

Université de Montréal

**Effets de divers stimuli sur les caractéristiques des
cardiomyocytes en culture dans le but de définir les
conditions optimisées pour la fabrication de tissu
cardiaque de remplacement**

par Jonathan Boudreau-Béland

**Département de physiologie moléculaire et intégrative
Faculté de médecine**

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de
l'obtention du grade de PhD en Physiologie
option générale

Décembre 2015

© Jonathan Boudreau-Béland, 2015

Résumé

Encore en 2015, un grand nombre d'individus décèdent de pathologies du rythme cardiaque non contrôlées ou d'un manque de disponibilité de donneurs d'organes compatibles. Le génie tissulaire en créant, réparant ou améliorant la fonction des tissus est une option prometteuse afin de diminuer la mortalité associée à ces pathologies. L'objectif global de mon projet de recherche était de développer des outils et d'étudier l'impact fonctionnel des différents stimuli (mécanique et électrique) de l'environnement cardiaque dans le but de définir des conditions optimisées de culture pour la fabrication de tissu de remplacement par génie tissulaire. Cette thèse présente le développement d'un bioréacteur; un système qui optimise les conditions pour la culture cellulaire. L'efficacité du bioréacteur est validée par des expériences de culture cellulaire qui se concentrent sur la prolifération cellulaire, l'organisation cellulaire, l'expression génique et protéique de même que sur l'activité contractile spontanée. En premier lieu, nos résultats montrent, bien que la fréquence de contraction moyenne mesurée reste inchangée, une augmentation significative du nombre de cas de réentrées pour les cultures sur verre comparativement aux cultures sur Polydimethylsiloxane. Une augmentation de l'instabilité spatiotemporelle a été démontrée lorsque les cardiomyocytes étaient déposés sur un support de Polydimethylsiloxane et cette dernière corrèle avec une diminution non-significative de l'ARNm de la connexine-43 et une augmentation significative de l'ARNm pour CaV3.1 et HCN2. La culture sur Polydimethylsiloxane est également associée avec une plus forte réponse à l'isoprotérénol (β -adrénergique) et à l'acétylcholine (parasymphatique). En second lieu, nous présentons les résultats du développement de notre bioréacteur en mettant l'emphase sur les caractéristiques (composantes accessibles, étirement uniaxial, électrode de carbone, stimulation biphasique) tout en validant notre approche pour optimiser les conditions de culture et améliorer la rentabilité des étapes de production du tissu de remplacement. Pour finir, nous partageons une nouvelle approche d'évaluation des caractéristiques contractiles de cellules cardiaques en culture. Nous avons développé des algorithmes qui utilisent les données de vidéomicroscopie pour valider l'impact de stimuli, évaluer l'hétérogénéité du signal enregistré et détecter des conditions favorables au développement d'arythmies.

Mots-clés : Génie tissulaire, activité autonome, cellules pacemakers, stimulation électrique, stimulation mécanique, substrat de culture, rigidité, polydimethylsiloxane, algorithme.

Abstract

In 2015, there are still a large number of people who die due to diseases of uncontrolled heart rhythm or due to lack of availability of compatible donor organs. Tissue engineering aim to create, repair or improve the function by different techniques. Tissue engineering is a viable option to reduce the mortality associated with many heart conditions. The overall goal of my PhD research was to study the functional impact of different stimuli in cardiac environment (mechanical and electrical stimulation) on cardiac cell cultures. This, in order to define optimized culture conditions for the production of replacement tissue using tissue engineering. This thesis presents the stages of creation and development of a bioreactor; a system that permits the culture of cardiac cells by integrating various stimuli. The optimization of culture conditions by using the bioreactor was confirmed by cell culture experiments that focus on cell proliferation, cell organization, gene and protein expression as well as on spontaneous activity. In the first place, our results show that although mean frequency of spontaneous activity remained unaltered, incidence of reentrant activity was significantly higher in samples cultured on glass compared to PDMS substrates. Higher spatial and temporal instability of the spontaneous rate activation was found when cardiomyocytes were cultured on PDMS, and correlated with decreased connexin-43 (unsignificant) and a significant increased CaV3.1 and HCN2 mRNA levels. Compared to cultures on glass, cultures on PDMS were associated with the strongest response to isoproterenol (β -adrenergic) and acetylcholine (parasympathetic). Secondly, we present the design of our bioreactor with an emphasis on its characteristics and by putting in perspective the relevance of our approach to optimize culture conditions and to improve profitability culture experiences and production stages of replacement heart tissue. Finally, a new approach is proposed to evaluate the characteristics of the contractile cells in culture which allows to validate the functional impact of stimuli, evaluate the heterogeneity in the beating behavior of the cells and to detect localized abnormal activity that could favour arrhythmia.

