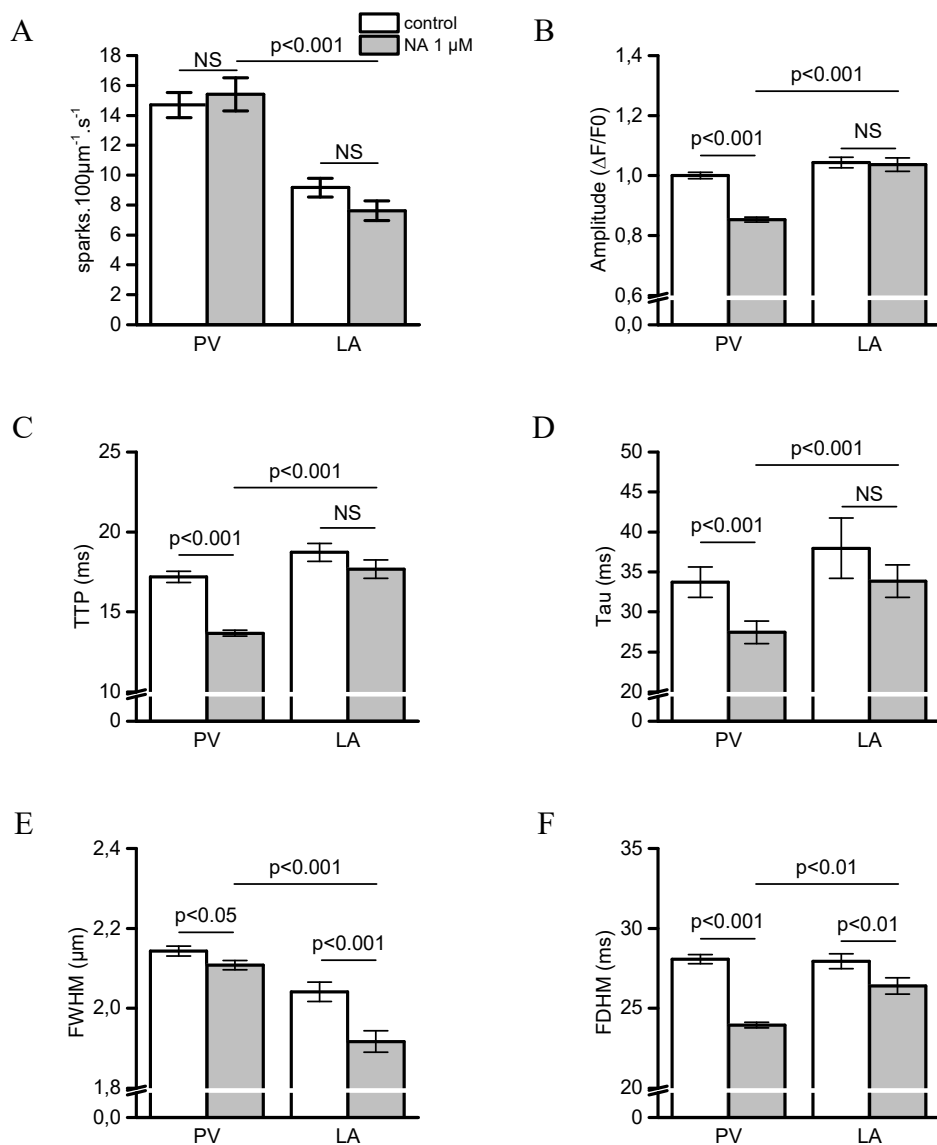


Figure 48 Effet de la noradrénaline sur les *sparks* des CM de VP et d'OG chez les rats de 3 mois.

A, B, C, D, E et F représentent respectivement les moyennes \pm SEM de la fréquence, l'amplitude, le temps au pic, la constante de décroissance (Tau), la largeur à 50 % du pic (FWHM) et la durée à 50 % du pic (FDHM) des *sparks* dans les CM de VP et d'OG en conditions basales et en présence de 1 μ M de noradrénaline. En conditions basales : n_{rats} = 3 (VP), 3 (OG) ; n_{CM} = 90 (VP), 76 (OG) ; n_{sparks} = 4005 (VP), 1760 (OG) ; en présence de noradrénaline 1 μ M : n_{rats} = 3 (VP), 3 (OG) ; n_{CM} = 90 (VP), 63 (OG) ; n_{sparks} = 4679 (VP), 1265 (OG).

c. Effet de l'âge sur les *sparks* des CM de VP et d'OG

Les *sparks* des CM de VP et d'OG issus de trois rats Wistar de 3 mois ont ensuite été comparés à ceux de CM de VP et d'OG issus de trois rats âgés de 10 mois. Pour chaque catégorie (rats de 3 mois et rats de 10 mois), les CM de VP et d'OG comparés provenaient des mêmes rats.

D'une part, la fréquence de survenue des *sparks* dans les CM de VP est moins élevée chez les rats âgés de 10 mois que chez les rats âgés de 3 mois. Elle est cependant identique dans les CM d'OG quel que soit l'âge du rat. Chez les rats de 10 mois, comme chez les rats de 3 mois, la fréquence des *sparks* reste cependant plus grande dans les CM de VP que dans les CM d'OG (Figure 49-A).

D'autre part, les caractéristiques des *sparks* des CM des deux tissus diffèrent entre les rats âgés de 3 mois et ceux âgés de 10 mois.

Dans les CM de VP, les rats de 10 mois présentent des *sparks* dont le TTP, Tau et la FDHM sont plus grands que chez les rats de 3 mois (Figure 49-C, D et F). L'amplitude des *sparks*, en revanche, y est moins élevée (Figure 49-B). Quant à la FWHM, elle est identique chez les rats de 10 et de 3 mois (Figure 49-E). Cela semble indiquer une plus grande persistance des *sparks* dans le cytoplasme des CM de rats âgés de 10 mois.

Dans les CM d'OG, les *sparks* survenant dans les CM des rats âgés de 10 mois présentent des valeurs de Tau, de FWHM et de FDHM plus grandes que celles des *sparks* des CM des rats âgés de 3 mois (Figure 49-D, E et F). Cependant, ils ont une amplitude et un TTP identiques (Figure 49-B et C).

Par ailleurs, chez les rats âgés de 10 mois, les *sparks* des CM de VP ont une amplitude moins élevée et une FWHM plus importante que ceux des CM d'OG (Figure 49-B et E). Le TTP, Tau et la FDHM sont identiques dans les CM de ces deux tissus (Figure 49-C, D et F).

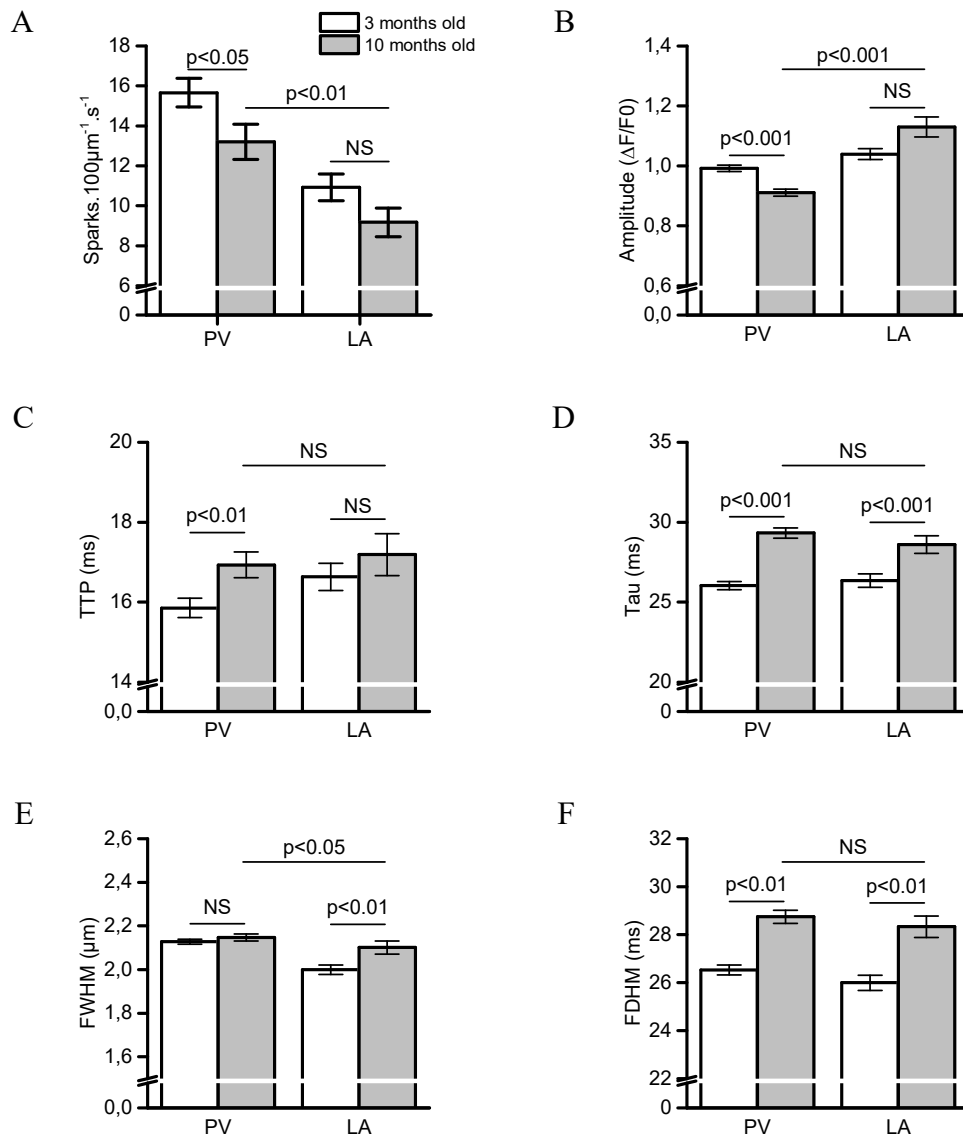


Figure 49 Effet de l'âge sur les *sparks* des CM de VP et d'OG.

A, B, C, D, E et F représentent respectivement les moyennes \pm SEM de la fréquence, l'amplitude, le temps au pic, la constante de décroissance (Tau), la largeur à 50 % du pic (FWHM) et la durée à 50 % du pic (FDHM) des *sparks* dans les CM de VP et d'OG chez le rat âgé de 3 mois et chez le rat âgé de 10 mois. Rats de 3 mois : $n_{\text{rats}} = 3$ (VP), 3 (OG) ; $n_{\text{CM}} = 90$ (VP), 76 (OG) ; $n_{\text{sparks}} = 3863$ (VP), 1668 (OG) ; rats de 10 mois : $n_{\text{rats}} = 3$ (VP), 2 (OG) ; $n_{\text{CM}} = 79$ (VP), 39 (OG) ; $n_{\text{sparks}} = 2863$ (VP), 974 (OG).

d. Effet de l'hypertension artérielle sur les *sparks* des CM de VP et d'OG

L'effet de l'hypertension artérielle (HTA) a ensuite été étudié chez des rats SHR âgés de 15 mois. Des rats Wistar Kyoto (WKY) du même âge ont été utilisés comme contrôles. Pour chaque catégorie (rats SHR et rats WKY), les CM de VP et d'OG comparés provenaient des mêmes rats.

La fréquence de survenue des *sparks* n'est pas affectée par l'HTA, ni dans les CM de VP ni dans ceux d'OG. En effet, dans les CM des deux tissus, la fréquence est identique chez les rats SHR et chez les rats WKY. D'autre part, comme chez les rats Wistar, celle-ci est plus élevée dans les CM de VP que dans les CM d'OG.

Par ailleurs, les caractéristiques des *sparks* des CM des deux tissus diffèrent entre les rats SHR et les rats WKY.

Les CM de VP des rats SHR présentent des *sparks* dont l'amplitude, Tau et la FDHM sont plus petits que ceux des *sparks* de CM de rats WKY (Figure 50-B, D, et F), à l'inverse de la FWHM qui y est plus grande (Figure 50-E). Le TTP est identique dans les deux populations de CM (Figure 50-C).

Dans les CM d'OG, les *sparks* survenant dans les CM des rats SHR ont une amplitude et une FWHM plus grandes (Figure 50-B et E) mais un Tau plus petit que les *sparks* des CM des rats WKY (Figure 50-D). Le TTP et la FDHM sont identiques dans les deux populations de CM (Figure 50-C et F).

Par ailleurs, chez les rats WKY, les *sparks* des CM de VP ont une amplitude, une valeur de Tau, de FWHM et de FDHM plus grandes que celles des *sparks* des CM d'OG (Figure 50-B, D, E et F). Le TTP est identique dans les *sparks* des CM des deux tissus (Figure 50-C).

Chez les rats SHR, les *sparks* des CM de VP présentent un TTP, une valeur de Tau, de FWHM et de FDHM plus grands que dans les *sparks* des CM d'OG (Figure 50-C, D, E et F). En revanche, l'amplitude est la même pour les *sparks* des CM des deux tissus (Figure 50-B).

Ceci suggère une plus grande persistance et un étalement spatial des *sparks* plus important dans les CM de VP que dans les CM d'OG, à la fois chez les rats WKY et chez les rats SHR. Cependant, l'impact de l'HTA sur les caractéristiques des *sparks* des CM de VP et d'OG est difficilement interprétable puisque l'amplitude, Tau, la FWHM et la FDHM peuvent varier en sens opposés dans ces deux types de CM (Figure 50-C à F). Toutefois, pour ces deux types de CM, il semble que l'HTA diminue la persistance des *sparks* dans leur cytoplasme, mais augmente leur étalement spatial.

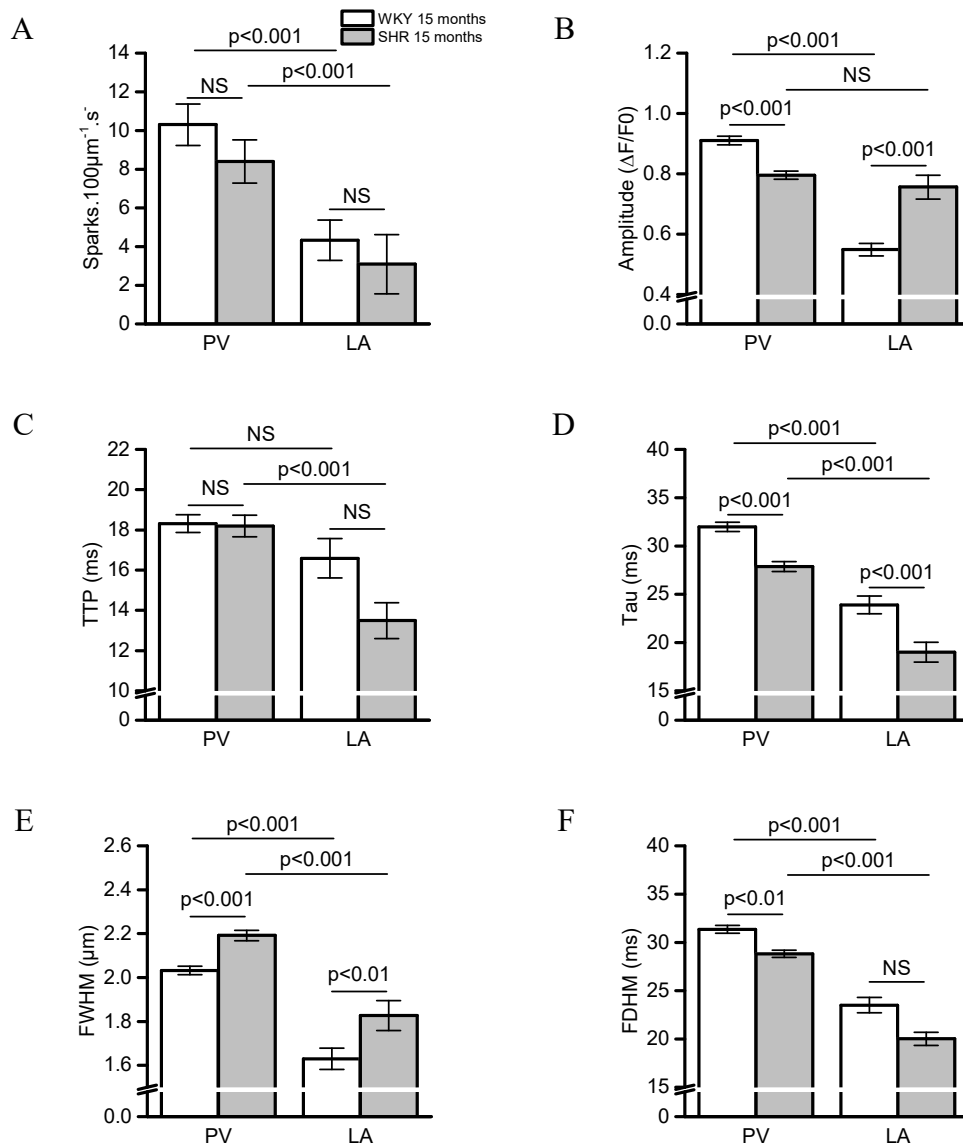


Figure 50 Effet de l'hypertension artérielle sur les *sparks* des CM de VP et d'OG. A, B, C, D, E et F représentent respectivement les moyennes ± SEM de la fréquence, l'amplitude, le temps au pic, la constante de décroissance (Tau), la largeur à 50 % du pic (FWHM) et la durée à 50 % du pic (FDHM) des *sparks* dans les CM de VP et d'OG chez le rat WKY et chez le rat SHR. Rats WKY : n_{rats} = 2 (VP), 2 (OG) ; n_{CM} = 35 (VP), 55 (OG) ; n_{sparks} = 1688 (VP), 293 (OG); rats SHR : n_{rats} = 2 (VP), 2 (OG) ; n_{CM} = 41 (VP), 14 (OG) ; n_{sparks} = 1163 (VP), 118 (OG).

3. Discussion

a. Généralités

La fréquence et les caractéristiques des *sparks* présentent une grande variabilité inter-cardiomyocytes et inter-rats. Ce travail a donc nécessité l'étude d'un grand nombre de *sparks* (plusieurs milliers) issus d'un grand nombre de CM (plusieurs dizaines) provenant de plusieurs rats, pour limiter le risque de biais.

Le constat majeur de cette étude est la plus grande fréquence des *sparks* dans les CM de VP que dans les CM d'OG quelles que soient les conditions expérimentales (présence ou absence de noradrénaline), l'âge (3 mois, 10 mois, 15 mois) et la présence ou non d'une hypertension. Ceci pourrait expliquer la plus grande fréquence des *waves* calciques dans les CM de VP et donc constituer une des explications du potentiel arythmogène plus important de ces CM.

Une plus grande quantité ou une plus forte probabilité d'ouverture des RyR2 pourrait expliquer cette plus grande fréquence des *sparks* dans les CM de VP. Toutefois, comme nos résultats de biologie moléculaire ne montrent pas plus de RyR2 dans les CM de VP que dans les CM d'OG, il semble que ce soit leur probabilité d'ouverture qui soit augmentée.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette plus grande probabilité d'ouverture des RyR2 :

– un meilleur couplage spatial entre RyR2 et Cav1.2. Cette première hypothèse est fondée sur l'étude de ces canaux en microscopie confocale dans les CM de VP ;

– une charge calcique du réticulum sarcoplasmique plus importante dans les CM de VP ;

– une membrane plasmique moins polarisée (Sato *et al.* 2014). Au repos, le potentiel membranaire des CM de VP est moins négatif que celui des CM d'OG, car la membrane des CM de VP tend à se dépolariser lorsqu'ils ne sont pas stimulés (Doisne *et al.* 2009) ;

– une $[Ca^{2+}]_i$ diastolique plus élevée dans les CM de VP ;

– un niveau d'expression de la calstabile-2 moins élevé dans les CM de VP (Lehnart, Wehrens, et Marks 2004).

b. Effet de la noradrénaline

La noradrénaline induit l'apparition d'une activité automatique uniquement dans les VP isolées. Nous avons donc étudié l'effet de cette substance sur les *sparks* des CM de VP et d'OG des rats de 3 mois.

La noradrénaline n'augmente pas la fréquence de survenue des *sparks* dans les CM de VP et d'OG, et a peu d'effet sur leurs caractéristiques. Or, dans les CM de VG, il a été montré que la stimulation des récepteurs β -adrénergiques augmente la charge calcique du RS (Shannon, Guo, et Bers 2003) et active la protéine kinase A, qui phosphoryle le RyR2 induisant ainsi la

dissociation de la calstabile-2 (Marx *et al.* 2000). Ces deux actions sont synergiques et conduisent à l'augmentation de la fréquence de survenue des *sparks* dans les CM ventriculaires (Sato, Blatter, et Bers 1997). Certains travaux suggèrent qu'il en est de même dans les CM atriaux chez le cobaye (Collins *et al.* 2011)

Toutefois, cette augmentation de la fréquence des *sparks* suite à une stimulation des récepteurs β -adrénergique n'est pas retrouvée dans toutes les études réalisées sur les CM ventriculaires. En effet, dans certains cas, l'apparition de *waves* pourrait limiter l'augmentation de la charge du réticulum sarcoplasmique et ainsi la fréquence des *sparks* (Brette *et al.* 2005).

L'effet de la stimulation des récepteurs α -adrénergiques sur la fréquence des *sparks* a été peu étudié. Une étude semble indiquer que celle-ci augmente la fréquence des *sparks* dans les CM ventriculaires en culture issus de rats néonataux (Luo *et al.* 2006). Il est donc possible que la stimulation conjointe des récepteurs α - et β -adrénergiques dans les CM de VP et d'OG, en augmentant la fréquence des *waves*, limite également l'augmentation de la fréquence des *sparks*.

Dans tous les cas, chez le rat, les faibles modifications des caractéristiques des *sparks* induites par la noradrénaline conduisent à une réduction de leur étalement spatial et de leur persistance cytoplasmique.

c. Effet de l'âge

L'âge augmente la fréquence de survenue des *sparks* spontanés et réduit leur durée dans les CM ventriculaires chez la souris, mais son effet dans les CM d'OG et de VP n'a jamais été étudié (Howlett, Grandy, et Ferrier 2006). Or, l'âge est l'un des principaux facteurs de risque de FA. Nous avons donc comparé les *sparks* des CM de VP et d'OG des rats âgés de 3 mois à ceux des rats âgés de 10 mois.

L'âge ne semble pas augmenter la fréquence des *sparks* dans les CM de VP. Cependant, l'augmentation, bien que modeste de la persistance des *sparks* spontanés dans le cytoplasme des CM des rats âgés de 10 mois pourrait contribuer à l'augmentation de la probabilité d'apparition de *waves* dans les CM de VP de ces animaux. La reproduction de cette expérience chez des rats encore plus âgés pourrait être envisagée, pour savoir si ce phénomène s'amplifie avec le vieillissement.

d. Effet de l'hypertension

Une augmentation de l'amplitude des *sparks* a été décrite dans les CM ventriculaires des rats SHR âgés de 6 mois par rapport aux CM ventriculaires de rats WKY du même âge (Shorofsky *et al.* 1999). Au contraire, une autre étude menée chez des rats SHR et WKY de 4 mois montre que les *sparks* des CM de ventricule de rats SHR ont une amplitude plus faible que les *sparks* des CM de ventricule des rats contrôles. Cette étude montre également des valeurs de FWHM, de TTP et de Tau plus faibles des *sparks* des CM de rats hypertendus par rapport aux *sparks* des CM de rats contrôles. En revanche, la fréquence des *sparks* serait plus importante dans les CM ventriculaires des rats SHR (Carneiro-Júnior *et al.* 2014).

Dans les CM d'OG, l'amplitude des *sparks* est augmentée chez les rats SHR de 15 mois, ce qui semble témoigner d'une augmentation de leur arythmogénicité. Ceci n'est pas retrouvé dans les CM de VP pour lesquels l'impact de l'HTA est faible. Toutefois, comme avec l'âge, les différences de caractéristiques des *sparks* associées à l'hypertension artérielle sont faibles leurs contributions effectives à l'arythmogénicité restent à prouver.

e. Limites et perspectives

L'examen des *sparks* est une première étape dans l'étude du caractère arythmogène des CM induit par des libérations calciques spontanées. Malheureusement, la difficulté d'obtention de CM de VP isolés chez les rats âgés et SHR n'a pas permis d'approfondir ce travail dans le temps imparti. Il devra donc être poursuivi par l'analyse du potentiel arythmogène des *sparks* des CM de VP en présence de facteurs de risque de FA, en particulier par la détermination de la probabilité de survenue de *waves* calciques et de leur impact sur le potentiel électrique transmembranaire (*calcium-voltage coupling gain*). Nos résultats ainsi que les travaux d'Okamoto *et al.* suggérant la présence de NCX dans les tubules transverses des CM de VP indiquent que la probabilité de survenue d'un *spark* à proximité d'un NCX est plus grande dans les CM de VP (Okamoto *et al.* 2012). Une dépolarisation membranaire induite par les *sparks* serait donc plus probable dans les CM de VP que dans ceux d'OG.

Par ailleurs, les effets de la noradrénaline sur les *sparks* des CM de rats âgés de 15 mois et des rats hypertendus devront aussi être examinés. Des travaux sur des rats SHR plus jeunes devront également être réalisés pour discriminer l'effet de l'hypertension et l'effet de l'âge.

II. Caractérisation de la contractilité des CM de VP

A. Développement d'un outil de mesure de la contractilité des cardiomyocytes de veine pulmonaire, d'oreillette gauche et de ventricule gauche

1. Introduction et objectifs

La fonction primaire des cardiomyocytes est la contraction. La mesure de la contractilité des CM isolés de VP permet d'évaluer l'impact des oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ sur la réponse mécanique de ces cellules mais également d'évaluer de manière semi-quantitative l'amplitude des variations du calcium cytoplasmique, en utilisant les protéines contractiles comme « *calcium-sensor* ». Ceci permet d'éviter l'utilisation de sondes fluorescentes qui imposent généralement l'incubation des cellules avec une forte concentration de diméthylsulfoxyde (DMSO), qui présente une certaine toxicité pour les cardiomyocytes.

Deux techniques sont classiquement utilisées pour évaluer la contractilité des CM : la mesure du pourcentage de raccourcissement de la cellule et la mesure du raccourcissement de leurs sarcomères. La première méthode consiste à détecter et à mesurer le pourcentage de rapprochement des deux extrémités du CM en vidéo-microscopie. La détection des extrémités des CM ventriculaires est aisée du fait de leur forme rectangulaire. En revanche, les CM de VP et d'OG ont de multiples formes qui sont plus ou moins allongées et rarement rectangulaires, ce qui rend la détection des extrémités complexe et aléatoire. Cette première méthode était donc inappropriée pour notre étude. Au contraire la méthode de mesure du raccourcissement des sarcomères était tout à fait adaptée, puisque les CM de VP et d'OG présentent comme les CM de VG une alternance de bandes isotropes et anisotropes formées par les filaments d'actine et de myosine, bien visibles en microscopie en lumière transmise. Cette méthode permet de s'affranchir de la taille et de la forme des CM et de réaliser une mesure absolue de la taille des unités contractiles élémentaires des CM. Elle offre donc une meilleure précision et reproductibilité que la première méthode (Gannier *et al.* 1993).

Peu de systèmes commerciaux sont disponibles pour réaliser ce type de mesure, et ils sont très onéreux. En outre, les contraintes techniques qu'ils imposent aux utilisateurs, et pour certains, leur fiabilité médiocre ont conduit certains industriels (*e.g.* World Precision Instruments) à stopper leur commercialisation.

L'analyse de la contractilité des CM de VP a donc nécessité le développement d'un système robuste plus souple et plus performant que les systèmes commerciaux basés sur l'algorithme originel de mesure des sarcomères dans les CM ventriculaire proposé par Gannier *et al.* (1993).

2. Résultats

Ce travail a fait l'objet d'une publication :

SarcOptiM for ImageJ: high-frequency online sarcomere length computing on stimulated cardiomyocytes. – Pasqualin C, Gannier F, Yu A, Malécot CO, Bredeloux P, Maupoil V. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 311: C277–C283, 2016.

SarcOptiM for ImageJ: high-frequency online sarcomere length computing on stimulated cardiomyocytes

Côme Pasqualin, François Gannier, Angèle Yu, Claire O. Malécot, Pierre Bredeloux, and Véronique Maupoil

CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Equipe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Tours, France

Submitted 5 April 2016; accepted in final form 20 June 2016

Pasqualin C, Gannier F, Yu A, Malécot CO, Bredeloux P, Maupoil V. SarcOptiM for ImageJ: high-frequency online sarcomere length computing on stimulated cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 311: C277–C283, 2016. First published June 22, 2016; doi:10.1152/ajpcell.00094.2016.—Accurate measurement of cardiomyocyte contraction is a critical issue for scientists working on cardiac physiology and pathophysiology of diseases implying contraction impairment. Cardiomyocytes contraction can be quantified by measuring sarcomere length, but few tools are available for this, and none is freely distributed. We developed a plug-in (SarcOptiM) for the ImageJ/Fiji image analysis platform developed by the National Institutes of Health. SarcOptiM computes sarcomere length via fast Fourier transform analysis of video frames captured or displayed in ImageJ and thus is not tied to a dedicated video camera. It can work in real time or offline, the latter overcoming rotating motion or displacement-related artifacts. SarcOptiM includes a simulator and video generator of cardiomyocyte contraction. Acquisition parameters, such as pixel size and camera frame rate, were tested with both experimental recordings of rat ventricular cardiomyocytes and synthetic videos. It is freely distributed, and its source code is available. It works under Windows, Mac, or Linux operating systems. The camera speed is the limiting factor, since the algorithm can compute online sarcomere shortening at frame rates >10 kHz. In conclusion, SarcOptiM is a free and validated user-friendly tool for studying cardiomyocyte contraction in all species, including human.

cardiomyocyte contractility; sarcomere dynamic; video analysis; ImageJ plug-in; fast Fourier transform

ISOLATED CARDIOMYOCYTE (CM) contractions can be recorded and measured with two main methods: cell shortening and sarcomere shortening. The latter is probably the most common and reliable technique used to characterize isolated CM contractile performance, because it does not depend on cell shape and size (4). Sarcomere shortening technique has applications in different research fields, including cardiovascular physiology, pathophysiology such as heart failure, pharmacology, and toxicology (2, 3, 6–8, 11).

Under transmission light microscopy, striated muscle cell sarcomeres show a transverse pattern due to the alternation of light (isotropic; I) and dark (anisotropic; A) bands, corresponding to the very regular organization of thin filaments of actin associated with regulatory proteins, such as tropomyosin and troponin (I band) and thick filaments of myosin (A band). These bands have a profile that can be assimilated to a sinusoidal curve. The frequency of this sinusoid, which repre-

sents the distance between the dark bands of the myosin filaments and, therefore, the sarcomere length (SL), can be extracted from Fourier spectrum analysis of the CM image. The sarcomere shortening method consists of computing the sarcomere spatial frequency and thus SL in each frame of a live or recorded video of a contracting CM. There are commercially available software for the analysis of SL and SL shortening, but they are tied to dedicated video cameras and microscope systems (e.g., IonOptix and Aurora Scientific). Several laboratories have developed their own software, but under licensed languages such as LabVIEW (1, 5) or MATLAB (8, 10).

An open-source algorithm has also been developed in Python to compute SL (9). However, it is not implemented in a program and requires users to develop their own software to interface their camera with the analysis algorithm. This unfortunately makes that software very difficult to use by people without programming skills.

The aim of our work was to provide scientists working on CM, or any other structure presenting a striated pattern (e.g., transverse tubules, ryanodine receptors distribution, collagen structure, etc.), with powerful, ultrafast, and accurate software compatible with most of the video cameras and finally not affected by cell displacement and rotation in the field. Moreover, this software has to be easy and ready to use, free, and open source. Thus we developed SarcOptiM, a plug-in for the open-source microscopy image analysis software of the National Institutes of Health: ImageJ. It has two operating modes. Online mode allows the real-time analysis and display of the contraction of a cell along a line (1 pixel thick or more) drawn along its longitudinal axis (i.e., *on cell axis* mode). Offline mode is dedicated to the analysis of prerecorded videos of contracting CM. This mode can be used in two ways: *on cell axis* mode, as above, or *on entire frame*, which extracts data from the entire video image. SL measurements with the *on entire frame* mode avoid artifacts due to rotation and/or movement of the cell.

SarcOptiM has been validated and packaged with a number of control features, including a means of constructing synthetic videos of a model cell contracting, according to user-defined parameters.

SarcOptiM has been tested under Linux, Windows, and Mac OS. It is freely available in the plug-in section of ImageJ website and on <http://pccv.univ-tours.fr/ImageJ/SarcOptiM/>.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of rat ventricular CMs. All protocols have been approved by the local ethical committee (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire, Tours, France). Adult male Wistar rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg). The heart was rapidly

Address for reprint requests and other correspondence: C. Pasqualin, Laboratoire CNRS ERL 7368, STIM, Equipe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, UFR des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France (e-mail: come.pasqualin@univ-tours.fr).

removed, and coronary circulation was retrogradely perfused through the aorta. Enzymatic digestion was performed by perfusion of 0.1 UI/ml Liberase Research Grade in Krebs-Ringer-bicarbonate solution (in mM: 35 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.75 KCl, 1.19 KH₂PO₄, 16 Na₂HPO₄, 134 sucrose, 10 HEPES, and 10 glucose, pH adjusted to 7.4) at 37°C. At the end of the digestion, ventricles were separated and gently mechanically dissociated with Pasteur pipettes.

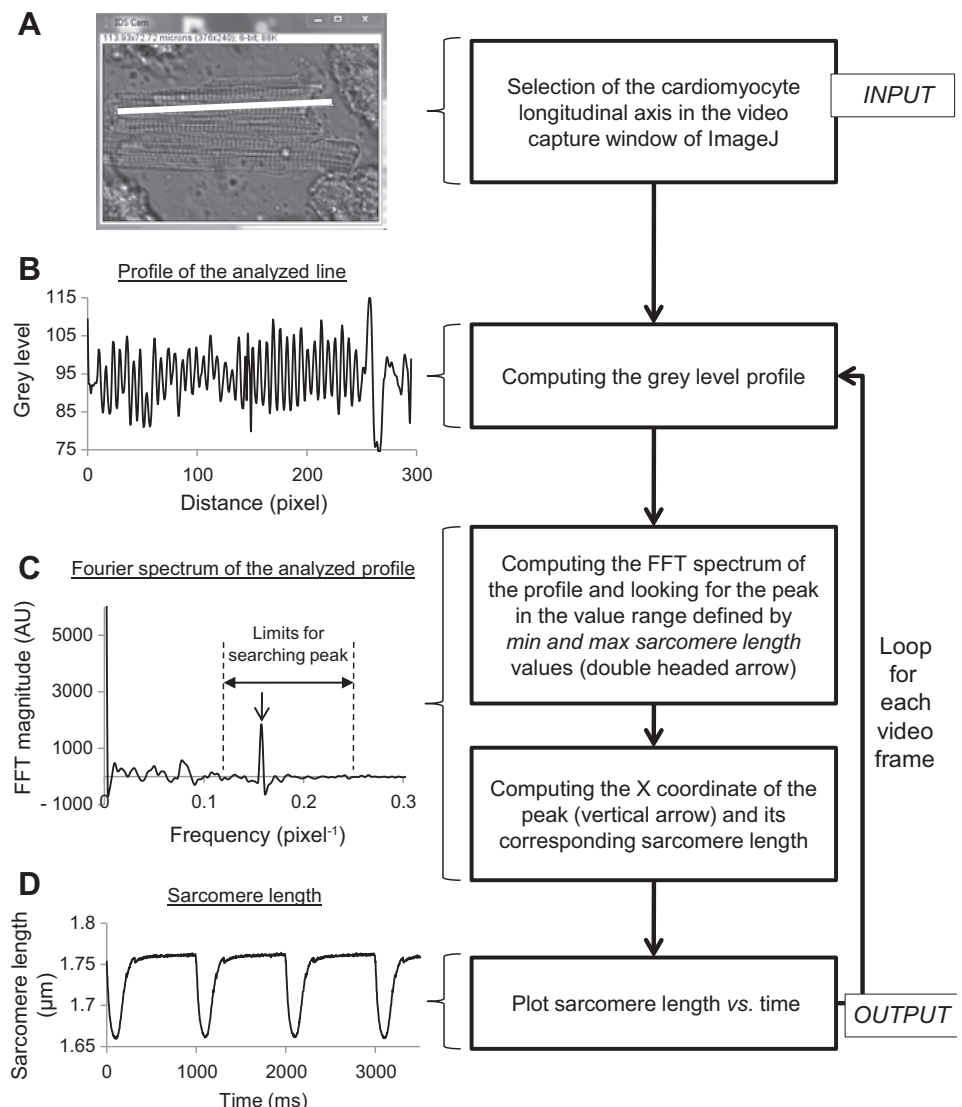
Experimental setup and protocol. CMs were placed in a perfusion chamber mounted on an inverted microscope (Nikon Diaphot 300) for online sarcomere analysis and video recording of contraction at 25°C. Myocytes were superfused with Tyrode's solution containing the following (in mM): 140 NaCl, 5.37 KCl, 1.36 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 NaH₂PO₄, 10 HEPES, 11 glucose, at pH 7.4, adjusted with NaOH. Myocytes were electrically field stimulated at 1 Hz with square-wave pulses (80 mA, 2 ms) delivered through a pair of platinum electrodes.

Recording of CM contraction. The videos of rat left ventricular myocytes contracting under electrical stimulation at 1 Hz were captured with an IDS UI-1220LE-M-GL camera (Imaging Development Systems). Online experiments in ImageJ used the plug-in HF_IDS_Cam (available on ImageJ website). Video recording for subsequent offline analysis used the camera supplier software uEye Cockpit. The camera was connected to a USB port of a PC workstation (Xeon E3 1241v3 3.5-GHz processor) running under either Linux or Windows 7 (64 bits) operating systems.

Synthetic videos of a CM contraction simulation. Each sarcomere measurement mode of SarcOptiM has been validated with synthetic videos of a modeled contracting CM. These were created with the video synthesis tool, which is implemented in SarcOptiM. In these synthetic videos, frame rate, pixel size, and CM features (length, width, resting SL, sarcomere shortening, and contraction/relaxation speed factor), as well as CM movement and rotation in the video field, can be user defined to match particular experimental preparations and test user hardware. The equation, $SL_t = SL_{min} \times e^{-\exp(-t \times SF)} - t \times SF + 1$ (where SL_t is SL at time t ; SL_{min} is minimum SL at maximum peak shortening; t is time; and SF is contraction/relaxation speed factor, which adjusts the theoretical model to fast or slow twitches), is used to model the CM contraction. In our examples, the standard parameters were as follows: resting SL, 1.8 μm; sarcomere shortening, 5% of the resting SL; pixel size, 0.3 μm; video frame rate equivalent, 100 Hz; number of frames, 40 (i.e., a total equivalent of 400 ms record); angle of the CM in the frame, 30° from the horizontal; and contraction/relaxation speed factor, 1. An example of synthetic CM generated by this module is available in the data supplement (Supplemental Video S1; supplemental material for this article can be found online at the Journal website).

Setting up and use. To install SarcOptiM in ImageJ: 1) unzip the SarcOptiM.zip file; 2) put the SarcOptiM folder into the

Fig. 1. Flow diagram of the algorithm for SarcOptiM on cell axis analysis. A: an example of an input image opened with ImageJ. The white line represents the axis positioned for sarcomere measurement. B: gray level profile along the axis of measurement. C: Fourier spectrum of the gray level profile. Double-headed arrow indicates the limits between which the algorithm searches for the peak. This interval is user defined as the minimum and maximum sarcomere lengths set before the analysis. The vertical arrow shows the detected peak corresponding to sarcomere spatial frequency in A. D: example of output plot representing sarcomere lengths vs. time.



“ImageJ\plugins” folder; and 3) put the SarcOptiM.ijm file into the “ImageJ\macros\toolsets” folder.

The user guide on our institutional website (see ENDNOTE) and on the ImageJ website contains more information, and a video demonstration of its use is available in the data supplement (Supplemental Video S2). It is important to note that another plug-in is necessary to acquire video flow from digital, e.g., HF_IDS_Cam and Webcam Capture, or analog, e.g., PixelSmart Frame Grabbers cameras.

Statistics. All box plots indicate minimum, first quartile, median and mean, third quartile, and maximum values. All statistics have been performed with R and SigmaStat. For the comparison between groups, ANOVA tests were performed. Differences are considered significant when the *P* value is inferior to 0.05.

RESULTS

Analysis algorithm description and outputs. In *on cell axis* mode (Fig. 1), the sarcomere measurement algorithm searches for a peak in the fast Fourier transform (FFT) of the gray level profile of the myocyte longitudinal axis along the line positioned on the image by the user (Fig. 1, A and B). The position of the peak located in the FFT spectrum within the limits for SL values defined by the user is determined (Fig. 1C). Then, given the pixel size, the SL is calculated.

For an analysis with *on entire frame* mode, the algorithm is similar, except that the FFT is calculated over the entire image and is not confined to the myocyte. The peak is sought with native “find maxima” ImageJ function in a two-dimensional plane within the limits for SL values defined by the user (Fig. 2). Then, given the pixel size, the *x*-*y* coordinates of the peak, and its Euclidian distance from the center of the Fourier spectrum, the SL is calculated.

At the end of the sarcomere measurement computation, each SL value is plotted vs. time in a new window (Figs. 1D and 2C). Time is determined by video frame rate. The *XY* data can be saved as a comma separated values file (.csv) or copied into the clipboard for further analysis.

For a more complete understanding of the analysis, please consult the source code.

Accuracy of the SL measurement with different pixel sizes. Since the accuracy of sarcomere measurement depends on the spatial resolution of the acquired image, the effect of pixel size on SL parameters has been investigated with the *on cell axis* mode of SarcOptiM. In this test, we used a synthetic video of a mathematically modeled CM contraction with the standard parameters (see MATERIALS AND METHODS) and six realistic pixel sizes. The sarcomere measurement on each frame during the contraction and relaxation was compared with the value assigned to that point in the model. Absolute differences between each measured and each theoretical value are shown as box plot in Fig. 3A. For a pixel size between 0.20 and 0.35 μm , the error of the measurement is, in the worst case, inferior or equal to 0.005 μm . For a pixel size of 0.40 and 0.45 μm , the measurement error lies between 0.006 and 0.007 μm . These values are far below the pixel size, since they are obtained with a frequency analysis by FFT and not by a simple metric measurement (7).

Comparison between on cell axis and on entire frame modes of analysis. The *on cell axis* mode is much faster than the *on entire frame* mode because the latter requires a two-dimensional FFT calculation instead of a single one. However, it could fail if the contracting cell moves and leaves the mea-

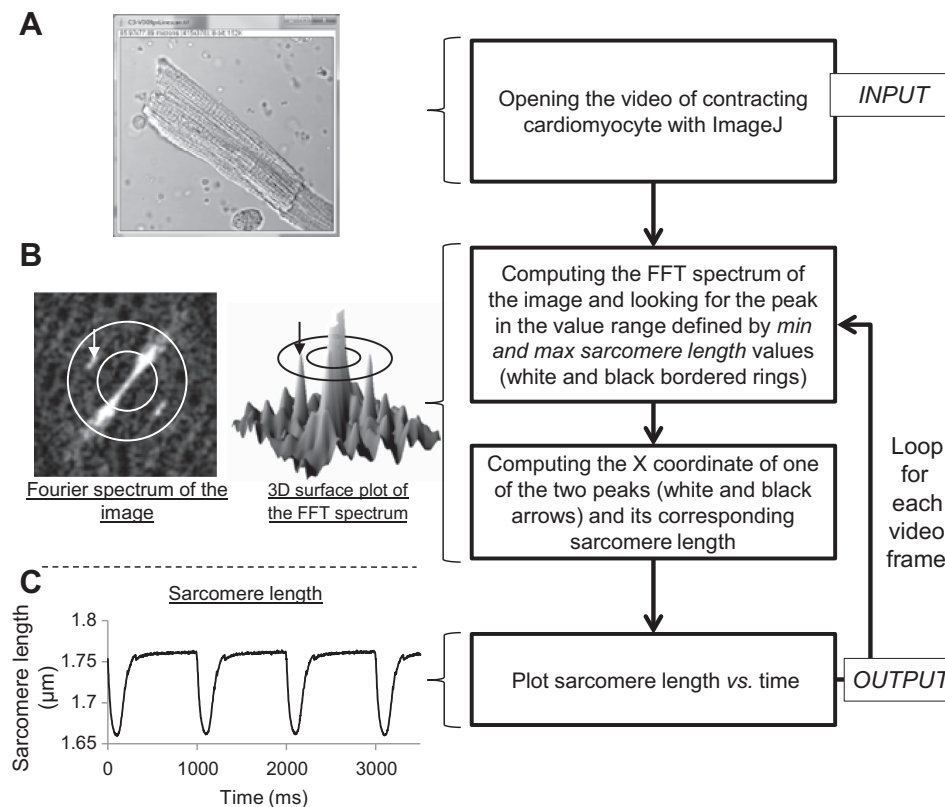


Fig. 2. Flow diagram of the algorithm for SarcOptiM *on entire frame* mode. A: an example of the input image opened with ImageJ. B: two-dimensional Fourier spectrum of the image (left), and three-dimensional (3D) surface plot of the FFT spectrum (right). Rings indicate the limits set for searching the peak defined by the user as minimum and maximum sarcomere lengths before the analysis. Arrows show the detected peak corresponding to sarcomere spatial frequency in this frame. C: example of output plot representing sarcomere lengths vs. time.

surement axis. Analysis mode *on entire frame* avoids this problem, since no measurement axis is required, as illustrated by the video of a rat ventricular CM moving and rotating in the field (see data supplement, Supplemental Videos S3 and S4). Moreover, multiple dead cells in the analyzed field do not affect the SL measurement. However, this mode restricts application to offline analysis of prerecorded experimental videos, since actual performances of the current computer are insufficient to allow online analysis. To compare the quality of analysis in both modes, two synthetic videos with standard

parameters (see MATERIALS AND METHODS) were used. In the second video, a rotary motion from 30° down to the horizontal was applied to the CM. The first video was analyzed with *on cell axis* and *on entire frame* modes. The second video was analyzed with the *on entire frame* mode alone. As above, SL data obtained through a contraction-relaxation cycle were compared with their model values, and the results are shown in Fig. 3B. The *on cell axis* mode allows the best accuracy of measurement with a maximum error in the worst case < 0.005 μm. With the *on entire frame* mode, the worst case error is slightly higher, since it can reach 0.009 μm due to the pixel interpolation when the cell axis is not exactly horizontal or vertical. However, with this mode, the SL measurement is not affected, and the maximum error is not significantly increased by the cell rotation in the visual field (Fig. 3, B and C). Thus the *on cell axis* analysis mode is recommended in standard conditions. The *on entire frame* analysis mode has to be used when the CM moves or rotates in the field, despite that this will result in a slightly higher variability of SL measurement.

A supplemental tool based on the offline *on entire frame* mode has also been developed to simultaneously measure contractions of several CMs. It should be noted that this tool can be used only if the cells do not have exactly the same orientation in the video field. This is required to separate and distinguish the peaks corresponding to each cell in the FFT spectrum.