Keywords: Tissue engineering, autonomous activity, pacemaker cells, electrical stimulation, mechanical stimulation, culture substrate, stiffness, polydimethylsiloxane, algorithm.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements	xi
L'avant-propos	xii
1. Introduction	1
1.1. Le cœur.....	1
1.1.1. L'origine et l'évolution du cœur.....	1
1.1.2. Les facteurs impliqués dans le développement cardiaque	3
1.1.3. Morphologie cardiaque	9
1.1.4. Fonction cardiaque.....	10
1.2. La physiologie du cœur.....	14
1.2.1. Mécanismes responsables de l'automaticité électrique cardiaque.....	14
1.2.2. La propagation électrique	17
1.2.3. Régénération cardiaque.....	18
1.3. Les pathologies cardiaques	20
1.3.1. Leur origine.....	20
1.3.2. Mécanisme de mort cellulaire.....	22
1.3.3. Cardiomyopathies	22
1.3.4. L'infarctus du myocarde	23
1.3.5. L'insuffisance cardiaque.....	24

1.3.6. Les troubles du rythme.....	24
1.3.7. Le remodelage cardiaque	26
1.4. Les méthodes palliatives	27
1.4.1. Traitement des maladies cardiovasculaires.....	27
1.4.1. Les moyens de défense intrinsèque du corps humain!.....	27
1.4.2. La transplantation d'organe	28
1.4.3. Le pacemaker électronique	29
1.4.4. La médecine régénérative	30
1.5. L'importance de l'environnement et son impact sur la différenciation des cellules cardiaques	45
1.5.1. Effets des propriétés biomécaniques (rigidité) du support de culture.....	46
1.5.2. Effets de la stimulation électrique.....	49
1.5.3. Les systèmes de stimulation électrique.....	50
1.5.4. Effets de la stimulation mécanique.....	50
1.5.5. Les systèmes de stimulation mécanique	54
1.5.7. Effets de la stimulation électrique et mécanique combinée.....	58
1.5.8. Effets du synchronisme dans la stimulation électrique et mécanique combinée	60
1.6. Différentes techniques d'évaluation fonctionnelle.....	63
2. Les objectifs de la thèse.....	67
3. Spatiotemporal stability of neonatal rat cardiomyocyte monolayers spontaneous activity is dependent on the culture substrate	68
4. Development of a bioreactor for optimized cardiac cell culture integrating flexible mechanical and electrical stimulations.....	113

5. Novel videomicroscopy analysis method: analysing the mechanical beating behaviour of cardiac cells	137
6. Discussion	163
6.1. Choix du substrat : importance d'opter pour un composé biomimétique	163
6.2 Système d'optimisation de la culture cellulaire : le bioréacteur!	169
6.3 Étude fonctionnelle et détection d'anomalie automatisée	178
7. Conclusion	180
7.1. Vers l'optimisation de l'activité électrique autonome des biopacemakers	181
8. Bibliographie	183
9. Curriculum vitae	i

Liste des tableaux

Tableau I - Bénéfices de la thérapie par injection de MSCs chez les gros animaux	34
Tableau II - Caractéristiques des cardiomyocytes dérivés des iPSCs comparativement aux cardiomyocytes adultes	36
Tableau III - Avantages et limitations des différents types de stimulation.....	57
Tableau IV - Remodelage des courants ioniques et de la conduction intercellulaire induits par la stimulation électrique et mécanique dans différents modèles de culture cellulaire	59
Tableau V - Caractéristiques des approches d'analyse de l'activité contractile des cardiomyocytes basée sur la vidéomicroscopie	64