Effect of the sampling frequency upon the quality of the measurement of rat CM contractions under basal conditions and following β-adrenergic stimulation with isoproterenol. Several video capture frequencies were tested to determine the optimal frame rate for sarcomere measurement of a rat ventricular CM before and after superfusion of 100 nM isoproterenol (known to increase contraction kinetic and amplitude). Examples of sarcomere measurements (*on cell axis* mode) in control conditions at video frame rates of 25, 50, 100, 250, 500, and 1,000 Hz are shown Fig. 4. The optimal frequency was determined by measuring for each rate the minimum SL (minSL) and maximum sarcomere shortening speed (dSL/dt_{max} ; Fig. 5, A and B). The acquisition frequency is considered sufficient when minSL and dSL/dt_{max} vary by <5% from the values determined at 1,000 Hz. In control conditions, 100 Hz is enough to record minSL (1.708 vs. 1.708 μm at 1,000 Hz) and dSL/dt_{max} (-2.26 vs. -2.27 μm/s at 1,000 Hz). However, the sampling rate must

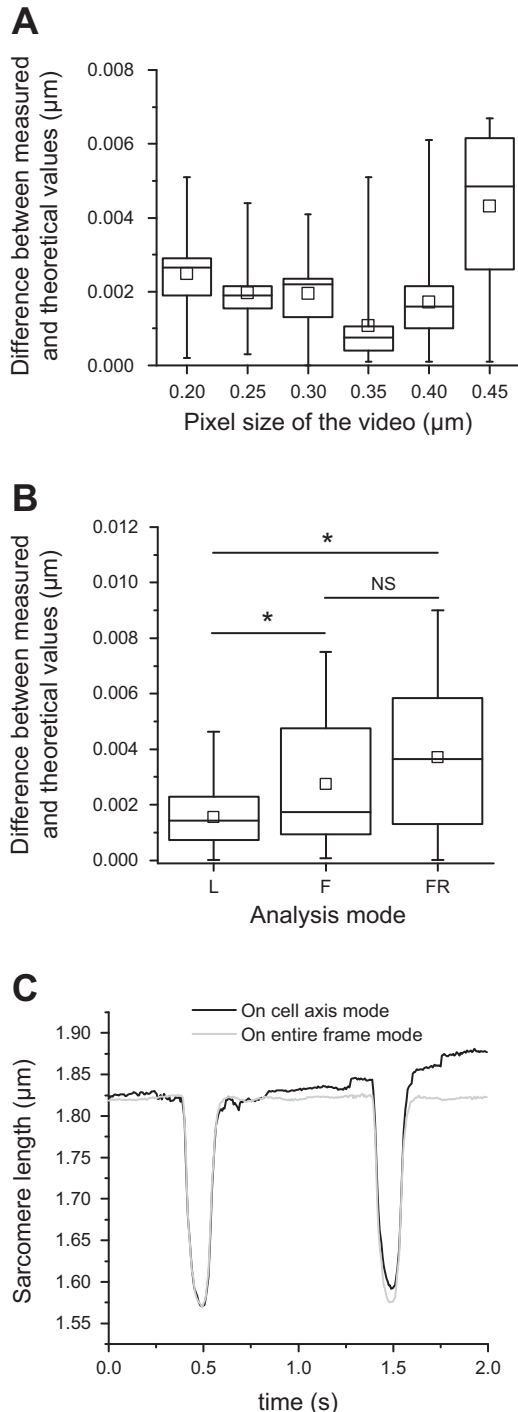


Fig. 3. A: absolute error of the sarcomere length measurement corresponding to the difference between the measured and the model values during a simulated cardiomyocyte contraction were recorded for different pixel sizes with *on cell axis* mode ($n = 40$ frames for runs for each pixel size). B: effect of different analysis modes on absolute error of the sarcomere length measurement during a simulated cardiomyocyte contraction with or without myocyte rotation ($n = 40$ frames). L, *on cell axis* mode without cell rotation; F, *on entire frame* mode without cell rotation; FR, *on entire frame* mode with cell rotation. Pixel size was 0.3 μm. In A and B, box plots indicate minimum, first quartile, median and mean, third quartile, and maximum values for each condition. * $P < 0.05$ with ANOVA and Bonferroni post hoc t -test. NS, nonsignificant. C: example of offline sarcomere length measurements with both *on entire frame* (shaded line) and *on cell axis* (solid line) modes during cell contraction and rotation. The video used for these measurements is available in the data supplement (Supplemental Video S4). Note that the *on entire frame* mode allows undisturbed sarcomere length measurement during the cell rotation, especially during the diastole.

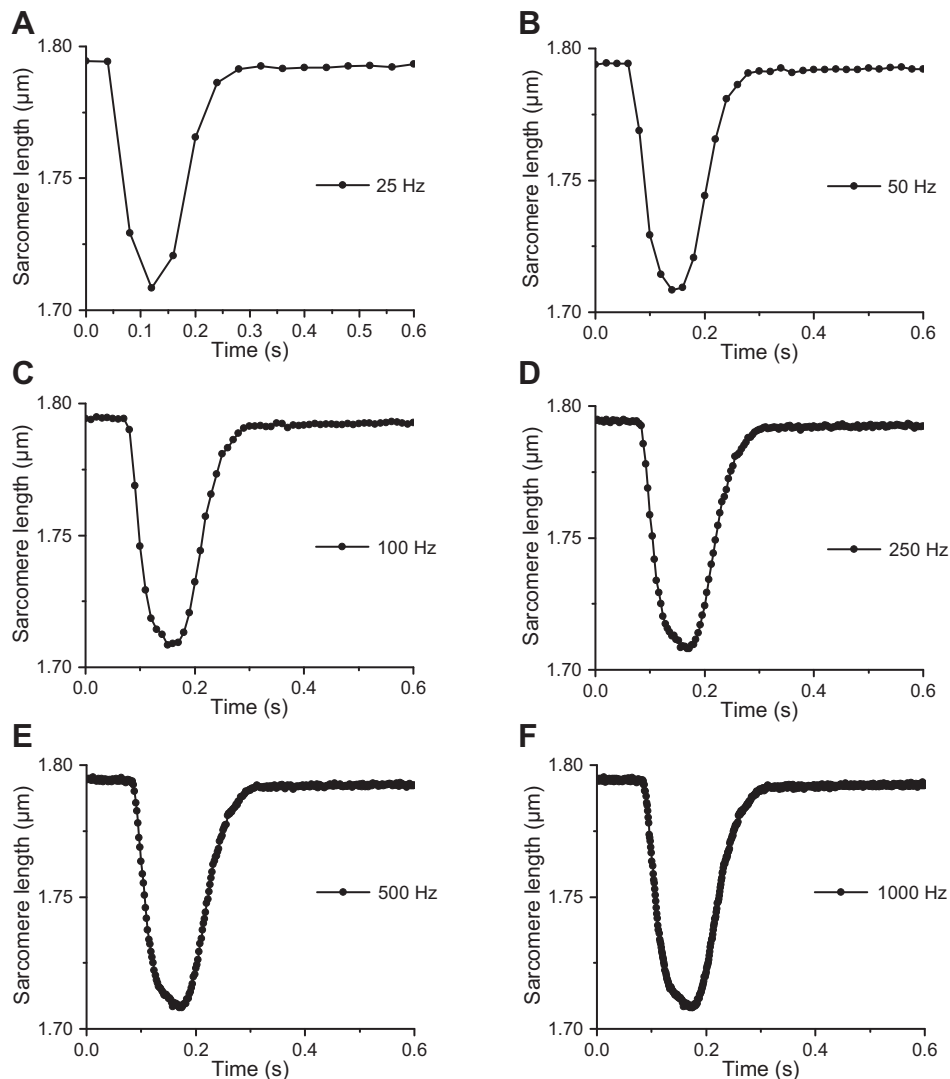


Fig. 4. Effect of video frame rate on sarcomere length measurement during contraction of a rat left ventricular cardiomyocyte electrically stimulated at 1 Hz under basal conditions (*on cell axis* mode). A–F: sarcomere length measurements at frame rates of 25, 50, 100, 250, 500, and 1,000 Hz, respectively. Pixel size was 0.3 μm .

be increased to 250 Hz in the presence of isoproterenol to obtain an accurate dSL/dt_{max} (minSL: 1.576 vs. 1.576 μm at 1,000 Hz and dSL/dt_{max} : -6.68 vs. -6.98 $\mu\text{m/s}$ at 1,000 Hz). The effect of 100 nM isoproterenol on the contraction of a rat CM recorded at 250 Hz is shown in Fig. 5, C and D. The increases of sarcomere shortening and of contraction and relaxation rates are clearly visible (Fig. 5D). Therefore, with this preparation and under these experimental conditions, a frame rate of 250 Hz is recommended for SL measurements, but this parameter has to be optimized for other experimental conditions.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

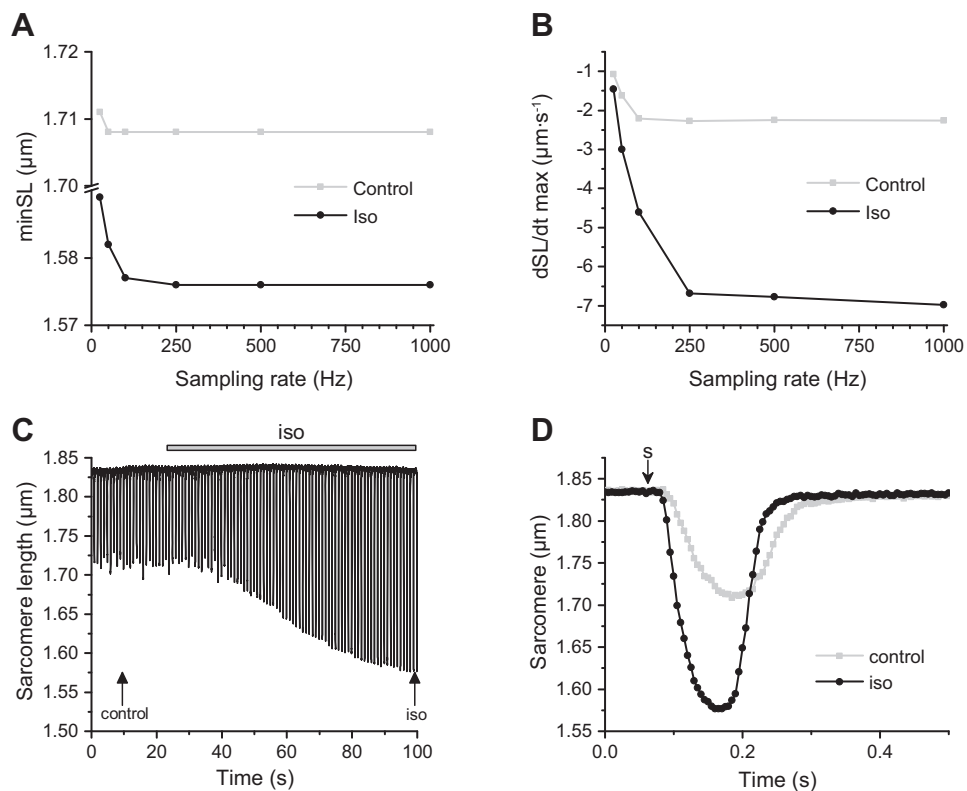
SarcOptiM is the first open-source, easy to use, and freely available software plug-in for the analysis of CM contractions with the sarcomere shortening method. We validated the measurement algorithms with synthesized videos with defined parameters. Tests were also conducted on isolated rat ventricular myocytes.

Versatility. SarcOptiM works with any analog or digital camera that can be interfaced with ImageJ, Fiji, and Micromanager, as shown by examples available on the software

download webpage. This is not necessarily the case for licensed software, which may work only with dedicated cameras. A nonexhaustive list of cameras working with ImageJ is available on the ImageJ website (Plugins > Acquisition section). Another list for Micromanager is available on micromanager website device section. Thus a camera can be chosen to meet the requirements of the experiment, in particular with regards to the best resolution-sensitivity-speed compromise. Moreover, SarcOptiM allows sarcomere measurement on prerecorded videos. This offline analysis is useful for experiments requiring several analyses, or if the CM moves or rotates in the optical field. Finally, the total analysis time can be significantly reduced with SarcOptiM. Indeed, the analysis could also be simultaneously performed on several cells with the offline multiple cells *on entire frame* mode, provided that cells do not have exactly the same orientation in the video field.

Performance. The reliability of the sarcomere measurement provided by SarcOptiM has been demonstrated by tests on synthetic videos. Measurements can be performed as long as CM sarcomeres are visible on the video, even in low light conditions. In addition, they are not affected by light oscilla-

Fig. 5. Measurement of rat left ventricular cardiomyocyte contractions electrically evoked at 1 Hz under basal conditions and following superfusion by 100 nM isoproterenol (iso) with *on cell axis* mode. *A* and *B*: effect of video sampling rate on the measurement of minimum sarcomere length (minSL; *A*) and maximum sarcomere shortening speed (dSL/dt_{max} ; *B*) in control conditions (shaded lines) and in the presence of isoproterenol (solid lines). *C* and *D*: effect of isoproterenol on the contraction recorded at a video frame rate of 250 Hz and a pixel size of 0.3 μm . *C*: continuous recording of sarcomere measurement during the superfusion of isoproterenol (bar above the trace). *D*: examples of sarcomere shortening before and after superfusion of isoproterenol (arrows in *C*). "s" indicates the time of electric stimulation.



tions, as the calculations are done on the image FFT and not on their brightness. The limitation is sufficient gray-scale definition to separate signal-noise in the FFT (Fig. 1C). With these features, the use of midrange cameras, such as the IDS UI-1220LE-M-GL, is possible. This camera is able to record sarcomere shortening at frequencies $>1,000$ Hz, although we found that a sampling rate of 250 Hz is usually enough for rat ventricular CMs (Fig. 5). For other cell types, such as skeletal muscle, which require a high sampling rate, the measurement algorithm is not a limiting factor for online computing: at full speed, it can calculate SL at sampling rates far above 10 kHz.

In addition to its free distribution and versatility, SarcOptiM presents several other advantages since it is integrated into an image processing software. It is thus possible to work on the video as well as on images, to adjust brightness or contrast, to define areas of interest, or other processing. With this plug-in, sarcomere measurement can be done whatever the orientation of the cell in the video frame, unlike most licensed software and the Python algorithm (9), which require a perfect horizontal orientation of the cell. Moreover, it allows an easy adjustment of the measuring axis during the analysis.

A model of myocyte contraction is included in SarcOptiM, which is another asset of the software. This is used to construct video simulations with user-defined parameters. Users can thus test, evaluate, and optimize pixel size, video frame rate, upload time, and computer performance for their own experimental conditions and hardware configuration.

SarcOptiM has been developed to work under Windows, Mac OS, and Linux operating systems; however, under identical computing conditions, we found that the best performance of the algorithm was obtained in Linux.

Known limits. Native video import in ImageJ is limited to AVI encoded in MJPEG or images series e.g., TIFF series. However, additional plug-ins can open other video formats e.g., MovieIO. Moreover, given the ability of ImageJ to analyze video, it is likely that the number of importable video formats will increase. A limitation of SarcOptiM is the impossibility to receive a synchronization signal, for example to indicate the moment when electrical stimulation is applied to the cell.

Perspectives. This open-source plug-in developed in ImageJ macro language and Java can be modified by anyone to improve existing functions or add new ones, such as analysis with autocorrelation function or measurement method by edge detection.

Analysis with *on entire frame* mode of SarcOptiM cannot currently be used for real-time analysis, since there is insufficient processor power for the online computation of the two-dimensional Fourier spectrum (Fig. 2). In the future with improved processor performances, not only should this be possible, but it should also allow the analysis of several contracting isolated myocytes at the same time as well, whatever their orientations in the visual field and without motion artifacts.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to Stemmer-Imaging (France) for providing us the IDS UI-1220LE-M-GL camera, to Ian Findlay for critical comments and correcting English, and to Samantha Dellal for proofreading.

GRANTS

This work was financially supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Région Centre-Val de Loire.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.P., F.G., P.B., and V.M. conception and design of research; C.P., F.G., and A.Y. performed experiments; C.P. and F.G. analyzed data; C.P. and F.G. interpreted results of experiments; C.P., F.G., A.Y., and C.O.M. prepared figures; C.P. drafted manuscript; C.P., F.G., A.Y., C.O.M., P.B., and V.M. edited and revised manuscript; C.P., F.G., A.Y., C.O.M., P.B., and V.M. approved final version of manuscript.

ENDNOTE

At the request of the authors, readers are herein alerted to the fact that additional materials related to this manuscript may be found at the institutional website of one of the authors, which at the time of publication they indicate is: <http://pccv.univ-tours.fr/ImageJ/SarcOptiM/>. These materials are not a part of this manuscript and have not undergone peer review by the American Physiological Society (APS). APS and the journal editors take no responsibility for these materials, for the website address, or for any links to or from it.

REFERENCES

1. Ait-Mou Y, Hsu K, Farman GP, Kumar M, Greaser ML, Irving TC, de Tombe PP. Titin strain contributes to the Frank-Starling law of the heart by structural rearrangements of both thin- and thick-filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 2306–2311, 2016.
2. Butler L, Cros C, Oldman KL, Harmer AR, Pointon A, Pollard CE, Abi-Gerges N. Enhanced characterization of contractility in cardiomyocytes during early drug safety assessment. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 145: 396–406, 2015.
3. Carillion A, Feldman S, Jiang C, Atassi F, Na N, Mougnot N, Besse S, Hulot JS, Riou B, Amour J. Overexpression of cyclic adenosine monophosphate effluent protein MRP4 induces an altered response to β -adrenergic stimulation in the senescent rat heart. *Anesthesiology* 122: 334–342, 2015.
4. Delbridge LM, Roos KP. Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 11–25, 1997.
5. Fan D, Wannenburg T, de Tombe PP. Decreased myocyte tension development and calcium responsiveness in rat right ventricular pressure overload. *Circulation* 95: 2312–2317, 1997.
6. Fowler ED, Benoist D, Drinkhill MJ, Stones R, Helmes M, Wüst RCI, Stienen GJM, Steele DS, White E. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. *J Mol Cell Cardiol* 86: 1–8, 2015.
7. Gannier F, Bernengo JC, Jacquemond V, Garnier D. Measurements of sarcomere dynamics simultaneously with auxotonic force in isolated cardiac cells. *IEEE Trans Biomed Eng* 40: 1226–1232, 1993.
8. Llewellyn ME, Barretto RPJ, Delp SL, Schnitzer MJ. Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans. *Nature* 454: 784–788, 2008.
9. Peterson P, Kalda M, Vendelin M. Real-time determination of sarcomere length of a single cardiomyocyte during contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C519–C531, 2013.
10. Sheikh F, Raskin A, Chu PH, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M, Liang X, Zhang T, Yajima T, Gu Y, Dalton ND, Mahata SK, Dorn GW, Brown JH, Heller-Brown J, Peterson KL, Omens JH, McCulloch AD, Chen J. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest* 118: 3870–3880, 2008.
11. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson EG, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485: 599–604, 2012.

3. Conclusion

L'algorithme de mesure a été développé sous la forme d'un plug-in pour le logiciel libre ImageJ du National Institutes of Health (NIH). Il a été écrit en ImageJ Macro Language et en JAVA pour permettre son amélioration par les utilisateurs selon leurs besoins. Ce programme permet donc non seulement la mesure de la contractilité des CM ventriculaires, mais également celle des CM de VP et d'OG, dont la contraction est beaucoup plus rapide. Il ne présente pas les limites habituelles des systèmes commerciaux et permet notamment la mesure de la contractilité de cardiomyocytes qui adhèrent difficilement au fond des cuves, tels que les CM de VP et d'OG de forme cylindrique pouvant provoquer des artefacts de mouvement pendant l'enregistrement.

Ce plug-in est maintenant référencé sur le serveur web du NIH dans la rubrique plug-in pour ImageJ. Il est fourni sous licence libre GNU GPL à la communauté scientifique et peut être téléchargé sur le site web du laboratoire Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires de l'Université de Tours (<http://pccv.univ-tours.fr/ImageJ/SarcOptiM/>).

B. Etude de la contractilité des cardiomyocytes de VP vs. OG

1. Introduction

Les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ pendant le transitoire calcique ont pour finalité une réponse contractile du cardiomyocyte. Les différences de formes et d'amplitude des transitoires calciques observées en microscopie confocale et en photométrie des CM de VP par rapport aux CM d'OG suggèrent donc une différence de réponse contractile entre ces 2 types de CM ainsi qu'une possible hétérogénéité de contraction au sein des CM de VP. Or une non-uniformité de la contraction des CM dans la VP pourrait constituer une source d'arythmie (Wakayama *et al.* 2005).

Les objectifs de cette partie étaient donc 1) de déterminer si les différences d'amplitude des transitoires calciques observées entre les CM de VP et d'OG conduisaient à des différences d'amplitude de contraction, 2) d'étudier la réponse des tissus entiers de VP et d'OG dans des conditions où l'entrée de calcium dans les CM est modifiée et 3) de savoir si les différences de réponses contractiles observées peuvent être expliquées par une différence de sensibilité au calcium des protéines contractiles des CM de VP et d'OG.

2. Résultats

a. Contractilité des cardiomyocytes isolés en conditions basales

A une fréquence de stimulation de 1 Hz, l'amplitude de raccourcissement des sarcomères des CM de VP est plus grande que celle des CM d'OG ($-0,095 \pm 0,006 \mu\text{m}$, $n=31$ vs. $-0,020 \pm 0,004 \mu\text{m}$, $n=7$, $p<0,001$) (Figure 51 A-B). Comme pour l'amplitude du transitoire calcique, la variabilité d'amplitude de raccourcissement des sarcomères est significativement plus grande dans les CM de VP que dans les CM d'OG ($p<0,01$, F-test). Les CM de VP ont donc une amplitude de contraction plus grande et plus hétérogène que les CM d'OG (Figure 51-B).

En revanche, la longueur diastolique des sarcomères et la variabilité de cette longueur ne sont pas significativement différentes dans les CM de VP et les CM d'OG (longueur moyenne des sarcomères : VP : $1,723 \pm 0,009 \mu\text{m}$ vs. OG : $1,750 \pm 0,009 \mu\text{m}$, NS) (F-test : $p=0,26$) (Figure 51 C).

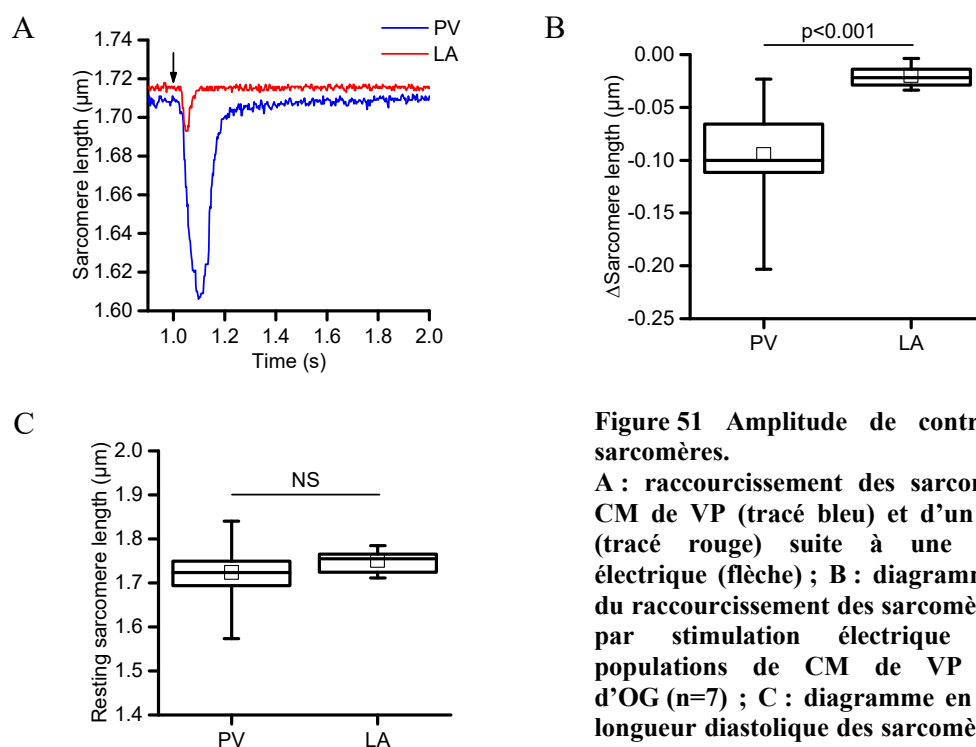


Figure 51 Amplitude de contraction des sarcomères.

A : raccourcissement des sarcomères d'un CM de VP (tracé bleu) et d'un CM d'OG (tracé rouge) suite à une stimulation électrique (flèche) ; **B :** diagramme en boîte du raccourcissement des sarcomères évoqués par stimulation électrique dans les populations de CM de VP ($n=31$) et d'OG ($n=7$) ; **C :** diagramme en boîte de la longueur diastolique des sarcomères dans les CM de VP ($n=31$) et d'OG ($n=7$).

b. Étude de l'effet de la variation de la concentration de calcium extracellulaire sur la réponse contractile d'anneaux de VP et d'OG

Les anneaux ont été superfusés par des solutions physiologiques de Krebs dont les concentrations calciques ont été modifiées (cf partie « Contractilité des anneaux isolés de VP et d'OG » page 99).

Par rapport à la concentration de calcium extracellulaire ($[Ca^{2+}]_e$) physiologique de 1.36 mM, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_e$ jusqu'à 3 mM, puis de 3 à 5 mM entraîne une augmentation de l'amplitude de contraction des anneaux d'OG de $59 \pm 11 \%$ et $98 \pm 22 \%$ respectivement. Aucun effet n'est observé sur les anneaux de VP (Figure 52).

La diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ induit une diminution de l'amplitude de contraction des anneaux de VP et d'OG. À la concentration de 0,7 mM, la diminution de l'amplitude de contraction est moins grande dans les anneaux de VP (-42 %) que dans ceux d'OG (-68 %). Aux concentrations inférieures, la diminution est similaire pour les deux préparations.

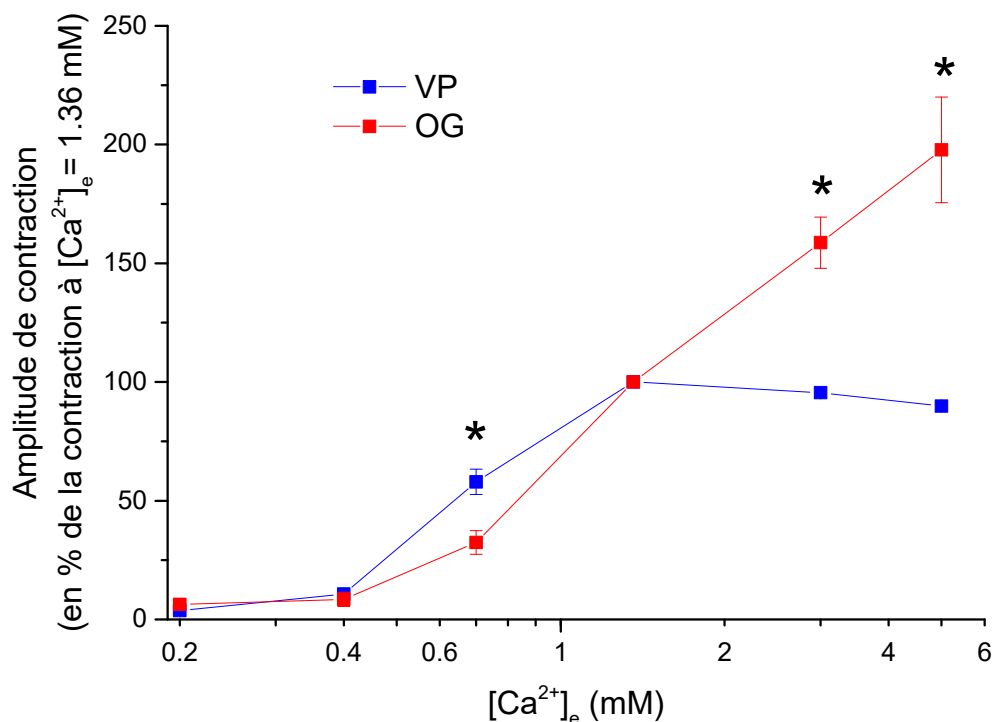


Figure 52 Variation de l'amplitude de contraction des anneaux de VP (n=11) et d'OG (n=23) en fonction de la $[Ca^{2+}]_e$.

Fréquence de stimulation : 1 Hz. * : $p < 0.01$ VP vs. OG.

c. Étude de la réponse contractile d'anneaux de VP et d'OG à un ouvreur des canaux calciques

À la concentration de 300 nM, le Bay K 8644 induit une augmentation importante de la contraction des CM de VP, tandis qu'il n'exerce aucun effet sur les CM de VP (Figure 53). À cette concentration, le Bay K 8644 induit toutefois une augmentation de la tension basale de l'anneau (Figure 53-A) qui pourrait être due à la contraction des cellules musculaires lisses puisqu'elle n'est pas retrouvée dans les anneaux d'OG (Figure 53-B).

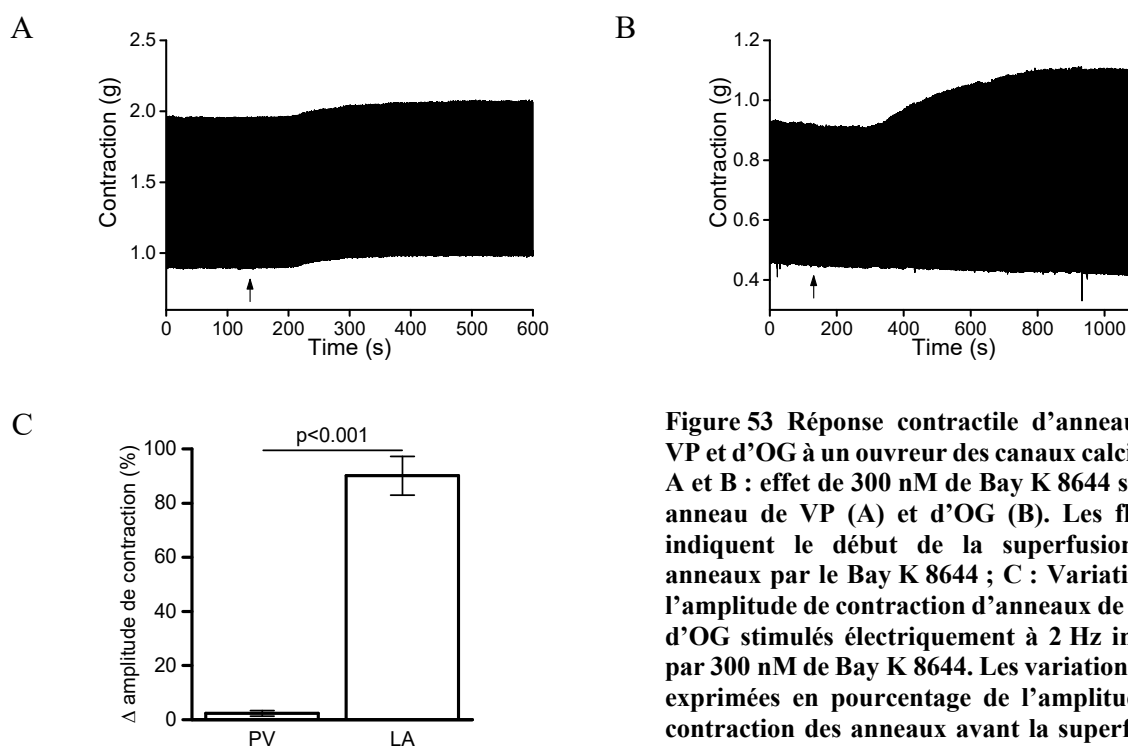


Figure 53 Réponse contractile d'anneaux de VP et d'OG à un ouvreur des canaux calciques. A et B : effet de 300 nM de Bay K 8644 sur un anneau de VP (A) et d'OG (B). Les flèches indiquent le début de la superfusion des anneaux par le Bay K 8644 ; C : Variation de l'amplitude de contraction d'anneaux de VP et d'OG stimulés électriquement à 2 Hz induite par 300 nM de Bay K 8644. Les variations sont exprimées en pourcentage de l'amplitude de contraction des anneaux avant la superfusion du Bay K 8644.

d. Étude de la réponse contractile d'anneaux de VP et d'OG à un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants

Le diltiazem provoque une diminution concentration-dépendante de l'amplitude de contraction des anneaux de VP et d'OG, allant jusqu'à l'abolition complète des contractions. Toutefois, les CM de VP sont légèrement plus sensibles aux effets du diltiazem que les CM d'OG (CE_{50} (VP) : $0,99 \pm 0,23 \mu M$ vs. CE_{50} (OG) : $1,80 \pm 0,19 \mu M$; $p < 0,05$).

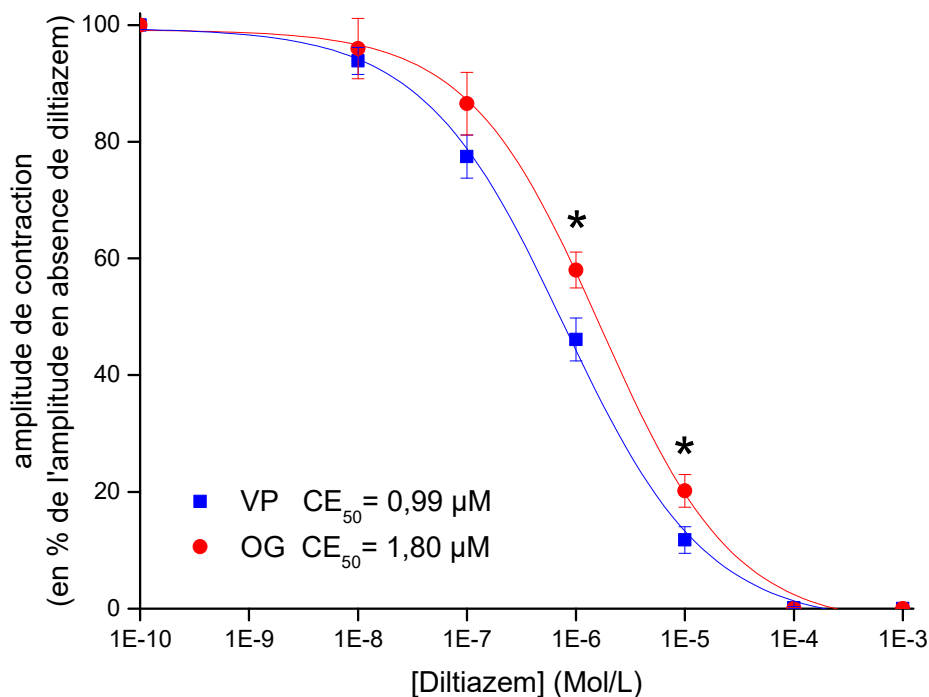


Figure 54 Courbe concentration-effet du diltiazem sur l'amplitude de contraction d'anneaux de VP (n=13) et d'OG (n=9).
Fréquence de stimulation : 1 Hz. * : $p < 0,05$ VP vs. OG.

e. Étude de la sensibilité au calcium des protéines contractiles par une approche tissulaire

La technique des fibres pelées permet de s'affranchir des processus physiologiques d'entrée de calcium dans la cellule en perméabilisant les membranes et en incubant directement les myofilaments avec une concentration connue de calcium libre. Ceci permet d'observer directement l'effet du calcium sur les protéines contractiles. L'objectif de cette expérience était donc de vérifier que dans les mêmes conditions d'étirement, la réponse contractile des CM de VP était identique à celle des CM d'OG pour une même concentration calcique.

La variation de l'amplitude de contraction des anneaux de VP et d'OG perméabilisés en fonction de la concentration en calcium libre dans le milieu est identique. Les concentrations de calcium libre permettant d'obtenir 50 % de l'amplitude de contraction maximale ne sont pas différentes entre les anneaux d'OG et de VP ($[Ca^{2+}_{libre}]_{50}$ (VP) $1,96 \pm 0,19 \mu M$ vs. $[Ca^{2+}_{libre}]_{50}$ (OG) $1,74 \pm 0,09 \mu M$; $p=0,71$), ce qui suggère que la sensibilité au calcium des protéines contractiles des CM de VP est identique à celle des CM d'OG.

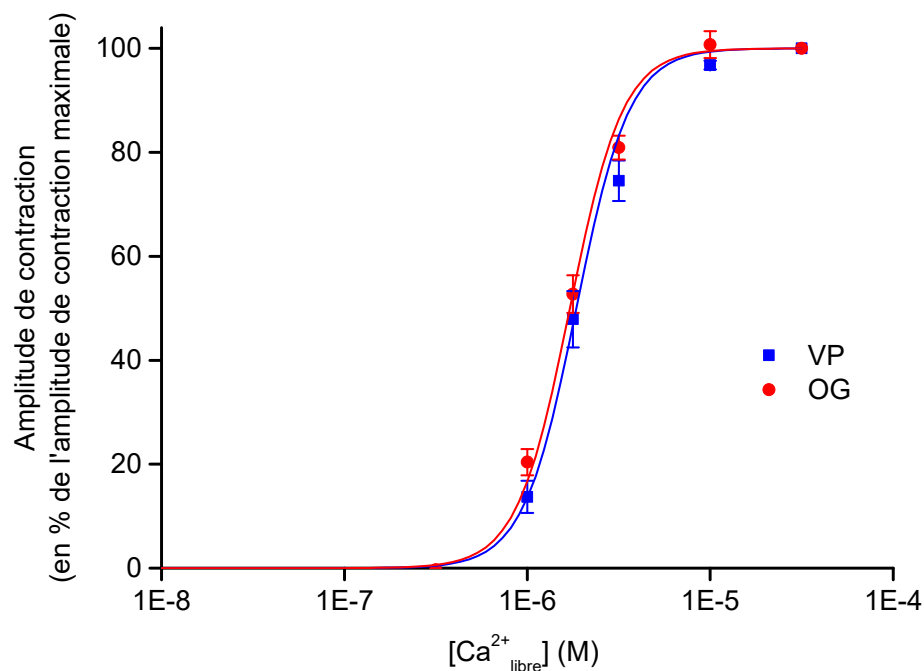


Figure 55 Tension développée par des anneaux pelés de VP (n=7) et d'OG (n=7) en fonction de la concentration en calcium libre du milieu d'incubation.

3. Discussion

a. Contraction des cardiomyocytes isolés et potentiel arythmogène

Nos résultats montrent que l'amplitude de la contraction des CM de VP est plus importante et présente une plus grande variabilité que celle des CM d'OG, ce qui est en accord avec notre étude de l'amplitude des transitoires calciques. Cette forte hétérogénéité d'amplitude de contraction des CM de la VP est un facteur pouvant favoriser leur arythmogénicité. En effet, comme le montre une étude réalisée sur des trabécules de cœur de rat, une non-uniformité de la contraction conduit à la dissociation des ions calcium des myofilaments dans la zone de jonction entre CM étirés et CM contractés et génère ainsi des DAD (Wakayama *et al.* 2005; Ter Keurs *et al.* 2006; Miura *et al.* 2008; Miura *et al.* 2010). L'existence de différentes amplitudes de contraction entre les CM isolés de VP et d'OG pose la question du comportement contractile de ces deux types de CM au sein du tissu ainsi qu'à l'interface OG-VP. Dans cette zone, une contraction plus forte des CM de VP que des CM d'OG pourrait aboutir à la survenue d'arythmie de type DAD. Un tel phénomène pourrait également être présent au sein du myocarde de la VP puisqu'il existe une forte hétérogénéité de l'amplitude de contraction dans sa population de CM. En effet, l'existence d'îlots de cardiomyocytes présentant différentes organisations de tubules transverses peut conduire à l'apparition de zones de transition brutale entre CM avec tubules organisés et CM sans tubules. Au niveau de ces zones, la différence

d'amplitude de transitoire calcique et donc de contraction entre deux types de CM juxtaposés pourrait être importante. L'étude du comportement contractile des CM au niveau de la jonction OG-VP ainsi qu'à la jonction de deux îlots présentant des réseaux de TT différents pourrait donc être une piste intéressante pour expliquer les activités électriques anormales dans les CM de VP. Pour cela, des études macroscopiques plus intégrées du comportement calcique des cardiomyocytes du manchon myocardique de la VP sont en cours (Figure 56).

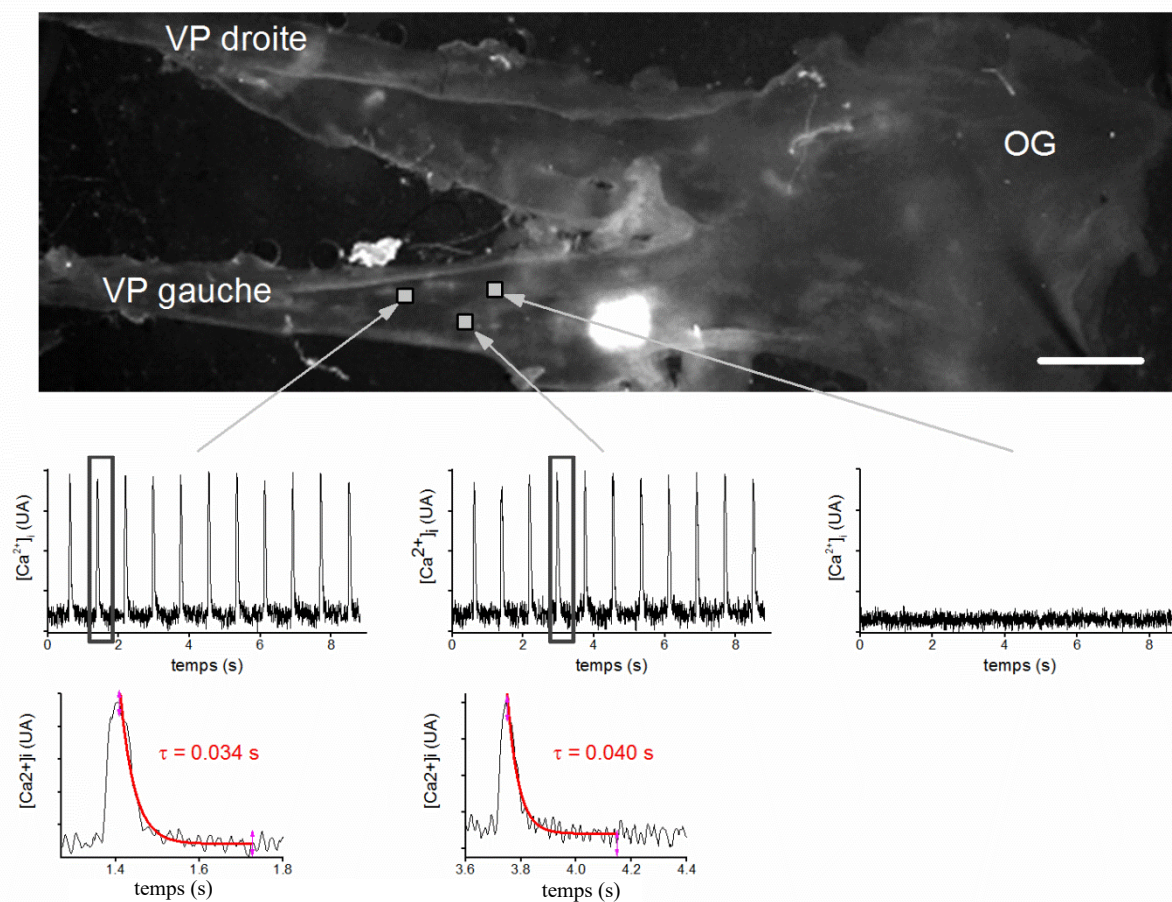


Figure 56 Enregistrement de transitoires calciques spontanés dans plusieurs zones d'une préparation VP-OG-OD en présence de noradrénaline 1 μ M.

La contraction du tissu a été arrêtée par 10 μ M de blebbistatine, la sonde calcique utilisée était le Rhod-2. L'acquisition des images a été réalisée en macroscopie (Olympus MVX10) par une caméra ANDOR Zyla 5.5 à 340 images par seconde. Les constantes de décroissance des transitoires calciques ne sont pas comparables à celles obtenues sur cellules isolées, car la sonde calcique utilisée ici n'a pas la même affinité pour le calcium et a une cinétique de réponse plus rapide que le Fluo-4 utilisé pour les cardiomyocytes isolés. D'autre part, la mesure des transitoires sur tissu correspond à la moyenne des transitoires de plusieurs cardiomyocytes (qui dépend de l'aire de la surface de mesure) et non d'un seul, comme dans les cardiomyocytes isolés. Le délai d'activation initial du transitoire calcique correspondant à la conduction électrique entre les cardiomyocytes ne peut donc pas être négligé. La barre d'échelle représente 3 mm.

b. Réserve contractile

Dans les CM de VP, les conditions favorisant l'augmentation de l'entrée de calcium par les canaux calciques, soit le Bay K 8644 et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_e$ au-delà de la concentration physiologique n'induisent pas d'augmentation de la force de contraction, contrairement à ce qui a été observé dans les CM d'OG. Des expériences contrôles réalisées au laboratoire en patch clamp montrent que le courant calcique des CM de VP est augmenté par le Bay K 8644 et par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_e$. Cette augmentation du courant calcique est associée à une augmentation claire de l'amplitude du transitoire calcique (expériences contrôles n=2 CM) (Figure 57). Ceci suggère donc que l'augmentation de l'amplitude du transitoire calcique n'induit pas d'augmentation de la force de contraction dans les CM de VP. Ceci n'est pas dû à une différence de sensibilité des protéines contractiles pour le calcium puisque dans les conditions d'étirement optimales, celle-ci est identique dans les CM de VP et d'OG. Ainsi, la $[Ca^{2+}]_i$ au pic du transitoire permettrait d'obtenir la réponse contractile maximale des myofilaments dans les CM de VP contrairement aux CM d'OG qui ont une force de contraction augmentée lors de l'augmentation de l'amplitude du transitoire calcique. Les CM de VP ne semblent donc pas avoir de réserve contractile dans les conditions d'étirement permettant d'obtenir la réponse contractile optimale des anneaux, contrairement aux CM d'OG. Cette hypothèse pourrait être vérifiée 1) sur CM isolés en mesurant simultanément la force de contraction isométrique des CM de VP et leur transitoire calcique dans des conditions d'étirement similaires à celles auxquels ils sont soumis dans le tissu ; 2) sur tissu, en comparant l'amplitude des transitoires calciques en conditions basales et suite à la superfusion de Bay K 8644.

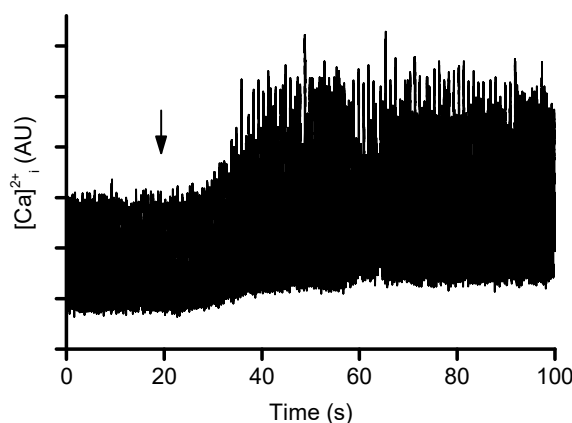


Figure 57 Effet du Bay K 8644 sur l'amplitude des transitoires calciques des cardiomyocytes de VP. La flèche indique le début de la superfusion de 300 nM de Bay K 8644. Fréquence de stimulation : 1 Hz.

c. Limites de l'étude et perspectives

Dans cette étude, l'amplitude de contraction moyenne des CM de VP est probablement surestimée et la variabilité de cette amplitude sous-estimée, car le choix des cellules analysées reposait non seulement sur les critères classiques de réfringence de la membrane et de visibilité des sarcomères, mais aussi sur la réponse des cardiomyocytes à la stimulation électrique. Or les CM répondant à la stimulation électrique par une grande amplitude de contraction sont plus facilement repérés dans le champ du microscope que les CM répondant avec une faible amplitude de contraction. Il y a donc un biais de sélection des CM dans la VP. Toutefois ce biais ne remet pas en cause la plus grande amplitude de contraction moyenne des CM de VP, car les CM d'OG ont tous une faible amplitude de contraction.

La grande variabilité de l'amplitude de contraction observée dans les CM de VP est associée à la variabilité d'amplitude du transitoire calcique, mais aussi probablement à l'hétérogénéité de la distribution spatiale du calcium pendant le transitoire. Une augmentation non uniforme du calcium dans l'ensemble du cardiomyocyte fait que toutes les protéines contractiles ne sont pas en présence de la même concentration calcique au même moment, et donc que le raccourcissement des sarcomères n'est pas homogène dans le CM. Pour distinguer l'importance relative de ces deux composantes, nous avons développé SarConfoCaL (Soumis à Bioinformatics le 2 Septembre 2016, référence manuscrit : BIOINF-2016-1405, cf. Annexe).

Le comportement contractile des CM isolés de VP non soumis à des contraintes mécaniques ne reflète pas forcément celui des CM au sein du tissu. En revanche, une étude de la force de contraction des CM isolés en condition isométrique ou auxotonique permettrait de se rapprocher des conditions physiologiques en mimant les contraintes mécaniques subies par ces CM dans le tissu.