Liste des figures

Figure 1 - Système ouvert comparativement au système fermé	1
Figure 2 - Différentiation via Tbx3 et effets sur le développement de l'activité pacemaker	4
Figure 3 – Étapes de développement du cœur durant les premières semaines du développement embryonnaire	6
Figure 4 - Cascade de signalisation de Wnt/beta-catenin	8
Figure 5 - Système de circulation sanguine	11
Figure 6 - Les structures du cœur.....	12
Figure 7 - L'automaticité cardiaque	16
Figure 8 - Pathologies cardiovasculaires en réponse à des perturbations de l'environnement cardiaque.....	19
Figure 9 - Développement de pathologies cardiaques congénitales.	21
Figure 10 – Rendement de diverses méthodes d'isolation des cardiomyocytes	32
Figure 11 – Schéma présentant les différences entre un cardiomyocyte adulte et un cardiomyocyte dérivé de cellule iPSCs.....	37
Figure 12 - Méthode de culture en sphéroïdes ou corps embryonnaires	42
Figure 13 - Effet de l'environnement biomécanique sur les fonctions physiologiques	47
Figure 14 - Différents types d'étirement	56
Figure 15 - Relation entre la pression et le volume sanguin dans le ventricule gauche lors du cycle cardiaque.....	61
Figure 16 - Principes de la cartographie optique	66
Figure 17 - Génie tissulaire.....	182

Liste des abréviations

[Ca ²⁺] _i	Concentration intracellulaire de calcium
1-EBIO	1-ethyl-2-benzimidazolinone
3D	Trois dimensions
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ang-II	Angiotensine II
ASC	Cellules souches dérivées du tissu adipeux (« <i>Adipocyte Stem Cell</i> »)
ATI	Récepteur à l'angiotensine II
BMPCs	Cellules progénitrices circulantes dérivées de la moelle osseuse (« <i>Bone-marrow progenitor cells</i> »)
BPM	Feuillet cellulaire doté d'activité autonome (« <i>Biopacemaker</i> »)
CCL	Canaux calciques de Type L
CM	Cardiomyocyte
CSC	Cellules souches ou progénitrices résidentes cardiaques (« <i>cardiac stem cell</i> »)
CSE	Canaux sensibles à l'étirement
Cx	Connexine
EPC	Cellules progénitrices endothéliales (« <i>Endothelial progenitor cells</i> »)
ESC	Cellules souches embryonnaires (« <i>Embryonic stem cell</i> »)
FAK	Protéine kinase d'adhésion focale (« <i>Focal adhesion kinase</i> »)
HCN	Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques (« <i>Hyperpolarization Cyclic Nucleotide-gated channel</i> »)
HEK293	Cellules rénales embryonnaires humaines (« <i>Human embryonic kidney cells</i> »)
I	Courant ionique
ICM	Institut de Cardiologie de Montréal
IP3R	Récepteur à l'inositol-triphosphate (« <i>Inositol-triphosphate receptor</i> »)
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites (« <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> »)
MCV	Maladies cardiovasculaires
MEF	Facteur activateur de myocyte (« <i>Myocyte enhancer factor</i> »)

Mesp	Mésoderme postérieur
MSC	Cellules souches mésenchymateuses (« <i>Mesenchymal Stem Cell</i> »)
NCX	Échangeur sodium-calcium (« <i>Sodium-Calcium Exchanger</i> »)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Potentiel d'action
PDMS	Polydimethylsiloxane
PGA	Acide polyglycolique (« <i>Polyglycol Acid</i> »)
PIKE	Activateur de la phosphatidylinositol 3-kinase (« <i>phosphatidylinositol 3-kinase enhancer</i> »)
PIPAAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
PM	Cellule dotée d'activité autonome (« <i>pacemaker</i> »)
pO ₂	Pression d'oxygène
pCO ₂	Pression de dioxyde de carbone
RCITO	Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes
RyR	Récepteur à la ryanodine (« <i>Ryanodin receptor</i> »)
SM	Myoblastes squelettiques (« <i>skeletal muscle</i> »)
Tbx	Facteur T-box
UPC	Cellules souches dérivées du cordon ombilical (« <i>Umbilical progenitor cell</i> »)

*Pour réussir dans le domaine de la recherche
scientifique, il faut que la main, la tête et le
cœur travaillent en syncytium!*

Remerciements

Un merci spécial à James Elber-Duverger pour son aide au niveau des techniques d'ingénierie et bien sûr à Philippe Comtois qui m'a accordé sa confiance et m'a permis d'acquérir plusieurs connaissances tout en m'aidant à évoluer dans le domaine de la recherche en santé et en génie. Dr. Philippe Comtois m'a permis de voir que je pouvais combiner des études dans le domaine médical et technologique simultanément. Cette possibilité a suscité un vif intérêt pour moi, car cela combinait deux passions que j'avais à l'intérieur de moi depuis plusieurs années.