L'évaluation de la sensibilité au calcium des protéines contractiles a été réalisée dans des conditions d'étirement optimales pour les anneaux isolés ne correspondant pas nécessairement à celle de l'ensemble des cardiomyocytes. En effet, dans les VP, les CM ne sont pas organisés de façon linéaire mais répartis de façon très hétérogène (Hashizume, Tango, et Ushiki 1998). Or, la sensibilité au calcium des protéines contractiles dépend de l'étirement des sarcomères. Afin de confirmer les résultats obtenus, des expériences complémentaires sur cellules isolées et pelées, dont la longueur de sarcomères est fixée, devront être réalisées.

CONCLUSION

I. Principaux résultats

Ce travail a montré que le cycle du calcium des CM de VP présente des caractéristiques uniques qui les distinguent à la fois des CM d'OG et de VG.

Le développement et l'utilisation d'un outil de mesure de la régularité d'organisation des réseaux de tubules ont permis de mettre en évidence leur organisation particulièrement hétérogène dans la population des CM de VP. En effet, il existe un gradient d'architecture membranaire allant de la quasi-absence de tubules, comme dans les CM d'OG, jusqu'à une organisation transversale extrêmement régulière, semblable à celle qu'on peut trouver dans les CM de VG. De plus, les CM présentant ces différentes formes de réseaux de tubules ne sont pas dispersés aléatoirement au sein de la VP, mais regroupés en îlots de tailles variables dans les couches luminale et abluminale du manchon de CM. Cette organisation particulière pourrait favoriser les phénomènes de réentrée : son impact sur la conduction de l'influx électrique devra donc être exploré.

Cette hétérogénéité structurelle des CM de VP est également à l'origine d'un couplage spatial des RyR2 et des Cav1.2 très variable, qui entraîne l'apparition de différentes formes de transitoires calciques. En absence de tubules, le transitoire calcique reste limité à la périphérie de la cellule, et présente une faible amplitude globale, comme dans la plupart des CM d'OG. En présence d'un réseau de tubules développé et bien organisé, le transitoire est homogène dans tout le volume cellulaire et présente une grande amplitude, comme dans les CM de VG. Les cardiomyocytes de VP présentent donc une forte hétérogénéité de l'amplitude de leurs transitoires calciques. Ces derniers sont en moyenne plus grands que dans les CM d'OG et de VG.

L'étude de la cinétique des transitoires calciques a par ailleurs révélé des différences avec les autres types de CM, en particulier dans leur phase de décroissance. Celle-ci est plus rapide dans les CM de VP que dans ceux d'OG et de VG. Cette différence a été expliquée par l'étude des mécanismes d'élimination du calcium cytoplasmique. Dans les CM de VP, elle est opérée principalement par la SERCA, qui recapture le calcium à une vitesse identique à celle des CM d'OG mais supérieure à celle des CM de VG. La diminution plus rapide de la concentration en calcium dans les CM de VP que dans les CM d'OG est donc due à une plus grande rapidité d'élimination du calcium par les mécanismes mineurs, c'est-à-dire le NCX, la PMCA, et les mitochondries. Le(s)quel(s) de ces trois mécanismes est(ont) impliqué(s) reste à déterminer. Une part plus importante de calcium éliminée par le NCX pourrait cependant accroître le potentiel arythmogène des CM de VP par rapport aux CM d'OG.

La réponse à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques est identique entre les CM de VP et d'OG. Elle conduit à une augmentation de l'amplitude du transitoire calcique qui est inférieure à celle obtenue dans les CM de VG. Alors qu'une telle stimulation augmente fortement la vitesse d'élimination du calcium cytoplasmique dans les CM de VG ; elle n'a pas d'effet significatif sur la vitesse d'élimination du calcium cytoplasmique dans les cardiomyocytes de VP comme dans les CM d'OG.

La stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques a des effets complexes et difficiles à caractériser sur le cycle du calcium des CM de VP. Globalement, elle semble diminuer l'amplitude des transitoires calciques de façon plus importante que dans les CM d'OG.

Les *sparks* calciques spontanés sont plus fréquents dans les CM de VP que dans les CM d'OG, que ce soit chez les rats jeunes ou chez les rats âgés et hypertendus, ainsi qu'en présence de noradrénaline. Ils pourraient donc être la cause de la plus grande fréquence des *waves* calciques observées dans les CM de VP par rapport aux CM d'OG. Ces *waves* plus fréquentes pourraient à leur tour être une des causes du plus grand potentiel arythmogène des CM de VP par rapport aux CM d'OG.

Le développement de SarcOptiM a permis de caractériser la fonction contractile des cardiomyocytes isolés de VP et de la comparer à celle des CM d'OG. A l'image de leurs transitoires calciques, les CM isolés de VP ont une amplitude de contraction en moyenne plus grande et surtout beaucoup plus hétérogène que ceux d'OG. Cette hétérogénéité de contraction des CM isolés de VP pourrait représenter une source d'arythmie si elle s'avérait également manifeste au niveau tissulaire.

Ce travail a donc permis de caractériser une partie du cycle du calcium des CM de VP chez le rat, d'identifier des différences structurelles et fonctionnelles entre ce type de CM et ceux bien caractérisés d'OG et de VG, et de mettre en évidence la forte hétérogénéité des CM de VP qui pourrait constituer une source potentielle d'arythmie.

II. Perspectives

L'étude du caractère arythmogène des CM de VP initiée dans ce travail pourra être poursuivie selon deux axes majeurs :

- la dynamique calcique spontanée ;
- l'hétérogénéité de la population des CM dans la VP.

La plus grande fréquence des événements calciques spontanés observée dans les cardiomyocytes de VP pourrait, comme dans les cardiomyocytes ventriculaires, contribuer au déclenchement d'arythmies. Leur étude devra donc être poursuivie dans les tissus entiers. Parallèlement, l'aptitude des *waves* à générer des activités électriques devra être examinée, en analysant par exemple l'impact des *waves* sur le potentiel électrique membranaire. Pour cela, la caractérisation du fonctionnement du NCX et l'étude des courants chlorure activés par le calcium seront essentielles.

Si le caractère arythmogène des libérations calciques spontanées des CM de VP est avéré, la détermination de l'origine de leur fréquence plus élevée dans la VP pourra être envisagée. En effet, bien que le bon couplage RyR2-Cav1.2 puisse en être une des causes, il est peu probable que ce soit la seule. La poursuite de cette étude pourrait donc permettre l'identification de cibles pharmacologiques en vue de diminuer leur fréquence et donc éventuellement de diminuer l'incidence des arythmies déclenchées dans la VP.

L'impact fonctionnel de l'hétérogénéité de la population des CM de la VP devra maintenant être étudié à l'échelle du tissu entier. Il s'agira notamment d'étudier la variabilité des transitoires calciques et de la contraction dans différentes zones de ce tissu et en particulier à l'interface VP-OG. Ces travaux plus intégrés permettront une compréhension plus précise de la dynamique calcique du tissu entier. En effet, compte tenu de la variabilité des CM, il est actuellement difficile de prédire la réponse du tissu au regard de celle d'un ou plusieurs CM individuels.

Ce travail sur tissu entier pourra être étendu à l'étude de la conduction électrique entre VP et OG, pour détecter une possible anisotropie de conduction associée à l'hétérogénéité et à l'organisation particulière des CM au sein du tissu (*e.g.* orientation des fibres myocardiques, îlots). Pour aller plus loin, les expériences réalisées lors de ce travail pourraient être reproduites chez des modèles de gros animaux. S'il existe une hétérogénéité similaire dans ces modèles, ils pourraient permettre l'étude de phénomènes de type réentrée, qui n'est pas possible chez le rat compte tenu de la longueur du circuit de conduction électrique dans l'OG et les VP et de la période réfractaire de leurs CM.

La plupart des expériences réalisées chez des animaux sains et jeunes *a priori* peu exposés au risque d'arythmie ont apporté des connaissances sur la dynamique calcique « physiologique » des CM de VP. Ils peuvent désormais fournir des éléments de comparaison pour des études sur animaux pathologiques. Néanmoins, ils ne peuvent que permettre l'émission d'hypothèses sur le fonctionnement calcique possible des CM de VP chez l'Homme. En effet, le fonctionnement de certains éléments du cycle du calcium tels que la part relative des

mécanismes de diminution du calcium cytoplasmique est légèrement différent dans les CM ventriculaires de rat et d'humain (Fearnley, Roderick, et Bootman 2011). Il est donc possible qu'il en soit de même pour les CM de VP. Seul un travail sur des CM isolés de VP humaine permettra de franchir cette dernière limite.

BIBLIOGRAPHIE

- Allessie, Maurits, Jannie Ausma, et Ulrich Schotten. 2002. « Electrical, Contractile and Structural Remodeling during Atrial Fibrillation ». *Cardiovascular Research* 54 (2): 230-46.
- Ambudkar, I. S., et A. E. Shamoo. 1984. « Role of Phospholamban in Regulating Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump ». *Membrane Biochemistry* 5 (2): 119-30.
- Anderson, Robert H, et Siew Yen Ho. 2004. « “Specialized” conducting cells in the pulmonary veins ». *Journal Of Cardiovascular Electrophysiology* 15 (1): 121; author reply 121-3.
- Anter, Elad, Mariell Jessup, et David J. Callans. 2009. « Atrial Fibrillation and Heart Failure Treatment Considerations for a Dual Epidemic ». *Circulation* 119 (18): 2516-25. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821306.
- Arora, Rishi, Sander Verheule, Luis Scott, Antonio Navarrete, Vikram Katari, Emily Wilson, Dev Vaz, et Jeffrey E. Olgin. 2003. « Arrhythmogenic Substrate of the Pulmonary Veins Assessed by High-Resolution Optical Mapping ». *Circulation* 107 (13): 1816-21. doi:10.1161/01.CIR.0000058461.86339.7E.
- Asahi, Michio, Kinya Otsu, Hiroyuki Nakayama, Shungo Hikoso, Toshihiro Takeda, Anthony O. Gramolini, Maria G. Trivieri, et al. 2004. « Cardiac-Specific Overexpression of Sarcolipin Inhibits Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) Activity and Impairs Cardiac Function in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (25): 9199-9204. doi:10.1073/pnas.0402596101.
- Asahi, Michio, Yuji Sugita, Kazimierz Kurzydowski, Stella De Leon, Michihiko Tada, Chikashi Toyoshima, et David H. MacLennan. 2003. « Sarcolipin Regulates Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by Binding to Transmembrane Helices Alone or in Association with Phospholamban ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (9): 5040-45. doi:10.1073/pnas.0330962100.
- Ausma, J, N Litjens, M H Lenders, H Duimel, F Mast, L Wouters, F Ramaekers, M Allessie, et M Borgers. 2001. « Time Course of Atrial Fibrillation-Induced Cellular Structural Remodeling in Atria of the Goat ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33 (12): 2083-94. doi:10.1006/jmcc.2001.1472.
- Ausma, J, M Wijffels, F Thoné, L Wouters, M Allessie, et M Borgers. 1997. « Structural Changes of Atrial Myocardium due to Sustained Atrial Fibrillation in the Goat ». *Circulation* 96 (9): 3157-63.
- Aviles, Ronnier J, David O Martin, Carolyn Apperson-Hansen, Penny L Houghtaling, Pentti Rautaharju, Richard A Kronmal, Russell P Tracy, et al. 2003. « Inflammation as a Risk Factor for Atrial Fibrillation ». *Circulation* 108 (24): 3006-10. doi:10.1161/01.CIR.0000103131.70301.4F.
- Babu, Gopal J, Poornima Bhupathy, Cynthia A Carnes, George E Billman, et Muthu Periasamy. 2007. « Differential Expression of Sarcolipin Protein during Muscle Development and Cardiac Pathophysiology ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43 (2): 215-22. doi:10.1016/j.jmcc.2007.05.009.
- Babuty, D., J. Argibay, et S. Hatem. 2008. « Électrophysiologie cardiaque ». *EMC - Cardiologie* 3 (3): 1-18. doi:10.1016/S1166-4568(08)47035-3.
- Bassani, J W, R A Bassani, et D M Bers. 1994. « Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. » *The Journal of Physiology* 476 (2): 279-93.
- Bassani, R A, J W Bassani, et D M Bers. 1992. « Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. » *The Journal of Physiology* 453: 591-608.
- Bean, B P. 1985. « Two Kinds of Calcium Channels in Canine Atrial Cells. Differences in Kinetics, Selectivity, and Pharmacology ». *The Journal of General Physiology* 86 (1): 1-30.
- Beavers, David L., Wei Wang, Sameer Ather, Niels Voigt, Alejandro Garbino, Sayali S. Dixit, Andrew P. Landstrom, et al. 2013. « Mutation E169K in Junctophilin-2 Causes Atrial Fibrillation Due to Impaired RyR2 Stabilization ». *Journal of the American College of Cardiology* 62 (21): 2010-19. doi:10.1016/j.jacc.2013.06.052.
- Berlin, J. R., M. B. Cannell, et W. J. Lederer. 1989. « Cellular Origins of the Transient Inward Current in Cardiac Myocytes. Role of Fluctuations and Waves of Elevated Intracellular Calcium ». *Circulation Research* 65 (1): 115-26.
- Bers, Donald M. 2000. « Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction ». *Circulation Research* 87 (4): 275-81. doi:10.1161/01.RES.87.4.275.

- Bers, Donald M. 2004. « Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (2): 417-29. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.026.
- Bettoni, Marco, et Marc Zimmermann. 2002. « Autonomic Tone Variations before the Onset of Paroxysmal Atrial Fibrillation ». *Circulation* 105 (23): 2753-59.
- Bhogal, M S, et J Colyer. 1998. « Depletion of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle prompts phosphorylation of phospholamban to stimulate store refilling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (4): 1484-89.
- Blayney, Lynda M., et F. Anthony Lai. 2009. « Ryanodine receptor-mediated arrhythmias and sudden cardiac death ». *Pharmacology & Therapeutics* 123 (2): 151-77. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.03.006.
- Boknik, Peter, Claus Unkel, Uwe Kirchhefer, Ulrich Kleideiter, Oliver Klein-Wiele, Jörg Knapp, Bettina Linck, et al. 1999. « Regional Expression of Phospholamban in the Human Heart ». *Cardiovascular Research* 43 (1): 67-76. doi:10.1016/S0008-6363(99)00053-X.
- Bonvallet, R., et O. Rougier. 1989. « Existence of two calcium currents recorded at normal calcium concentrations in single frog atrial cells ». *Cell Calcium* 10 (7): 499-508. doi:10.1016/0143-4160(89)90027-4.
- Bornstein, M. B. 1958. « Reconstituted Rattail Collagen Used as Substrate for Tissue Cultures on Coverslips in Maximow Slides and Roller Tubes ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 7 (2): 134-37.
- Bosch, Ralph F., Xiaorong Zeng, Joachim B. Grammer, Katarina Popovic, Christian Mewis, et Volker Kühlkamp. 1999. « Ionic Mechanisms of Electrical Remodeling in Human Atrial Fibrillation ». *Cardiovascular Research* 44 (1): 121-31. doi:10.1016/S0008-6363(99)00178-9.
- Boyden, Penelope A, Wen Dun, et Bruno D Stuyvers. 2015. « What is a Ca²⁺ wave? Is it like an Electrical Wave? » *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 4 (1): 35-39. doi:10.15420/aer.2015.4.1.35.
- Bradford, M. M. 1976. « A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding ». *Analytical Biochemistry* 72 (mai): 248-54.
- Brandt, P W, F Colomo, N Piroddi, C Poggesi, et C Tesi. 1998. « Force regulation by Ca²⁺ in skinned single cardiac myocytes of frog. » *Biophysical Journal* 74 (4): 1994-2004.
- Braunwald, Eugene. 2013. « Heart Failure ». *JACC: Heart Failure* 1 (1): 1-20. doi:10.1016/j.jchf.2012.10.002.
- Brette, Fabien, Sanda Despa, Donald M. Bers, et Clive H. Orchard. 2005. « Spatiotemporal characteristics of SR Ca²⁺ uptake and release in detubulated rat ventricular myocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39 (5): 804-12. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.08.005.
- Brette, Fabien, et Clive Orchard. 2003. « T-tubule function in mammalian cardiac myocytes ». *Circulation Research* 92 (11): 1182-92. doi:10.1161/01.RES.0000074908.17214.FD.
- Brette, F, P Rodriguez, K Komukai, J Colyer, et C H Orchard. 2004. « Beta-Adrenergic Stimulation Restores the Ca Transient of Ventricular Myocytes Lacking T-Tubules ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36 (2): 265-75. doi:10.1016/j.yjmcc.2003.11.002.
- Brillantes, A B, K Ondrias, A Scott, E Kobrinsky, E Ondriasová, M C Moschella, T Jayaraman, M Landers, B E Ehrlich, et A R Marks. 1994. « Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein ». *Cell* 77 (4): 513-23.
- Bronquard, Cécile, Véronique Maupoil, Brigitte Arbeille, Franck Fetissof, Ian Findlay, Pierre Cosnay, et Jean-Louis Freslon. 2007. « Contractile and Relaxant Properties of Rat-Isolated Pulmonary Veins Related to Localization and Histology ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21 (1): 55–65. doi:10.1111/j.1472-8206.2006.00457.x.
- Camors, Emmanuel, Peter J Mohler, Donald M Bers, et Sanda Despa. 2012. « Ankyrin-B reduction enhances Ca spark-mediated SR Ca release promoting cardiac myocyte arrhythmic activity ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52 (6): 1240-48. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.02.010.
- Cannell, M B, H Cheng, et W J Lederer. 1994. « Spatial non-uniformities in [Ca²⁺]_i during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. » *Biophysical Journal* 67 (5): 1942-56.

- Carneiro-Júnior, M.A., J.F. Quintão-Júnior, L.R. Drummond, V.N. Lavorato, F.R. Drummond, M.A. Amadeu, E.M. Oliveira, *et al.* 2014. « Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47 (11): 960-65. doi:10.1590/1414-431X20144063.
- Cazorla, O., A. Freiburg, M. Helmes, T. Centner, M. McNabb, Y. Wu, K. Trombitás, S. Labeit, et H. Granzier. 2000. « Differential Expression of Cardiac Titin Isoforms and Modulation of Cellular Stiffness ». *Circulation Research* 86 (1): 59-67. doi:10.1161/01.RES.86.1.59.
- Cha, Tae-Joon, Joachim R. Ehrlich, Denis Chartier, Xiao-Yan Qi, Ling Xiao, et Stanley Nattel. 2006. « Kir3-Based Inward Rectifier Potassium Current: Potential Role in Atrial Tachycardia Remodeling Effects on Atrial Repolarization and Arrhythmias ». *Circulation* 113 (14): 1730-37. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561738.
- Charlemagne, Agnès, Jacques Blacher, Ariel Cohen, Jean-Philippe Collet, François Diévert, Pascal de Groote, Olivier Hanon, *et al.* 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): 115-24. doi:10.1016/j.acvd.2010.11.012.
- Chase, Anabelle, et Clive H. Orchard. 2011. « Ca efflux via the sarcolemmal Ca ATPase occurs only in the t-tubules of rat ventricular myocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (1): 187-93. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.012.
- Chelu, Mihail G., Satyam Sarma, Subeena Sood, Sufen Wang, Ralph J. van Oort, Darlene G. Skapura, Na Li, *et al.* 2009. « Calmodulin Kinase II-Mediated Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak Promotes Atrial Fibrillation in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1940-51.
- Chen, Yao-Chang, Shih-Ann Chen, Yi-Jen Chen, Mau-Song Chang, Paul Chan, et Cheng-I Lin. 2002. « Effects of thyroid hormone on the arrhythmogenic activity of pulmonary vein cardiomyocytes ». *Journal of the American College of Cardiology* 39 (2): 366-72. doi:10.1016/S0735-1097(01)01731-4.
- Chen, Yi-Jen, Shih-Ann Chen, Yao-Chang Chen, Hung-I. Yeh, Paul Chan, Mau-Song Chang, et Cheng-I Lin. 2001. « Effects of Rapid Atrial Pacing on the Arrhythmogenic Activity of Single Cardiomyocytes From Pulmonary Veins Implication in Initiation of Atrial Fibrillation ». *Circulation* 104 (23): 2849-54. doi:10.1161/hc4801.099736.
- Cheng, H., M. R. Lederer, W. J. Lederer, et M. B. Cannell. 1996. « Calcium Sparks and [Ca²⁺]_i Waves in Cardiac Myocytes ». *The American Journal of Physiology* 270 (1 Pt 1): C148-159.
- Cheng, H., W. J. Lederer, et M. B. Cannell. 1993. « Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle ». *Science (New York, N.Y.)* 262 (5134): 740-44.
- Cheng, Heping, et W. J. Lederer. 2008. « Calcium Sparks ». *Physiological Reviews* 88 (4): 1491-1545. doi:10.1152/physrev.00030.2007.
- Chou, Chung-Chuan, Motoki Nihei, Shengmei Zhou, Alex Tan, Ayaka Kawase, Edgar S. Macias, Michael C. Fishbein, Shien-Fong Lin, et Peng-Sheng Chen. 2005. « Intracellular Calcium Dynamics and Anisotropic Reentry in Isolated Canine Pulmonary Veins and Left Atrium ». *Circulation* 111 (22): 2889-97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.498758.
- Christ, T., P. Boknik, S. Wöhrle, E. Wettwer, E. M. Graf, R. F. Bosch, M. Knaut, W. Schmitz, U. Ravens, et D. Dobrev. 2004. « L-Type Ca²⁺ Current Downregulation in Chronic Human Atrial Fibrillation Is Associated with Increased Activity of Protein Phosphatases ». *Circulation* 110 (17): 2651-57. doi:10.1161/01.CIR.0000145659.80212.6A.
- Chung, Charles S, et Kenneth S Campbell. 2013. « Temperature and transmural region influence functional measurements in unloaded left ventricular cardiomyocytes ». *Physiological Reports* 1 (6). doi:10.1002/phy2.158.
- Collins, Helen E., et Glenn C. Rodrigo. 2010. « Inotropic Response of Cardiac Ventricular Myocytes to β -Adrenergic Stimulation With Isoproterenol Exhibits Diurnal Variation Involvement of Nitric Oxide ». *Circulation Research* 106 (7): 1244-52. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213942.
- Collins, Thomas P., Rebecca Bayliss, Grant C. Churchill, Antony Galione, et Derek A. Terrar. 2011. « NAADP influences excitation-contraction coupling by releasing calcium from lysosomes in atrial myocytes ». *Cell Calcium* 50 (5): 449-58. doi:10.1016/j.ceca.2011.07.007.

- Coutu, Pierre, Denis Chartier, et Stanley Nattel. 2006. « Comparison of Ca²⁺-Handling Properties of Canine Pulmonary Vein and Left Atrial Cardiomyocytes ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 291 (5): H2290-2300. doi:10.1152/ajpheart.00730.2005.
- Coyne, Karin S., Clark Paramore, Susan Grandy, Marco Mercader, Matthew Reynolds, et Peter Zimetbaum. 2006. « Assessing the Direct Costs of Treating Nonvalvular Atrial Fibrillation in the United States ». *Value in Health: The Journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* 9 (5): 348-56. doi:10.1111/j.1524-4733.2006.00124.x.
- Curran, Jerry, Kathy Hayes Brown, Demetrio J. Santiago, Steve Pogwizd, Donald M. Bers, et Thomas R. Shannon. 2010. « Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (1): 25-32. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.03.013.
- DiFrancesco, Dario, et Denis Noble. 2012. « The Funny Current Has a Major Pacemaking Role in the Sinus Node ». *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society* 9 (2): 299-301. doi:10.1016/j.hrthm.2011.09.021.
- Doisne, Nicolas. 2009. « Caractérisation de l'activité automatique catécholaminergique au niveau de la veine pulmonaire du rat: rôle des récepteurs Alpha 1 Adrénérgiques ». Tours. <http://www.theses.fr/2009TOUR4042>.
- Doisne, Nicolas, Véronique Maupoil, Pierre Cosnay, et Ian Findlay. 2009. « Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein: electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (1): H102-108. doi:10.1152/ajpheart.00256.2009.
- Dzeshka, Mikhail S., Gregory Y. H. Lip, Viktor Snezhitskiy, et Eduard Shantsila. 2015. « Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation: Mechanisms and Clinical Implications ». *Journal of the American College of Cardiology* 66 (8): 943-59. doi:10.1016/j.jacc.2015.06.1313.
- Ehrlich, Joachim R., Tae-Joon Cha, Liming Zhang, Denis Chartier, Peter Melnyk, Stefan H. Hohnloser, et Stanley Nattel. 2003. « Cellular Electrophysiology of Canine Pulmonary Vein Cardiomyocytes: Action Potential and Ionic Current Properties ». *The Journal of Physiology* 551 (3): 801-13. doi:10.1113/jphysiol.2003.046417.
- Fabiato, A. 1983. « Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum ». *The American journal of physiology* 245 (1): C1-14.
- . 1988. « Computer Programs for Calculating Total from Specified Free or Free from Specified Total Ionic Concentrations in Aqueous Solutions Containing Multiple Metals and Ligands ». *Methods in Enzymology* 157: 378-417.
- Farrell, Emily F., Anaid Antaramian, Angelica Rueda, Ana M. Gómez, et Héctor H. Valdivia. 2003. « Sorcin Inhibits Calcium Release and Modulates Excitation-Contraction Coupling in the Heart ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34660-66. doi:10.1074/jbc.M305931200.
- Faucher, Fabien. 2008. « Aspects inattendus de la stimulation β -adrénergique sur les cardiomyocytes ventriculaires, auriculaires et de veines pulmonaires. » Université de Tours.
- Fearnley, Claire J., H. Llewelyn Roderick, et Martin D. Bootman. 2011. « Calcium Signaling in Cardiac Myocytes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (11). doi:10.1101/cshperspect.a004242.
- Ferron, Laurent, Véronique Capuano, Edith Deroubaix, Alain Coulombe, et Jean-François Renaud. 2002. « Functional and Molecular Characterization of a T-type Ca²⁺ Channel During Fetal and Postnatal Rat Heart Development ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34 (5): 533-46. doi:10.1006/jmcc.2002.1535.
- Frisk, Michael, Jussi Koivumaki, Per Andreas Norseng, Molly M. Maleckar, Ole M. Sejersted, et William E. Louch. 2014. « Variable T-Tubule Organization and Ca²⁺ Homeostasis across the Atria ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, juin. doi:10.1152/ajpheart.00295.2014.
- Gage, Brian F., Yan Yan, Paul E. Milligan, Amy D. Waterman, Robert Culverhouse, Michael W. Rich, et Martha J. Radford. 2006. « Clinical Classification Schemes for Predicting Hemorrhage: Results from the National Registry of Atrial Fibrillation (NRAF) ». *American Heart Journal* 151 (3): 713-19. doi:10.1016/j.ahj.2005.04.017.

- Gannier, F, J C Bernengo, V Jacquemond, et D Garnier. 1993. « Measurements of Sarcomere Dynamics Simultaneously with Auxotonic Force in Isolated Cardiac Cells ». *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 40 (12): 1226-32. doi:10.1109/10.250578.
- George, Christopher H., Hala Jundi, N. Lowri Thomas, Debra L. Fry, et F. Anthony Lai. 2007. « Ryanodine receptors and ventricular arrhythmias: Emerging trends in mutations, mechanisms and therapies ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42 (1): 34-50. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.08.115.
- Gherghiceanu, Mihaela, M. E. Hinescu, F. Andrei, E. Mandache, C. E. Macarie, Maria-Simonetta Fausson-Pellegrini, et L. M. Popescu. 2008. « Interstitial Cajal-like Cells (ICLC) in Myocardial Sleeves of Human Pulmonary Veins ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (5A): 1777-81. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00444.x.
- Goette, Andreas, Clegg Honeycutt, et Jonathan J. Langberg. 1996. « Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation Time Course and Mechanisms ». *Circulation* 94 (11): 2968-74. doi:10.1161/01.CIR.94.11.2968.
- Gomez-Hurtado, Nieves, et Björn C Knollmann. 2014. « Calcium in atrial fibrillation - pulling the trigger or not? » *The Journal Of Clinical Investigation* 124 (11): 4684-86. doi:10.1172/JCI77986.
- Guatimosim, Silvia, Cristina Guatimosim, et Long-Sheng Song. 2011. « Imaging Calcium Sparks in Cardiac Myocytes ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 689: 205-14. doi:10.1007/978-1-60761-950-5_12.
- Gudbjartsson, Daniel F., David O. Arnar, Anna Helgadóttir, Solveig Gretarsdóttir, Hilma Holm, Asgeir Sigurdsson, Adalbjorg Jonasdóttir, et al. 2007. « Variants Conferring Risk of Atrial Fibrillation on Chromosome 4q25 ». *Nature* 448 (7151): 353-57. doi:10.1038/nature06007.
- Guinamard, Romain, Aurélien Chatelier, Marie Demion, Daniel Potreau, Sylvie Patri, Mohammad Rahmati, et Patrick Bois. 2004. « Functional Characterization of a Ca²⁺-Activated Non-Selective Cation Channel in Human Atrial Cardiomyocytes ». *The Journal of Physiology* 558 (1): 75-83. doi:10.1113/jphysiol.2004.063974.
- Guo, Ang, et Long-Sheng Song. 2014. « AutoTT: Automated Detection and Analysis of T-Tubule Architecture in Cardiomyocytes ». *Biophysical Journal* 106 (12): 2729-36. doi:10.1016/j.bpj.2014.05.013.
- Gustavsson, Martin, Raffaello Verardi, Daniel G Mullen, Kaustubh R Mote, Nathaniel J Traaseth, T Gopinath, et Gianluigi Veglia. 2013. « Allosteric Regulation of SERCA by Phosphorylation-Mediated Conformational Shift of Phospholamban ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (43): 17338-43. doi:10.1073/pnas.1303006110.
- Haase, Hannelore. 2007. « Ahnak, a New Player in β -Adrenergic Regulation of the Cardiac L-Type Ca²⁺ Channel ». *Cardiovascular Research* 73 (1): 19-25. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.001.
- Haïssaguerre, Michel, Pierre Jaïs, Dipen C. Shah, Atsushi Takahashi, Méléze Hocini, Gilles Quiniou, Stéphane Garrigue, Alain Le Mouroux, Philippe Le Métayer, et Jacques Clémenty. 1998. « Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins ». *New England Journal of Medicine* 339 (10): 659-66. doi:10.1056/NEJM199809033391003.
- Hashizume, H, M Tango, et T Ushiki. 1998. « Three-Dimensional Cytoarchitecture of Rat Pulmonary Venous Walls: A Light and Scanning Electron Microscopic Study ». *Anatomy and Embryology* 198 (6): 473-80.
- Hatem, S. 2014. « Canaux potassiques : acteurs essentiels de la plasticité cardiaque ». *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux - Pratique* 2014 (227): 33-37. doi:10.1016/S1261-694X(14)70622-4.
- Hatem, Stephane N., Agnes Benardeau, Catherine Rucker-Martin, Isabelle Marty, Patricia de Chamisso, Michel Villaz, et Jean-Jacques Mercadier. 1997. « Different Compartments of Sarcoplasmic Reticulum Participate in the Excitation-Contraction Coupling Process in Human Atrial Myocytes ». *Circulation Research* 80 (3): 345-53. doi:10.1161/01.RES.80.3.345.
- Haute Autorité de Santé. 2014. « Guide parcours de soins Fibrillation atriale ». In . http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1741768/fr/guide-parcours-de-soins-fibrillation-atriale.
- Healey, Jeff S., Stuart J. Connolly, Michael R. Gold, Carsten W. Israel, Isabelle C. Van Gelder, Alessandro Capucci, C. P. Lau, et al. 2012. « Subclinical Atrial Fibrillation and the Risk of

- Stroke ». *The New England Journal of Medicine* 366 (2): 120-29. doi:10.1056/NEJMoal105575.
- Helmes, Michiel, Ka'roly Trombita's, et Henk Granzier. 1996. « Titin Develops Restoring Force in Rat Cardiac Myocytes ». *Circulation Research* 79 (3): 619-26. doi:10.1161/01.RES.79.3.619.
- Herchuelz, A, F Van Eylen, et P Lebrun. 2013. « L'échange Na/Ca ». *médecine/sciences* 11 (2): 232. doi:10.4267/10608/2190.
- Hervé, J. -C., et M. Derangeon. 2013. « Connexines et conduction cardiaque ». *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux - Pratique* 2013 (216): 23-27. doi:10.1016/S1261-694X(13)70481-4.
- « High Frequency IDS Camera Capture plugin for ImageJ ». 2016. Consulté le août 8. http://pccv.univ-tours.fr/ImageJ/HF_IDS_Cam/.
- Hocini, Méléze, Siew Y. Ho, Tokuhiro Kawara, André C. Linnenbank, Mark Potse, Dipen Shah, Pierre Jaïs, Michiel J. Janse, Michel Haïssaguerre, et Jacques M. T. de Bakker. 2002. « Electrical Conduction in Canine Pulmonary Veins Electrophysiological and Anatomic Correlation ». *Circulation* 105 (20): 2442-48. doi:10.1161/01.CIR.0000016062.80020.11.
- Hoeker, Gregory S., Rodolphe P. Katra, Lance D. Wilson, Bradley N. Plummer, et Kenneth R. Laurita. 2009. « Spontaneous Calcium Release in Tissue from the Failing Canine Heart ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (4): H1235-1242. doi:10.1152/ajpheart.01320.2008.
- Hong, Kui, Preben Bjerregaard, Ihor Gussak, et Ramon Brugada. 2005. « Short QT Syndrome and Atrial Fibrillation Caused by Mutation in KCNH2 ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 16 (4): 394-96. doi:10.1046/j.1540-8167.2005.40621.x.
- Honjo, Haruo, Mark R. Boyett, Ryoko Niwa, Shin Inada, Mitsuru Yamamoto, Kazuyuki Mitsui, Toshiyuki Horiuchi, Nitaro Shibata, Kaichiro Kamiya, et Itsuo Kodama. 2003. « Pacing-Induced Spontaneous Activity in Myocardial Sleeves of Pulmonary Veins After Treatment With Ryanodine ». *Circulation* 107 (14): 1937-43. doi:10.1161/01.CIR.0000062645.38670.BD.
- Hove-Madsen, Leif, Anna Llach, Antoni Bayes-Genís, Santiago Roura, Enrique Rodriguez Font, Alejandro Arís, et Juan Cinca. 2004. « Atrial Fibrillation Is Associated with Increased Spontaneous Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum in Human Atrial Myocytes ». *Circulation* 110 (11): 1358-63. doi:10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87.
- Howlett, Susan E., Scott A. Grandy, et Gregory R. Ferrier. 2006. « Calcium Spark Properties in Ventricular Myocytes Are Altered in Aged Mice ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290 (4): H1566-74. doi:10.1152/ajpheart.00686.2005.
- Huser, J, S L Lipsius, et L A Blatter. 1996. « Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. » *The Journal of Physiology* 494 (Pt 3): 641-51.
- Ishii, Yosuke, Richard B Schuessler, Sydney L Gaynor, Kiyomi Yamada, Annabel S Fu, John P Boineau, et Ralph J Damiano Jr. 2005. « Inflammation of Atrium after Cardiac Surgery Is Associated with Inhomogeneity of Atrial Conduction and Atrial Fibrillation ». *Circulation* 111 (22): 2881-88. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.475194.
- Jaïs, Pierre, Méléze Hocini, Laurent Macle, Kee-Joon Choi, Isabel Deisenhofer, Rukshen Weerasooriya, Dipen C. Shah, et al. 2002. « Distinctive Electrophysiological Properties of Pulmonary Veins in Patients With Atrial Fibrillation ». *Circulation* 106 (19): 2479-85. doi:10.1161/01.CIR.0000036744.39782.9F.
- Jones, Sandra A., Mitsuru Yamamoto, James O. Tellez, Rudi Billeter, Mark R. Boyett, Haruo Honjo, et Matthew K. Lancaster. 2008. « Distinguishing Properties of Cells From the Myocardial Sleeves of the Pulmonary Veins CLINICAL PERSPECTIVE A Comparison of Normal and Abnormal Pacemakers ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1 (1): 39-48. doi:10.1161/CIRCEP.107.748467.
- Jones, W. K., A. Sánchez, et J. Robbins. 1994. « Murine Pulmonary Myocardium: Developmental Analysis of Cardiac Gene Expression ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 200 (2): 117-28. doi:10.1002/aja.1002000204.
- Kääb, Stefan, Dawood Darbar, Charlotte van Noord, Josée Dupuis, Arne Pfeufer, Christopher Newton-Cheh, Renate Schnabel, et al. 2009. « Large Scale Replication and Meta-Analysis of Variants on Chromosome 4q25 Associated with Atrial Fibrillation ». *European Heart Journal* 30 (7): 813-19. doi:10.1093/eurheartj/ehn578.

- Kallergis, E M, E G Manios, E M Kanoupakis, H E Mavrakis, S G Kolyvaki, G M Lyrarakis, G I Chlouverakis, et P E Vardas. 2008. « The Role of the Post-Cardioversion Time Course of Hs-CRP Levels in Clarifying the Relationship between Inflammation and Persistence of Atrial Fibrillation ». *Heart (British Cardiac Society)* 94 (2): 200-204. doi:10.1136/hrt.2006.108688.
- Kamp, Timothy J., et Johannes W. Hell. 2000. « Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C ». *Circulation Research* 87 (12): 1095-1102. doi:10.1161/01.RES.87.12.1095.
- Kato, Ritsushi, Lars Lickfett, Glenn Meininger, Timm Dickfeld, Richard Wu, George Juang, Piamsook Angkeow, et al. 2003. « Pulmonary Vein Anatomy in Patients Undergoing Catheter Ablation of Atrial Fibrillation Lessons Learned by Use of Magnetic Resonance Imaging ». *Circulation* 107 (15): 2004-10. doi:10.1161/01.CIR.0000061951.81767.4E.
- Keogh, Claire, Emma Wallace, Ciara Dillon, Borislav D. Dimitrov, et Tom Fahey. 2011. « Validation of the CHADS2 Clinical Prediction Rule to Predict Ischaemic Stroke. A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Thrombosis and Haemostasis* 106 (3): 528-38. doi:10.1160/TH11-02-0061.
- Ter Keurs, Henk E. D. J., et Penelope A. Boyden. 2007. « Calcium and Arrhythmogenesis ». *Physiological Reviews* 87 (2): 457-506. doi:10.1152/physrev.00011.2006.
- Kirk, Malcolm M, Leighton T Izu, Ye Chen-Izu, Stacey L McCulle, W Gil Wier, C William Balke, et Stephen R Shorofsky. 2003. « Role of the transverse-axial tubule system in generating calcium sparks and calcium transients in rat atrial myocytes ». *The Journal of Physiology* 547 (Pt 2): 441-51. doi:10.1113/jphysiol.2002.034355.
- Kranias, Evangelia G., et Roger J. Hajjar. 2012. « Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome ». *Circulation Research* 110 (12): 1646-60. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259754.
- Kumagai, Koichiro, Masahiro Ogawa, Hiroo Noguchi, Tomoo Yasuda, Hideko Nakashima, et Keijiro Saku. 2004. « Electrophysiologic Properties of Pulmonary Veins Assessed Using a Multielectrode Basket Catheter ». *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12): 2281-89. doi:10.1016/j.jacc.2004.01.051.
- Lacolley, Patrick. 2007. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*. John Libbey Eurotext.
- Lakatta, Edward G., et Dario DiFrancesco. 2009. « What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 (2): 157-70. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.022.
- Lee, K S, E Marban, et R W Tsien. 1985. « Inactivation of Calcium Channels in Mammalian Heart Cells: Joint Dependence on Membrane Potential and Intracellular Calcium ». *The Journal of Physiology* 364 (juillet): 395-411.
- Leenhardt, A., A. Messali, J.-P. Labbé, I. Denjoy, P. DeJode, P. Maison-Blanche, A. Kedra, et F. Extramiana. 2011. « Les post-dépolarisations ». *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 3 (3): 189-94. doi:10.1016/S1878-6480(11)70389-5.
- Legato, Marianne J. 1973. « Ultrastructure of the Atrial, Ventricular, and Purkinje Cell, with Special Reference to the Genesis of Arrhythmias ». *Circulation* 47 (1): 178-89. doi:10.1161/01.CIR.47.1.178.
- Lehnart, Stephan E., Xander H.T. Wehrens, et Andrew R. Marks. 2004. « Calstabin deficiency, ryanodine receptors, and sudden cardiac death ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (4): 1267-79. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.032.
- Leroy, J, et R Fischmeister. 2015. « CaV1.2 and β -Adrenergic Regulation of Cardiac Function ». <http://clinicalgate.com/cav1-2-and-%CE%B2-adrenergic-regulation-of-cardiac-function/>.
- Leuranguer, Valérie, Arnaud Monteil, Emmanuel Bourinet, Govindan Dayanithi, et Joël Nargeot. 2000. « T-Type Calcium Currents in Rat Cardiomyocytes during Postnatal Development: Contribution to Hormone Secretion ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 279 (5): H2540-48.
- Levi, A J, K W Spitzer, O Kohmoto, et J H Bridge. 1994. « Depolarization-Induced Ca Entry via Na-Ca Exchange Triggers SR Release in Guinea Pig Cardiac Myocytes ». *The American Journal of Physiology* 266 (4 Pt 2): H1422-1433.
- Lévy, S, M Maarek, P Coumel, L Guize, J Lekieffre, J L Medvedowsky, et A Sebaoun. 1999. « Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists ». *Circulation* 99 (23): 3028-35.

- Li, D., S. Fareh, T. K. Leung, et S. Nattel. 1999. « Promotion of Atrial Fibrillation by Heart Failure in Dogs: Atrial Remodeling of a Different Sort ». *Circulation* 100 (1): 87-95.
- Li, D., K. Shinagawa, L. Pang, T. K. Leung, S. Cardin, Z. Wang, et S. Nattel. 2001. « Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on the Development of the Atrial Fibrillation Substrate in Dogs with Ventricular Tachypacing-Induced Congestive Heart Failure ». *Circulation* 104 (21): 2608-14.
- Li, Y., D. A. Eisner, et S. C. O'Neill. 2012. « Do Calcium Waves Propagate between Cells and Synchronize Alternating Calcium Release in Rat Ventricular Myocytes? » *The Journal of Physiology* 590 (24): 6353-61. doi:10.1113/jphysiol.2012.245241.
- Li, Yingxin, Fang Wang, Xiaoying Zhang, Zhao Qi, Mingxin Tang, Christopher Szeto, Ying Li, Hongyu Zhang, et Xiongwen Chen. 2012. « β -Adrenergic Stimulation Increases Cav3.1 Activity in Cardiac Myocytes through Protein Kinase A ». *PloS One* 7 (7): e39965. doi:10.1371/journal.pone.0039965.
- Lipp, P., et E. Niggli. 1998. « Fundamental Calcium Release Events Revealed by Two-Photon Excitation Photolysis of Caged Calcium in Guinea-Pig Cardiac Myocytes ». *The Journal of Physiology* 508 (Pt 3) (mai): 801-9.
- Lipsitz, L. A., J. Y. Wei, et J. W. Rowe. 1985. « Syncope in an Elderly, Institutionalised Population: Prevalence, Incidence, and Associated Risk ». *The Quarterly Journal of Medicine* 55 (216): 45-54.
- Liu, B., D. D. Belke, et L. C. Wang. 1997. « Ca^{2+} Uptake by Cardiac Sarcoplasmic Reticulum at Low Temperature in Rat and Ground Squirrel ». *The American Journal of Physiology* 272 (4 Pt 2): R1121-1127.
- Logantha, Sunil Jit R. J., Stuart F. Cruickshank, Edward G. Rowan, et Robert M. Drummond. 2010. « Spontaneous and electrically evoked Ca^{2+} transients in cardiomyocytes of the rat pulmonary vein ». *Cell Calcium* 48 (2-3): 150-60. doi:10.1016/j.ceca.2010.08.002.
- Luo, Da-li, Jian Gao, Xiao-mei Lan, Gang Wang, Sheng Wei, Rui-ping Xiao, et Qi-de Han. 2006. « Role of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in $\alpha 1$ -Adrenergic Receptor-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy ». *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (7): 895-900. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00382.x.
- Lüss, Iva, Peter Boknik, Larry R. Jones, Uwe Kirchhefer, Jörg Knapp, Bettina Linck, Hartmut Lüss, et al. 1999. « Expression of Cardiac Calcium Regulatory Proteins in Atrium v Ventricle in Different Species ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31 (6): 1299-1314. doi:10.1006/jmcc.1999.0962.
- Mackenzie, Lauren, Martin D. Bootman, Michael J. Berridge, et Peter Lipp. 2001. « Predetermined Recruitment of Calcium Release Sites Underlies Excitation-contraction Coupling in Rat Atrial Myocytes ». *The Journal of Physiology* 530 (3): 417-29. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0417k.x.
- Mackenzie, Lauren, H. Llewelyn Roderick, Michael J. Berridge, Stuart J. Conway, et Martin D. Bootman. 2004. « The Spatial Pattern of Atrial Cardiomyocyte Calcium Signalling Modulates Contraction ». *Journal of Cell Science* 117 (26): 6327-37. doi:10.1242/jcs.01559.
- Mackiewicz, U., et B. Lewartowski. 2006. « Temperature Dependent Contribution of Ca^{2+} Transporters to Relaxation in Cardiac Myocytes: Important Role of Sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 57 (1): 3-15.
- Malécot, Claire O., Pierre Bredeloux, Ian Findlay, et Véronique Maupoil. 2015. « A TTX-Sensitive Resting Na^{+} Permeability Contributes to the Catecholaminergic Automatic Activity in Rat Pulmonary Vein ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 26 (3): 311-19. doi:10.1111/jce.12572.
- Malécot, Claire O., Côme Pasqualin, et Véronique Maupoil. 2016. « 0218 : Multiple components of voltage-activated calcium current in rat pulmonary vein cardiomyocytes ». *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, Printemps de la Cardiologie : Recherche Fondamentale et Clinique - Centre de Congrès Dijon, 7-8 avril 2016, 8 (3): 228. doi:10.1016/S1878-6480(16)30427-X.