Merci à toute ma famille pour leur support durant toutes ces années. Un merci spécial à, mon père Alain, ma mère Carmen, ainsi qu'à ma conjointe Caroline pour leurs encouragements qui m'ont permis de poursuivre et de finaliser cette thèse.

Merci également à tous les gens de l'ICM qui ont collaboré de près ou de loin sur ces projets. J'aimerais ajouter que c'est grâce à la participation de chacun d'entre eux que ce projet a pu se concrétiser.

J'aimerais mentionner l'importance que le Dr. Pierre Thérout a eue sur mon parcours académique, c'est dans son laboratoire que j'y ai acquis des notions importantes concernant la recherche, ce qui m'a permis d'acquérir des bases essentielles comme l'autonomie et une grande rigueur.

Finalement, merci aux organismes subventionnaires qui ont permis de réaliser ces projets de recherche durant mes études doctorales.

L'avant-propos

Les maladies cardiovasculaires (MCV) affectent un très grand nombre d'individus chaque année au Canada et à travers le monde (1,29 million en 2005 au Canada et 17,1 millions à travers le monde selon l'Organisation mondiale de la santé, OMS) faisant de cette pathologie une cause majeure d'hospitalisation et de décès. Les chercheurs fondamentaux travaillent conjointement avec les chercheurs cliniciens afin de contrer ce fléau. Statistiquement parlant, au cours des vingt-cinq dernières années, le taux de mortalité des MCV a diminué d'environ de moitié reflétant le progrès qui a été réalisé dans ce domaine. Malgré tout, un nombre considérable d'individus continue d'être affecté et de mourir de causes cardiovasculaires montrant la nécessité de compléter les traitements actuels avec de nouvelles méthodes innovatrices pour tenter de diminuer davantage l'incidence et les répercussions des pathologies cardiaques. De plus, un grand nombre de patients souffrent de pathologies cardiaques qui diminuent leur qualité de vie, comme par exemple, la bradycardie (rythme trop lent du cœur) rend difficile pour le patient de faire de l'exercice physique; l'exercice physique étant bénéfique à plusieurs niveaux, cela est donc dommage que les patients atteints de bradycardie ne puissent vraiment en tirer les bénéfices. Puisqu'aucune approche pharmacologique n'a encore réussi à élever le rythme cardiaque de manière efficace et sans danger, le meilleur moyen actuellement pour lutter contre la bradycardie est l'implantation du pacemaker électronique, mais cette technique a également ses limites. Le génie tissulaire qui consiste à créer, réparer ou améliorer la fonction de tissu par différentes techniques d'ingénierie est une option envisageable afin de diminuer la mortalité associée aux pathologies cardiaques. Une diminution à ce niveau pourrait permettre de libérer le système de la santé d'un lourd fardeau.

L'objectif global de mon projet de recherche de doctorat a été d'étudier l'impact qu'ont les différents stimuli dans l'environnement cardiaque sur les fonctions de cellules cardiaques dans le but de définir des conditions optimisées pour la fabrication de tissu de remplacement par génie tissulaire. Cette thèse présente donc les étapes de la création et du développement d'un bioréacteur qui permet la culture de cellules cardiaques en intégrant diverses stimulations. L'optimisation des conditions de culture par l'utilisation du bioréacteur est validée par des expériences de culture cellulaire qui se concentrent sur la prolifération cellulaire, l'organisation cellulaire, l'expression génique et protéique de même que sur la physiologie (ex : activité autonome). Tout ceci, dans le but d'optimiser les étapes de production de tissu de remplacement.