- Marx, S O, S Reiken, Y Hisamatsu, T Jayaraman, D Burkhoff, N Rosembly, et A R Marks. 2000. « PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts ». *Cell* 101 (4): 365-76.
- Masani, F. 1986. « Node-like Cells in the Myocardial Layer of the Pulmonary Vein of Rats: An Ultrastructural Study ». *Journal of Anatomy* 145 (avril): 133-42.
- Mattiazzi, Alicia, Cecilia Mundiña-Weilenmann, Chu Guoxiang, Leticia Vittone, et Evangelia Kranias. 2005. « Role of Phospholamban Phosphorylation on Thr17 in Cardiac Physiological and Pathological Conditions ». *Cardiovascular Research* 68 (3): 366-75. doi:10.1016/j.cardiores.2005.08.010.
- Maupoil, V, C Bronquard, J-L Freslon, P Cosnay, et I Findlay. 2007. « Ectopic activity in the rat pulmonary vein can arise from simultaneous activation of alpha1- and beta1-adrenoceptors ». *British Journal of Pharmacology* 150 (7): 899-905. doi:10.1038/sj.bjp.0707177.
- McNutt, N. S., et D. W. Fawcett. 1969. « The Ultrastructure of the Cat Myocardium. II. Atrial Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 42 (1): 46-67.
- Melnyk, Peter, Joachim R. Ehrlich, Marc Pourrier, Louis Villeneuve, Tae-Joon Cha, et Stanley Nattel. 2005. « Comparison of Ion Channel Distribution and Expression in Cardiomyocytes of Canine Pulmonary Veins versus Left Atrium ». *Cardiovascular Research* 65 (1): 104-16. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.014.
- Miragoli, Michele, Nicolò Salvarani, et Stephan Rohr. 2007. « Myofibroblasts Induce Ectopic Activity in Cardiac Tissue ». *Circulation Research* 101 (8): 755-58. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160549.
- Miura, Masahito, Taichi Nishio, Taiki Hattori, Naomi Murai, Bruno D. Stuyvers, Chiyohiko Shindoh, et Penelope A. Boyden. 2010. « Effect of Nonuniform Muscle Contraction on Sustainability and Frequency of Triggered Arrhythmias in Rat Cardiac Muscle ». *Circulation* 121 (25): 2711-17. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.907717.
- Miura, Masahito, Yuji Wakayama, Hideaki Endoh, Makoto Nakano, Yoshinao Sugai, Masanori Hirose, Henk E. D. J. ter Keurs, et Hiroaki Shimokawa. 2008. « Spatial Non-Uniformity of Excitation-contraction Coupling Can Enhance Arrhythmogenic-Delayed Afterdepolarizations in Rat Cardiac Muscle ». *Cardiovascular Research* 80 (1): 55-61. doi:10.1093/cvr/cvn162.
- Miyasaka, Yoko, Marion E. Barnes, Bernard J. Gersh, Stephen S. Cha, Kent R. Bailey, James B. Seward, et Teresa S. M. Tsang. 2008. « Changing Trends of Hospital Utilization in Patients After their First Episode of Atrial Fibrillation ». *The American journal of cardiology* 102 (5): 568-72. doi:10.1016/j.amjcard.2008.04.025.
- Miyauchi, Yasushi, Hideki Hayashi, Mizuho Miyauchi, Yuji Okuyama, William J. Mandel, Peng-Sheng Chen, et Hrayr S. Karagueuzian. 2005. « Heterogeneous Pulmonary Vein Myocardial Cell Repolarization Implications for Reentry and Triggered Activity ». *Heart Rhythm* 2 (12): 1339-45. doi:10.1016/j.hrthm.2005.09.015.
- Mohanty, Sanghamitra, Pasquale Santangeli, Rong Bai, Luigi Di Biase, Prasant Mohanty, Agnes Pump, et Andrea Natale. 2013. « Variant rs2200733 on Chromosome 4q25 Confers Increased Risk of Atrial Fibrillation: Evidence from a Meta-Analysis ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 24 (2): 155-61. doi:10.1111/jce.12017.
- Mohler, Peter J., Jean-Jacques Schott, Anthony O. Gramolini, Keith W. Dilly, Silvia Guatimosim, William H. duBell, Long-Sheng Song, et al. 2003. « Ankyrin-B Mutation Causes Type 4 Long-QT Cardiac Arrhythmia and Sudden Cardiac Death ». *Nature* 421 (6923): 634-39. doi:10.1038/nature01335.
- Mommersteeg, Mathilda T. M., Nigel A. Brown, Owen W. J. Prall, Corrie de Gier-de Vries, Richard P. Harvey, Antoon F. M. Moorman, et Vincent M. Christoffels. 2007. « Pitx2c and Nkx2-5 Are Required for the Formation and Identity of the Pulmonary Myocardium ». *Circulation Research* 101 (9): 902-9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.161182.
- Morel, Elodie, David Meyronet, Françoise Thivolet-Bejuy, et Philippe Chevalier. 2008. « Identification and Distribution of Interstitial Cajal Cells in Human Pulmonary Veins ». *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society* 5 (7): 1063-67. doi:10.1016/j.hrthm.2008.03.057.
- Mueller-Hoecker, Josef, Frigga Beiting, Borja Fernandez, Olaf Bahlmann, Gerald Assmann, Christian Troidl, Ilias Dimomeletis, Stefan Käbb, et Elisabeth Deindl. 2008. « Of rodents and humans: a

light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in pulmonary veins ». *International Journal of Medical Sciences* 5 (3): 152-58.

- Nathan, H, et M Eliakim. 1966. « The junction between the left atrium and the pulmonary veins. An anatomic study of human hearts ». *Circulation* 34 (3): 412-22.
- Nattel, Stanley, Brett Burstein, et Dobromir Dobrev. 2008. « Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation Mechanisms and Implications ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1 (1): 62-73. doi:10.1161/CIRCEP.107.754564.
- Nattel, Stanley, et Dobromir Dobrev. 2016. « Electrophysiological and Molecular Mechanisms of Paroxysmal Atrial Fibrillation ». *Nature Reviews Cardiology* 13 (10): 575-90. doi:10.1038/nrcardio.2016.118.
- Neef, Stefan, Nataliya Dybkova, Samuel Sossalla, Katharina R. Ort, Nina Fluschnik, Kay Neumann, Ralf Seipelt, Friedrich A. Schöndube, Gerd Hasenfuss, et Lars S. Maier. 2010. « CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca²⁺ Leak and Elevated Diastolic Ca²⁺ Levels in Right Atrial Myocardium of Patients With Atrial Fibrillation ». *Circulation Research* 106 (6): 1134-44. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.203836.
- Negretti, N., S. C. O'Neill, et D. A. Eisner. 1993. « The Relative Contributions of Different Intracellular and Sarcolemmal Systems to Relaxation in Rat Ventricular Myocytes ». *Cardiovascular Research* 27 (10): 1826-30.
- Nicolás, J. M., D. C. Renard-Rooney, et A. P. Thomas. 1998. « Tonic Regulation of Excitation-Contraction Coupling by Basal Protein Kinase C Activity in Isolated Cardiac Myocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30 (12): 2591-2604. doi:10.1006/jmcc.1998.0816.
- Nishida, Kunihiro, Xiao Yan Qi, Reza Wakili, Philippe Comtois, Denis Chartier, Masahide Harada, Yuki Iwasaki, et al. 2011. « Mechanisms of Atrial Tachyarrhythmias Associated With Coronary Artery Occlusion in a Chronic Canine Model ». *Circulation* 123 (2): 137-46. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972778.
- O'Connell, Timothy D., Brian C. Jensen, Anthony J. Baker, et Paul C. Simpson. 2014. « Cardiac Alpha-1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance ». *Pharmacological Reviews* 66 (1): 308-33. doi:10.1124/pr.112.007203.
- Okamoto, Yosuke, Makoto Takano, Takayoshi Ohba, et Kyoichi Ono. 2012. « Arrhythmogenic coupling between the Na⁺-Ca²⁺ exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52 (5): 988-97. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.01.007.
- Olesen, Jonas Bjerring, Christian Torp-Pedersen, Morten Lock Hansen, et Gregory Y. H. Lip. 2012. « The Value of the CHA₂DS₂-VASc Score for Refining Stroke Risk Stratification in Patients with Atrial Fibrillation with a CHADS₂ Score 0-1: A Nationwide Cohort Study ». *Thrombosis and Haemostasis* 107 (6): 1172-79. doi:10.1160/TH12-03-0175.
- Ono, Kyoichi, et Toshihiko Iijima. 2010. « Cardiac T-type Ca²⁺ channels in the heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Special Issue: Ion Channels, 48 (1): 65-70. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.021.
- Orchard, C. H., S. M. Bryant, et A. F. James. 2013. « Do T-Tubules Play a Role in Arrhythmogenesis in Cardiac Ventricular Myocytes? ». *The Journal of Physiology* 591 (17): 4141-4147. doi:10.1113/jphysiol.2013.254540.
- Paes de Almeida, O., C. M. Bohm, M. de Paula Carvalho, et A. Paes de Carvalho. 1975. « The Cardiac Muscle in the Pulmonary Vein of the Rat: A Morphological and Electrophysiological Study ». *Journal of Morphology* 145 (4): 409-33. doi:10.1002/jmor.1051450403.
- Pankonien, Ines, Julio L Alvarez, Anke Doller, Clemens Köhncke, Dana Rotte, Vera Regitz-Zagrosek, Ingo Morano, et Hannelore Haase. 2011. « Ahnak1 Is a Tuneable Modulator of Cardiac Ca(v)_{1.2} Calcium Channel Activity ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 32 (4-5): 281-90. doi:10.1007/s10974-011-9269-2.
- Pásek, M., F. Brette, A. Nelson, C. Pearce, A. Qaiser, G. Christe, et C. H. Orchard. 2008. « Quantification of t-tubule area and protein distribution in rat cardiac ventricular myocytes ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Cardiovascular Physiome, 96 (1-3): 244-57. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.016.

- Pasqualin, Côme, François Gannier, Claire O. Malécot, Pierre Bredeloux, et Véronique Maupoil. 2015. « Automatic Quantitative Analysis of T-Tubule Organization in Cardiac Myocytes Using ImageJ ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 308 (3): C237-45. doi:10.1152/ajpcell.00259.2014.
- Pasqualin, Côme, François Gannier, Angèle Yu, Claire O. Malécot, Pierre Bredeloux, et Véronique Maupoil. 2016. « SarcOptiM for ImageJ: High-Frequency Online Sarcomere Length Computing on Stimulated Cardiomyocytes ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 311 (2): C277-83. doi:10.1152/ajpcell.00094.2016.
- Patterson, Eugene, Sunny S. Po, Benjamin J. Scherlag, et Ralph Lazzara. 2005. « Triggered Firing in Pulmonary Veins Initiated by in Vitro Autonomic Nerve Stimulation ». *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society* 2 (6): 624-31. doi:10.1016/j.hrthm.2005.02.012.
- Perez-Lugones, Alejandro, James T. McMahon, Norman B. Ratliff, Walid I. Saliba, Robert A. Schweikert, Nassir F. Marrouche, Eduardo B. Saad, et al. 2003. « Evidence of Specialized Conduction Cells in Human Pulmonary Veins of Patients with Atrial Fibrillation ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 14 (8): 803-9.
- Picht, Eckard, Aleksey V. Zima, Lothar A. Blatter, et Donald M. Bers. 2007. « SparkMaster: Automated Calcium Spark Analysis with ImageJ ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 293 (3): C1073-81. doi:10.1152/ajpcell.00586.2006.
- Po, Sunny S., Yuhua Li, David Tang, Hong Liu, Ning Geng, Warren M. Jackman, Benjamin Scherlag, Ralph Lazzara, et Eugene Patterson. 2005. « Rapid and Stable Re-Entry within the Pulmonary Vein as a Mechanism Initiating Paroxysmal Atrial Fibrillation ». *Journal of the American College of Cardiology* 45 (11): 1871-77. doi:10.1016/j.jacc.2005.02.070.
- Poortmans, Jacques R., et Nathalie Boisseau. 2009. *Biochimie des activités physiques et sportives*. Groupe de Boeck.
- Puglisi, J L, W Yuan, J W Bassani, et D M Bers. 1999. « Ca(2+) influx through Ca(2+) channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature ». *Circulation research* 85 (6): e7-16.
- R Development Core Team. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- Richards, M. A., J. D. Clarke, P. Saravanan, N. Voigt, D. Dobrev, D. A. Eisner, A. W. Trafford, et K. M. Dibb. 2011. « Transverse Tubules Are a Common Feature in Large Mammalian Atrial Myocytes Including Human ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 301 (5): H1996-2005. doi:10.1152/ajpheart.00284.2011.
- Rietdorf, Katja, Martin D. Bootman, et Michael J. Sanderson. 2014. « Spontaneous, Pro-Arrhythmic Calcium Signals Disrupt Electrical Pacing in Mouse Pulmonary Vein Sleeve Cells ». *PLoS ONE* 9 (2): e88649. doi:10.1371/journal.pone.0088649.
- Rucker-Martin, Catherine, Paul Milliez, Sisareuth Tan, Xavier Decrouy, Michel Recouvreur, Roger Vranckx, Claude Delcayre, et al. 2006. « Chronic Hemodynamic Overload of the Atria Is an Important Factor for Gap Junction Remodeling in Human and Rat Hearts ». *Cardiovascular Research* 72 (1): 69-79. doi:10.1016/j.cardiores.2006.06.016.
- Sato, Daisuke, Daniel C. Bartos, Kenneth S. Ginsburg, et Donald M. Bers. 2014. « Depolarization of Cardiac Membrane Potential Synchronizes Calcium Sparks and Waves in Tissue ». *Biophysical Journal* 107 (6): 1313-17. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.053.
- Satoh, H., L. A. Blatter, et D. M. Bers. 1997. « Effects of [Ca²⁺]_i, SR Ca²⁺ Load, and Rest on Ca²⁺ Spark Frequency in Ventricular Myocytes ». *The American Journal of Physiology* 272 (2 Pt 2): H657-668.
- Scherr, Daniel, Paul Khairy, Shinsuke Miyazaki, Valerie Aurillac-Lavignolle, Patrizio Pascale, Stephen B. Wilton, Khaled Ramoul, et al. 2015. « Five-Year Outcome of Catheter Ablation of Persistent Atrial Fibrillation Using Termination of Atrial Fibrillation as a Procedural Endpoint ». *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 8 (1): 18-24. doi:10.1161/CIRCEP.114.001943.
- Schlotthauer, Klaus, et Donald M. Bers. 2000. « Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release Causes Myocyte Depolarization Underlying Mechanism and Threshold for Triggered Action Potentials ». *Circulation Research* 87 (9): 774-80. doi:10.1161/01.RES.87.9.774.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, et Kevin W. Eliceiri. 2012. « NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 671-75.

- Schotten, Ulrich, Hannelore Haase, Dirk Frechen, Maura Greiser, Christoph Stellbrink, Jaime F. Vazquez-Jimenez, Ingo Morano, Maurits A. Alessie, et Peter Hanrath. 2003. « The L-Type Ca²⁺-Channel Subunits alpha1C and beta2 Are Not Downregulated in Atrial Myocardium of Patients with Chronic Atrial Fibrillation ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (5): 437-43.
- Seidler, Tim, Stewart L W Miller, Christopher M Loughrey, Astrid Kania, Annika Burow, Sarah Kettlewell, Nils Teucher, et al. 2003. « Effects of Adenovirus-Mediated Sorcin Overexpression on Excitation-Contraction Coupling in Isolated Rabbit Cardiomyocytes ». *Circulation Research* 93 (2): 132-39. doi:10.1161/01.RES.0000081596.90205.E2.
- Shannon, Thomas R., Tao Guo, et Donald M. Bers. 2003. « Ca²⁺ Scraps Local Depletions of Free [Ca²⁺] in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum During Contractions Leave Substantial Ca²⁺ Reserve ». *Circulation Research* 93 (1): 40-45. doi:10.1161/01.RES.0000079967.11815.19.
- Shaw, Robin M, et Henry M Colecraft. 2013. « L-Type Calcium Channel Targeting and Local Signalling in Cardiac Myocytes ». *Cardiovascular Research*, mars. doi:10.1093/cvr/cvt021.
- Sheehan, Katherine A., Aleksey V. Zima, et Lothar A. Blatter. 2006. « Regional Differences in Spontaneous Ca²⁺ Spark Activity and Regulation in Cat Atrial Myocytes ». *The Journal of Physiology* 572 (3): 799-809. doi:10.1113/jphysiol.2005.103267.
- Shorofsky, Stephen R., Rajesh Aggarwal, Mary Corretti, Jeanne M. Baffa, Judy M. Strum, Badr A. Al-Seikhan, Yvonne M. Kobayashi, Larry R. Jones, W. Gil Wier, et C. William Balke. 1999. « Cellular Mechanisms of Altered Contractility in the Hypertrophied Heart Big Hearts, Big Sparks ». *Circulation Research* 84 (4): 424-34. doi:10.1161/01.RES.84.4.424.
- Simard, Christophe, Thomas Hof, Zakia Keddache, Pierre Launay, et Romain Guinamard. 2013. « The TRPM4 Non-Selective Cation Channel Contributes to the Mammalian Atrial Action Potential ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 59 (juin): 11-19. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.01.019.
- Sinno, Hani, Katayoun Derakhchan, Danielle Libersan, Yahye Merhi, Tack Ki Leung, et Stanley Nattel. 2003. « Atrial Ischemia Promotes Atrial Fibrillation in Dogs ». *Circulation* 107 (14): 1930-36. doi:10.1161/01.CIR.0000058743.15215.03.
- Sipido, K R, E Carmeliet, et F Van de Werf. 1998. « T-Type Ca²⁺ Current as a Trigger for Ca²⁺ Release from the Sarcoplasmic Reticulum in Guinea-Pig Ventricular Myocytes ». *The Journal of Physiology* 508 (Pt 2) (avril): 439-51.
- Smyrniak, Ioannis, Waltraud Mair, Dagmar Harzheim, Simon A. Walker, H. Llewelyn Roderick, et Martin D. Bootman. 2010. « Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation ». *Cell Calcium* 47 (3): 210-23. doi:10.1016/j.ceca.2009.10.001.
- Sobotta, Johannes. 1906. *Atlas and Text-Book of Human Anatomy: The Viscera, Including the Heart*. W. B. Saunders.
- Song, L. S., J. S. Sham, M. D. Stern, E. G. Lakatta, et H. Cheng. 1998. « Direct Measurement of SR Release Flux by Tracking "Ca²⁺ Spikes" in Rat Cardiac Myocytes ». *The Journal of Physiology* 512 (Pt 3) (novembre): 677-91.
- Song, Zhen, Christopher Y. Ko, Michael Nivala, James N. Weiss, et Zhilin Qu. 2015. « Calcium-Voltage Coupling in the Genesis of Early and Delayed Afterdepolarizations in Cardiac Myocytes ». *Biophysical Journal* 108 (8): 1908-21. doi:10.1016/j.bpj.2015.03.011.
- Sood, Subeena, Mihail G. Chelu, Ralph J. van Oort, Darlene Skapura, Marco Santonastasi, Dobromir Dobrev, et Xander H.T. Wehrens. 2008. « Intracellular calcium leak due to FKBP12.6 deficiency in mice facilitates the inducibility of atrial fibrillation ». *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 5 (7): 1047-54. doi:10.1016/j.hrthm.2008.03.030.
- Sossalla, Samuel, Birte Kallmeyer, Stefan Wagner, Marek Mazur, Ulrike Maurer, Karl Toischer, Jan D. Schmitto, et al. 2010. « Altered Na⁺ Currents in Atrial Fibrillation: Effects of Ranolazine on Arrhythmias and Contractility in Human Atrial Myocardium ». *Journal of the American College of Cardiology* 55 (21): 2330-42. doi:10.1016/j.jacc.2009.12.055.
- Spach, M. S., et P. C. Dolber. 1986. « Relating Extracellular Potentials and Their Derivatives to Anisotropic Propagation at a Microscopic Level in Human Cardiac Muscle. Evidence for Electrical Uncoupling of Side-to-Side Fiber Connections with Increasing Age ». *Circulation Research* 58 (3): 356-71.

- Stöllberger, C., P. Chnupa, G. Kronik, M. Brainin, J. Finsterer, B. Schneider, et J. Slany. 1998. « Transesophageal Echocardiography to Assess Embolic Risk in Patients with Atrial Fibrillation. ELAT Study Group. Embolism in Left Atrial Thrombi ». *Annals of Internal Medicine* 128 (8): 630-38.
- Ter Keurs, Henk E.d.j., Yuji Wakayama, Yoshinao Sugai, Guy Price, Yutaka Kagaya, Penelope A. Boyden, Masahito Miura, et Bruno D.m. Stuyvers. 2006. « Role of Sarcomere Mechanics and Ca²⁺ Overload in Ca²⁺ Waves and Arrhythmias in Rat Cardiac Muscle ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1080 (1): 248-67. doi:10.1196/annals.1380.020.
- Terentyev, Dmitry, Serge Viatchenko-Karpinski, Héctor H. Valdivia, Ariel L. Escobar, et Sandor Györke. 2002. « Luminal Ca²⁺ Controls Termination and Refractory Behavior of Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release in Cardiac Myocytes ». *Circulation Research* 91 (5): 414-20. doi:10.1161/01.RES.0000032490.04207.BD.
- Thacker, Evan L., Barbara McKnight, Bruce M. Psaty, W.T. Longstreth, Colleen M. Sitlani, Sascha Dublin, Alice M. Arnold, Annette L. Fitzpatrick, Rebecca F. Gottesman, et Susan R. Heckbert. 2013. « Atrial fibrillation and cognitive decline ». *Neurology* 81 (2): 119-25. doi:10.1212/WNL.0b013e31829a33d1.
- Thijssen, V. L., J. Ausma, G. S. Liu, M. A. Allesie, G. J. van Eys, et M. Borgers. 2000. « Structural Changes of Atrial Myocardium during Chronic Atrial Fibrillation ». *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 9 (1): 17-28.
- Thomas, R. Croft, Abhishek Singh, Patrick Cowley, Bat-Erdene Myagmar, Megan D. Montgomery, Philip M. Swigart, Teresa De Marco, Anthony J. Baker, et Paul C. Simpson. 2016. « A Myocardial Slice Culture Model Reveals Alpha-1A-Adrenergic Receptor Signaling in the Human Heart ». *JACC. Basic to Translational Science* 1 (3): 155-67. doi:10.1016/j.jacbts.2016.03.005.
- Toyofuku, Toshihiko, Masanori Yabuki, Kinya Otsu, Tsunehiko Kuzuya, Masatsugu Hori, et Michihiko Tada. 1998. « Intercellular Calcium Signaling via Gap Junction in Connexin-43-Transfected Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1519-28. doi:10.1074/jbc.273.3.1519.
- Trinick, John. 1996. « Cytoskeleton: Titin as a Scaffold and Spring ». *Current Biology* 6 (3): 258-60. doi:10.1016/S0960-9822(02)00472-4.
- Tselentakis, E Victor, Edward Woodford, Joby Chandy, Glenn R Gaudette, et Adam E Saltman. 2006. « Inflammation Effects on the Electrical Properties of Atrial Tissue and Inducibility of Postoperative Atrial Fibrillation ». *The Journal of Surgical Research* 135 (1): 68-75. doi:10.1016/j.jss.2006.03.024.
- Tsien, Roger, et Tullio Pozzan. 1989. « [14] Measurement of cytosolic free Ca²⁺ with quin2 ». In *Methods in Enzymology*, édité par Becca Fleischer Sidney Fleischer, Volume 172:230-62. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687989720176>.
- van der Velden, H M, J Ausma, M B Rook, A J Hellemons, T A van Veen, M A Allesie, et H J Jongmsa. 2000. « Gap Junctional Remodeling in Relation to Stabilization of Atrial Fibrillation in the Goat ». *Cardiovascular Research* 46 (3): 476-86.
- Vassort, Guy, Karel Talavera, et Julio L. Alvarez. 2006. « Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart ». *Cell Calcium, T-type calcium channels: from old physiology to novel functions*, 40 (2): 205-20. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.025.
- Veksler, Vladimir I., Patrick Lechene, Khalid Matrougui, et Renée Ventura-Clapier. 1997. « Rigor Tension in Single Skinned Rat Cardiac Cell: Role of Myofibrillar Creatine Kinase ». *Cardiovascular Research* 36 (3): 354-62. doi:10.1016/S0008-6363(97)00178-8.
- Venetucci, Luigi A., Andrew W. Trafford, Stephen C. O'Neill, et David A. Eisner. 2008. « The Sarcoplasmic Reticulum and Arrhythmogenic Calcium Release ». *Cardiovascular Research* 77 (2): 285-92. doi:10.1093/cvr/cvm009.
- Voigt, Niels, Jordi Heijman, Qionglng Wang, David Y Chiang, Na Li, Matthias Karck, Xander H T Wehrens, Stanley Nattel, et Dobromir Dobrev. 2013. « Cellular and Molecular Mechanisms of Atrial Arrhythmogenesis in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation ». *Circulation*, novembre. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006641.
- Voigt, Niels, Na Li, Qionglng Wang, Wei Wang, Andrew W. Trafford, Issam Abu-Taha, Qiang Sun, et al. 2012. « Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak and Increased Na⁺-Ca²⁺

- Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients With Chronic Atrial Fibrillation ». *Circulation* 125 (17): 2059-70. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306.
- Voigt, Niels, Ange Maguy, Yung-Hsin Yeh, Xiaoyan Qi, Ursula Ravens, Dobromir Dobrev, et Stanley Nattel. 2008. « Changes in I_K, ACh Single-Channel Activity with Atrial Tachycardia Remodelling in Canine Atrial Cardiomyocytes ». *Cardiovascular Research* 77 (1): 35-43. doi:10.1093/cvr/cvm051.
- Wakayama, Yuji, Masahito Miura, Bruno D. Stuyvers, Penelope A. Boyden, et Henk E. D. J. ter Keurs. 2005. « Spatial Nonuniformity of Excitation–Contraction Coupling Causes Arrhythmogenic Ca²⁺ Waves in Rat Cardiac Muscle ». *Circulation Research* 96 (12): 1266-73. doi:10.1161/01.RES.0000172544.56818.54.
- Wakili, Reza, Yung-Hsin Yeh, Xiao Yan Qi, Maura Greiser, Denis Chartier, Kunihiro Nishida, Ange Maguy, *et al.* 2010. « Multiple Potential Molecular Contributors to Atrial Hypocontractility Caused by Atrial Tachycardia Remodeling in Dogs ». *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 3 (5): 530-41. doi:10.1161/CIRCEP.109.933036.
- Walden, A P, K M Dibb, et A W Trafford. 2009. « Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46 (4): 463-73. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.11.003.
- Wehrens, Xander H T, Stephan E Lehnart, Steven R Reiken, et Andrew R Marks. 2004. « Ca²⁺/calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor ». *Circulation Research* 94 (6): e61-70. doi:10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2.
- Wier, Withrow Gil, Henk E. D. J. ter Keurs, Eduardo Marban, Wei Dong Gao, et C. William Balke. 1997. « Ca²⁺ ‘Sparks’ and Waves in Intact Ventricular Muscle Resolved by Confocal Imaging ». *Circulation Research* 81 (4): 462-69. doi:10.1161/01.RES.81.4.462.
- Wijffels, M C, C J Kirchhof, R Dorland, et M A Allessie. 1995. « Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation. A Study in Awake Chronically Instrumented Goats ». *Circulation* 92 (7): 1954-68.
- Winslow, R. L., A. Varghese, D. Noble, C. Adlakha, et A. Hoythya. 1993. « Generation and Propagation of Ectopic Beats Induced by Spatially Localized Na-K Pump Inhibition in Atrial Network Models ». *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 254 (1339): 55-61. doi:10.1098/rspb.1993.0126.
- Witcher, D R, R J Kovacs, H Schulman, D C Cefali, et L R Jones. 1991. « Unique Phosphorylation Site on the Cardiac Ryanodine Receptor Regulates Calcium Channel Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (17): 11144-52.
- Woo, Sun-Hee, Lars Cleemann, et Martin Morad. 2005. « Diversity of atrial local Ca²⁺ signalling: evidence from 2-D confocal imaging in Ca²⁺-buffered rat atrial myocytes ». *The Journal of Physiology* 567 (Pt 3): 905-21. doi:10.1113/jphysiol.2005.092270.
- Woo, Sun-Hee, Nikolai M Soldatov, et Martin Morad. 2003. « Modulation of Ca²⁺ Signalling in Rat Atrial Myocytes: Possible Role of the alpha1C Carboxyl Terminal ». *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 437-47. doi:10.1113/jphysiol.2003.048330.
- Xia, Min, Qingfeng Jin, Saïd Bendahhou, Yusong He, Marie-Madeleine Larroque, Yiping Chen, Qinshu Zhou, *et al.* 2005. « A Kir2.1 Gain-of-Function Mutation Underlies Familial Atrial Fibrillation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (4): 1012-19. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.054.
- Yamamoto, Mitsuru, Halina Dobrzynski, James Tellez, Ryoko Niwa, Rudi Billeter, Haruo Honjo, Itsuo Kodama, et Mark R. Boyett. 2006. « Extended Atrial Conduction System Characterised by the Expression of the HCN4 Channel and connexin45 ». *Cardiovascular Research* 72 (2): 271-81. doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.026.
- Yang, Yiqing, Min Xia, Qingfeng Jin, Saïd Bendahhou, Jingyi Shi, Yiping Chen, Bo Liang, *et al.* 2004. « Identification of a KCNE2 Gain-of-Function Mutation in Patients with Familial Atrial Fibrillation ». *American Journal of Human Genetics* 75 (5): 899-905. doi:10.1086/425342.
- Yano, Masafumi, Kaoru Ono, Tomoko Ohkusa, Masae Suetsugu, Masateru Kohno, Takayuki Hisaoka, Shigeki Kobayashi, *et al.* 2000. « Altered Stoichiometry of FKBP12.6 Versus Ryanodine Receptor as a Cause of Abnormal Ca²⁺ Leak Through Ryanodine Receptor in Heart Failure ». *Circulation* 102 (17): 2131-36. doi:10.1161/01.CIR.102.17.2131.

- Yu, W C, S H Lee, C T Tai, C F Tsai, M H Hsieh, C C Chen, Y A Ding, M S Chang, et S A Chen. 1999. « Reversal of Atrial Electrical Remodeling Following Cardioversion of Long-Standing Atrial Fibrillation in Man ». *Cardiovascular Research* 42 (2): 470-76.
- Zhang, Yin Hua, et Jules C. Hancox. 2009. « Regulation of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger activity by protein kinase phosphorylation—Still a paradox? » *Cell Calcium* 45 (1): 1-10. doi:10.1016/j.ceca.2008.05.005.
- Zipes, D P, M J Mihalick, et G T Robbins. 1974. « Effects of Selective Vagal and Stellate Ganglion Stimulation of Atrial Refractoriness ». *Cardiovascular Research* 8 (5): 647-55.
- Zoni-Berisso, Massimo, Fabrizio Lercari, Tiziana Carazza, et Stefano Domenicucci. 2014. « Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective ». *Clinical Epidemiology* 6 (juin): 213-20. doi:10.2147/CLEP.S47385.
- Zygmunt, Andrew C., Robert J. Goodrow, et Charlene M. Weigel. 1998. « I NaCa and I Cl(Ca) contribute to Isoproterenol-Induced Delayed Afterdepolarizations in Midmyocardial Cells ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 275 (6): H1979-92.

ANNEXE



Bioimage Informatics

SarConfoCal: simultaneous sarcomere length and cytoplasmic calcium measurements for LASER scanning confocal microscopy images

Côme Pasqualin*, François Gannier, Angèle Yu, Claire O. Malécot, Pierre Brede-
loux, Véronique Maupoil

CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Equipe Physiologie des Cellules Car-
diaques et Vasculaires, 37200 Tours, France.

*To whom correspondence should be addressed.

Associate Editor: XXXXXXXX

Received on XXXXX; revised on XXXXX; accepted on XXXXX

Abstract

Summary: Simultaneous recordings of myocytes contractility and their cytoplasmic calcium concen-
tration allow powerful studies, particularly on heart failure and other cardiac dysfunctions. Such stud-
ies require dedicated and expansive experimental devices that are difficult to use. Thus we propose
SarConfoCal, the first and only software to simultaneously analyse both cytoplasmic calcium varia-
tions (from fluorescence signal) and myocytes contractility (from sarcomere length measurement) on
LASER scanning confocal microscopy images. SarConfoCal is easy to set up and use, especially by
people without programming skills.

Availability and implementation: The software is freely distributed under GNU-GPL licence.
Download and setup instructions are available at <http://pccv.univ-tours.fr/ImageJ/SarConfoCal>. It is
provided as a plug-in for ImageJ (the open-source program for image analysis provided by the Na-
tional Institutes of Health). SarConfoCal works under Windows, Mac and Linux operating systems.

Contact: come.pasqualin@univ-tours.fr

Supplementary information: Supplementary data are available at *Bioinformatics* online.

1 Introduction

The contractility of striated muscle cells such as cardiomyocytes can be accurately quantified by the measurement of their sarcomere shortening (Gannier *et al.*, 1993). In transmitted light microscopy, these cells display a transverse striated pattern due to dark and light bands corresponding to the very regular organization of contractile proteins. Such aligned cell segments form functional contraction units called sarcomeres. Sarcomere contraction occurs following an increase of the cytoplasmic calcium concentration triggered by an action potential.

The simultaneous measure of cardiomyocyte contraction and cyto-
plasmic calcium concentration represents an important step for a
better understanding of the physiopathology of several worldwide
cardiac diseases such as heart failure and atrial fibrillation. Howev-

er, there are currently no freely available methods for this type of
measurement. Indeed, it requires difficult to use specific and costly
systems such as that commercialized by IonOptix society (Massa-
chusetts, USA) which do not work on laser scanning confocal
microscopy images. Therefore, we developed SarConfoCal to
compute from scanning confocal microscopy images both sar-
comere length (SL) and calcium variations and to output their plots
vs. time. It uses the generally untapped information from the trans-
mitted light of the LASER, the latter being recorded simultaneously
with fluorescent calcium dye signal.

SarConfoCal is freely available as a plug-in for ImageJ (Schneider
et al., 2012); it is distributed under GNU-GPL license, ready to use,
and does not require expertise in image processing algorithms.

2 Image acquisition, processing, outputs and limitations

2.1 Image acquisition and input data

Simultaneous acquisition of the transmitted light across the myocytes and of the variations of fluorescence intensity of the calcium dye (e.g., Fluo-4) is required. The transmission image is achieved from a transmitted light detector that equips most current confocal microscopes. The image is collected with a photomultiplier through a sub-stage condenser. Thus, it is created pixel by pixel using the illumination from the LASER excitation source that crosses the sample. This light is generally monochromatic, therefore providing a high quality (although not monoplanar) transmitted light image which is perfectly synchronous with the fluorescent image conventionally acquired (Hibbs, 2004). Acquisition of this two-channel image must be done in XT mode, also called “linescan mode”, which consists in repeated high frequency laser scanning of a single line. This line has to be drawn within the longitudinal axis at the centre of the myocyte. For an optimal sarcomere measurement, the length of the scanned line has to be superior or equal to 256 pixels. In this configuration, acquisition with confocal microscope can easily reach 1 kHz, which is high enough for contraction kinetic studies (Pasqualin *et al.*, 2016). All image files compatible with ImageJ/Fiji and its extensions like Bio-formats (Linkert *et al.*, 2010) (<http://loci.wisc.edu/software/bio-formats>) can be processed by SarConfoCal. It should be noted that a calibration of the two dimensions of the image is fundamental for a correct detection of SL. This can be done with the calibration tools included in SarConfoCal or with the Bio-formats plug-in.

2.2 Workflow, image processing and outputs

The two channels of the image are separately processed line by line (Fig. 1). For SL measurement, each line of the transmitted light channel is analysed with fast Fourier transform to determine the dominant spatial frequency of striations, the latter being represented by a peak in the Fourier spectrum (Gannier *et al.*, 1993). This peak is searched within an interval defined by the user to prevent the detection of spurious peaks in the noise (Fig. S1). Once identified, the dominant spatial frequency is converted into a period corresponding to SL. The algorithm allows high accuracy outputs and subpixel resolution of sarcomere measurement. For cytoplasmic calcium variation measurement, pixel values of each line in the calcium fluorescence channel are added. SL and calcium fluorescence plots are displayed vs. time (Fig. 1D and F). The time scale is set by the acquisition sampling rate. An adjacent/averaging filter (Fig. S2B) can also be used to smooth the plot (Fig. S3). Another window displays a table which contains time (ms), SL (μm) and calcium fluorescence (arbitrary units). This table can be saved as .csv file for further analysis (Fig. 1G)

2.3 Limitations

SarConfoCal does not perform real-time analysis of SL. It is therefore impossible to follow the amplitude of the myocyte contraction and calcium transient during the experiment. As the transmitted light is not monoplanar, the recorded SL takes into account the length of sarcomeres in the focal plane exposed to the measured

calcium (other channel of the image), as well as those situated in the focal planes above and below.

2.4 Conclusions

SarConfoCal is the first software to compute simultaneously both sarcomere shortening and variation of cytoplasmic calcium in confocal microscopy. Its strength lies in its simplicity of use: cardiomyocyte contraction and calcium transient can be simultaneously evaluated with a single LASER scanning confocal microscope, whereas such experiments usually require costly and dedicated experimental devices. This software is freely distributed as a plug-in for ImageJ which is an open-source software widely used in scientific community. SarConfoCal is written in ImageJ Macro Language and can be easily modified or improved to correspond to user specific needs. It may also constitute a framework for other developments, such as optical action potential recording with voltage sensitive dyes.

Funding

This work has been supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Région Centre – Val de Loire

Conflict of Interest: none declared.

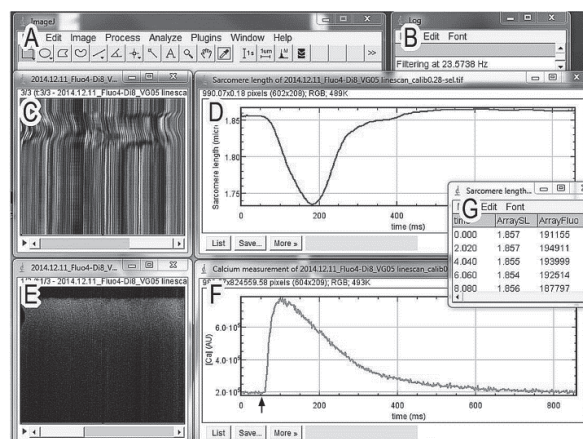


Fig. 1. SarConfoCal analysis outputs. The cardiomyocyte was electrically field stimulated at the time indicated by the arrow in F. Images were obtained by confocal microscopy in “linescan mode” (XT). A: main window of ImageJ software. B: Log window displaying analysis information. C: transmission light image of sarcomeres. D: analysed sarcomere length displayed in C vs. time. E: calcium dye fluorescence image. F: variations of calcium dye fluorescence vs. time. G: summary table of time and plots values.

References

- Gannier, F. *et al.* (1993) Measurements of sarcomere dynamics simultaneously with auxotonic force in isolated cardiac cells. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **40**, 1226–1232.
- Hibbs, A.R. (2004) *Confocal Microscopy for Biologists* [electronic resource] Boston, MA : Springer US : Imprint : Springer.
- Linkert, M. *et al.* (2010) Metadata matters: access to image data in the real world. *J. Cell Biol.*, **189**, 777–782.
- Pasqualin, C. *et al.* (2016) SarcOptiM for ImageJ: high-frequency online sarcomere length computing on stimulated cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, **311**, C277–C283.
- Schneider, C.A. *et al.* (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 671–675.

Supplementary Data:

SarConfoCal: simultaneous sarcomere length and cytoplasmic calcium measurements for LASER scanning confocal microscopy images

Côme Pasqualin*, François Gannier, Angèle Yu, Claire O. Malécot, Pierre Bredeloux, Véronique Maupoil

CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Equipe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, 37200 Tours, France.

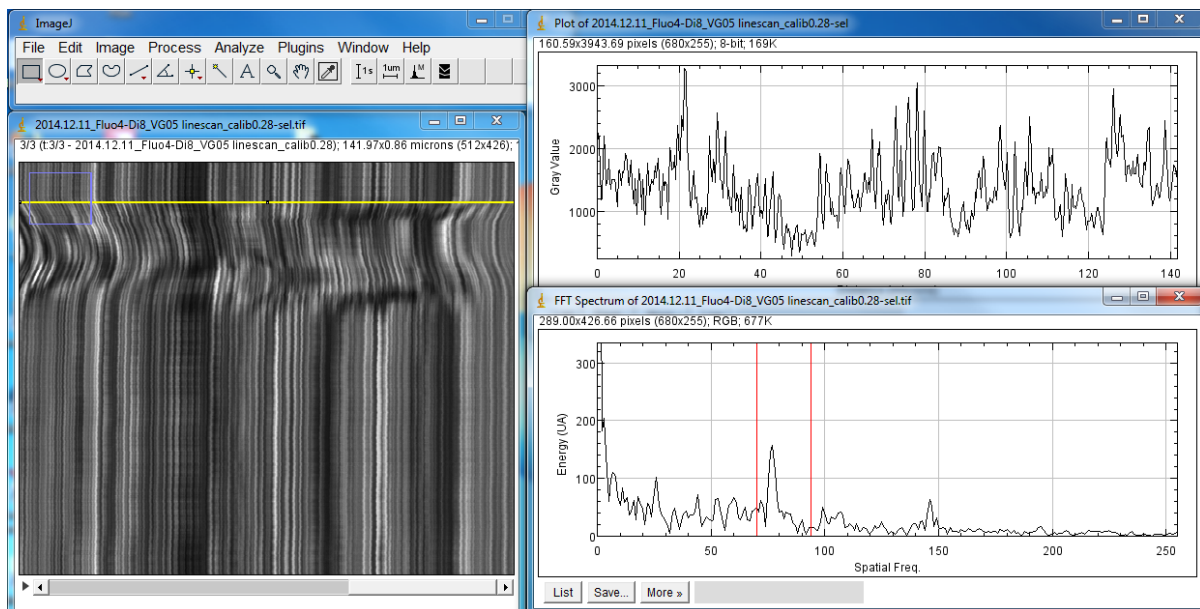


Figure S1: Top right: example of the grey level profile of the yellow line displayed in the transmission light XT image (left panel) and the corresponding Fourier spectrum plot (bottom right). Red lines on the spectrum plot show the sarcomere length limits defined by the user.

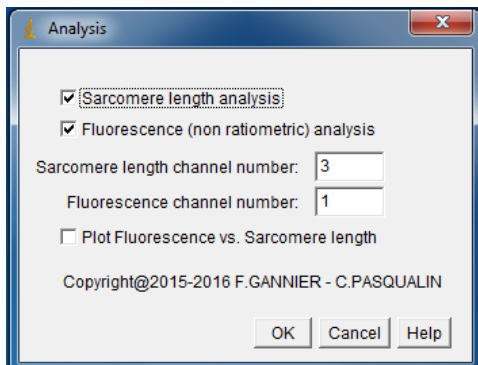
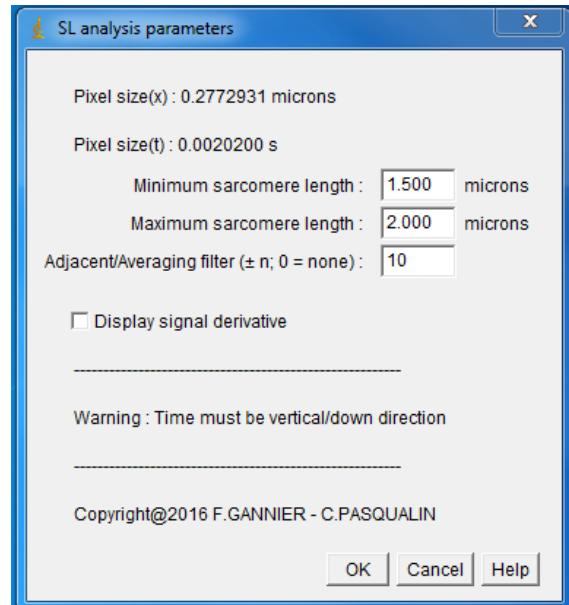
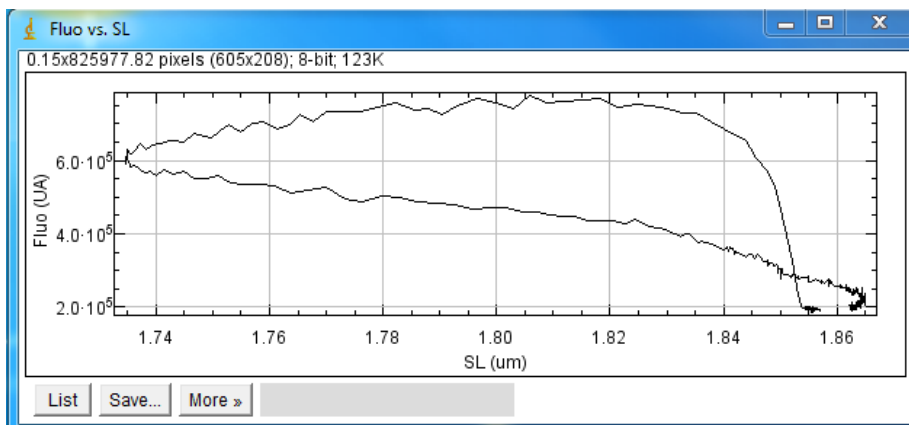
A**B****C**

Figure S2: Analysis action tool. A: dialog box to choose analyses and channels. SarConfoCal needs to know the correct channel for each signal (transmission and fluorescence). B: dialog box to setup sarcomere length analysis: spatial and time dimensions are reminded. Minimum and maximum sarcomere lengths represent the limits for searching peaks. An adjacent/averaging filter can be applied; n corresponds to the number of points taken into account on each side of the current point. The filter frequency depends on the sampling rate; it is computed and displayed in the Log window (Fig. 1B). The derivative signal of the sarcomere length can also be displayed. C: fluorescence vs. sarcomere length plot of the signal displayed in Fig 1.

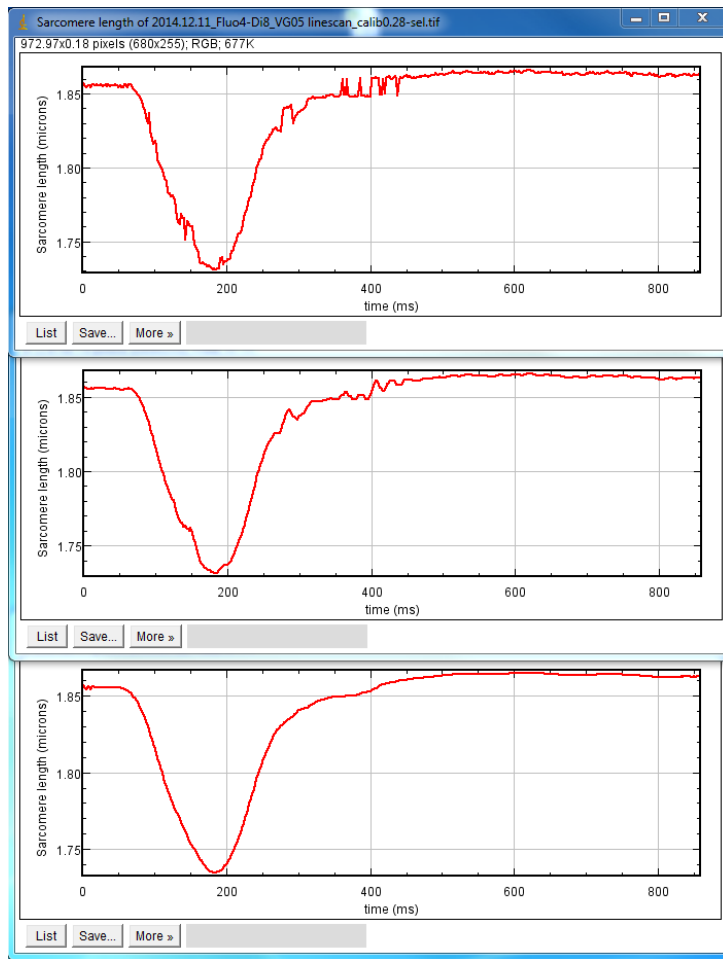


Figure S3: Plot of sarcomere length vs. time for different values of adjacent/averaging filter. Sampling frequency: 500 Hz. Top : raw signal; middle : adjacent filter value: 2 (5 points averaging; filter value of 100Hz); bottom : adjacent filter value: 9 (26 Hz filtering).

Côme PASQUALIN

Dynamique calcique dans les cardiomyocytes de veines pulmonaires de rat

Une hétérogénéité source d'arythmie ?

Résumé

Les activités électriques ectopiques à l'origine des épisodes de fibrillation atriale pourraient être dues à des échanges calciques anormaux dans les cardiomyocytes (CM) de veine pulmonaire (VP). Le cycle du calcium des CM de VP a donc été caractérisé et comparé à celui des CM d'oreillette gauche (OG) et de ventricule gauche (VG).

Des outils ont été développés pour mesurer la régularité d'organisation des réseaux de tubules transverses et la contractilité des CM de VP. Contrairement aux CM d'OG et de VG, l'organisation hétérogène du réseau de tubules dans la population des CM de VP conduit à une grande variabilité de forme des transitoires calciques et d'amplitude de contraction. Au sein des VP, ces différents types de CM sont regroupés en îlots. La fréquence des libérations calciques spontanées est également plus grande dans les CM de VP que dans ceux d'OG et de VG.

La population des CM de VP présente une dynamique calcique aux caractéristiques uniques pouvant être source d'arythmies.

Mots clés : fibrillation atriale, cardiomyocyte, dynamique calcique, contraction, microscopie confocale, analyse d'image.

Résumé en anglais

Ectopic foci leading to atrial fibrillation episodes might be due to abnormal calcium handling by the pulmonary vein (PV) cardiomyocytes (CM). Therefore, the calcium cycle of PV CM was characterized and compared to those of left atria (LA) and left ventricle (LV) CM.

Some tools have been developed to measure the organization of transverse tubular networks and contractility of PV CM. Unlike LA and LV CM, the heterogeneous organization of the tubular networks in the PV CM population leads to wide ranges of calcium transient shapes and contraction amplitudes. Within the whole PV, these different types of CM are gathered in islets. The frequency of spontaneous calcium release is also higher in PV CM than in LA and LV CM.

The special features of the calcium handling properties of the PV CM population could be a source of arrhythmias.

Keywords : atrial fibrillation, cardiomyocyte, calcium dynamics, contraction, confocal microscopy, image analysis.