Introduction

1.1. Le cœur

1.1.1. L'origine et l'évolution du cœur

Après approximativement 700 million d'années d'évolution, le règne animal est constitué d'une grande variété d'espèces. Parmi ces derniers, deux types de symétrie prédominent : les organismes avec symétrie radiale (éponges, méduse) et les organismes avec symétrie bilatérale et un axe dorsiventral. Cette dernière catégorie donne deux branches qui divergent l'une de l'autre, soit les invertébrés (*Protostoma*) et les vertébrés (*Deuterostoma*). Depuis que les organismes sont constitués d'un amas de plusieurs cellules, la diffusion simple ne suffisait plus et un système plus évolué était nécessaire. Un système primaire de cœur tubulaire a été observé dès l'apparition des premiers organismes avec une symétrie bilatérale. Le système circulatoire est le premier système physiologique fonctionnel à faire son apparition. Ce système est essentiel à la survie des organismes puisqu'il permet le transport de l'oxygène et des nutriments aux tissus et l'élimination des déchets toxiques [1]. Deux systèmes sont possibles : un système ouvert ou un système fermé. Le système ouvert performe bien sur courte distance et est surtout présent dans la circulation périphérique chez les vers ou les insectes. Les liquides physiologiques (hémolymphe) coulent des artères vers les collecteurs veineux. Le volume circulant est élevé mais la vitesse de propagation est lente (Figure 1).

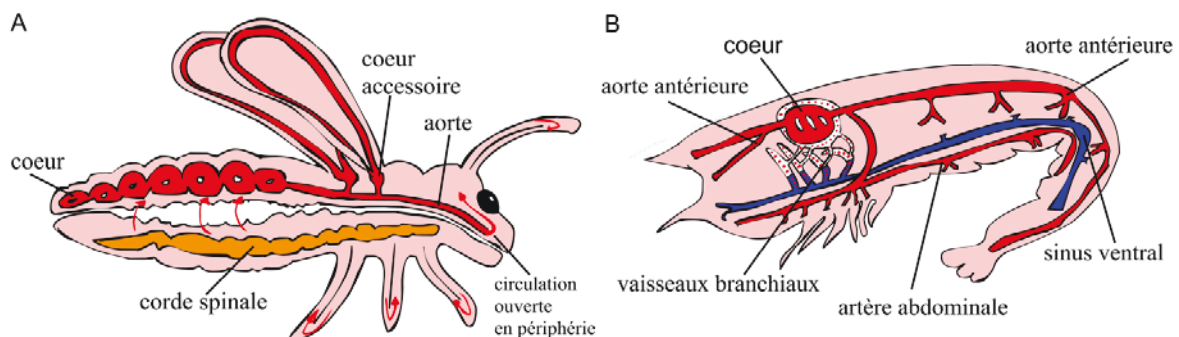


Figure 1 - Système ouvert comparativement au système fermé

Le système ouvert (A), comparativement au système fermé (B), performe bien sur courte distance. Il est donc plus optimisé pour un organisme moins complexe comme les vers ou les insectes. Toutefois, lorsqu'une circulation rapide du volume sanguin est requise, un système fermé s'avère plus efficace. Adaptée de Bettex et al. [2].

Comparativement, le système fermé déplace le sang rapidement sur de longues distances. Le volume sanguin est moins élevé, mais la pression est plus élevée. On retrouve ce type de système chez tous les vertébrés [2].

D'ailleurs, le système cardiaque des vertébrés possède plusieurs cavités et un réseau vasculaire complètement fermé. Ces cavités se forment à partir d'un tube qui se différencie en 5 segments : le sinus veineux et l'orifice des oreillettes ou l'atrium (entrée), le canal auriculo-ventriculaire, le ventricule et le cône artériel (sortie). La morphologie du cœur change petit à petit selon les différentes classes de vertébrés afin de s'adapter aux différentes conditions. Il y a un déplacement des structures de l'entrée d'une position caudale à une position dorsale chez le poisson et à une position céphalique chez le reptile. Il y a séparation de la cavité cardiaque en deux (cavité droite et gauche) chez les amphibiens. Il y a création d'un septum interventriculaire divisant le ventricule gauche du droit chez les crocodiles. Il y a disparition du sinus veineux et du cône artériel chez les oiseaux et mammifères. La séparation du muscle cardiaque en plusieurs chambres chez les oiseaux et mammifères permet à ces espèces de varier leur pression artérielle sans devoir changer le volume sanguin [3]. Simultanément avec le développement des cavités cardiaques, il se développe une transformation au niveau de l'activité contractile qui transforme le système cardiaque d'un système de propulsion sanguine par mouvement péristaltique à un système de conduction spécialisé (nœud sino-auriculaire, nœud auriculo-ventriculaire et fibres de Purkinje) [4]. Un grand nombre d'animaux possède un cœur pulsatile car ce dernier permet d'obtenir un haut débit avec une pression élevée. Toutefois, puisque les capillaires ont besoin d'un flux constant, les systèmes de plusieurs animaux se sont dotés d'élastine afin d'absorber les pulsations. Cette évolution a aussi donné naissance à certaines pathologies, comme l'hypertension [2]. L'analyse plus récente des différents gènes du développement cardiaque a permis de déterminer l'importance de gènes comme NK2 homeobox 5 (nkx2-5) (important pour la structure optimisée pour assurer un bon débit cardiaque) dans l'apparition de ces pathologies cardiaques [5]. De plus, les interactions entre certains gènes (comme tinman/nkx2-5) permettent de coordonner les processus de régulation de la performance, de la régularité du rythme, de la structure cardiaque et d'expression de canaux ioniques [5]. Certes, il est évident, qu'avec les éléments mentionnés ci-dessus, de grandes différences existent entre les systèmes moins évolués et les vertébrés,

toutefois, le développement du cœur requiert la coordination de plusieurs processus biologiques qui eux sont souvent préservés entre les divers systèmes [5].

1.1.2. Les facteurs impliqués dans le développement cardiaque

Cette section traite des étapes importantes dans l'organogénèse du cœur. Les étapes les plus cruciales sont la formation des ventricules et des oreillettes, de même que le processus de la création du septum et des valves. Toutes perturbations de ces étapes peuvent induire des pathologies cardiaques congénitales plus ou moins importantes.

Parmi les joueurs clés du développement cardiaque, nous pouvons retrouver GATA-4, une protéine qui régule l'expression de plusieurs gènes spécifiques (α -MHC, cardiac troponine C et peptide natriurétique auriculaire) et qui joue un rôle important dans le développement du muscle cardiaque [5]. GATA-4 est important pour la formation du septum auriculaire [5]. Une délétion de GATA-4 et de GATA-6 (ces deux derniers possèdent des fonctions redondantes) chez la souris a révélé son rôle dans la réponse hypertrophique suivant une stimulation par surcharge de volume et qu'il a également un rôle dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire et dans le combat contre l'insuffisance cardiaque [6].

Les T-box (Tbx) sont quant à eux importants pour l'organisation de plusieurs tissus chez les vertébrés et les invertébrés. La production de facteurs de croissance via Tbx permet de réguler la prolifération et la différenciation des cellules souches [7]. Chez les mammifères, on dénote 17 gènes T-box qui sont sous-divisés en cinq familles [7]. Tbx1 et Tbx18 assure l'élongation du tube cardiaque [8]. Tbx5 et Tbx20 est impliqué dans la formation des différentes cavités cardiaques [5]. Tbx2 et Tbx3 répriment la formation de ces cavités cardiaques et favorisent le développement du système de conduction [8]. Plus spécifiquement, Tbx3, quant à lui, serait impliqué dans une diminution de la Cx-43 (Fig. 2). D'ailleurs l'expression de Cx-43 dans le tissu des nœuds sino-auriculaires et auriculo-ventriculaires est également très faible et la présence de Tbx3 à ce niveau pourrait expliquer cette observation [9]. De plus, selon Hoogaars en 2007, Tbx3 pourrait impartir des capacités d'activité autonome dans des cellules embryonnaires auriculaires [10]. Toutefois, dans des cellules matures (adultes), ce n'est pas

aussi simple. Selon Bakker *et coll.* en 2012, Tbx3 réprime l'expression de gènes typiquement observés dans les cellules pacemakers (comme les gènes impliqués dans l'expression de Cx-40 et Cx-43 dans les cellules auriculaires adultes chez la souris). Toutefois, Tbx3 n'arrive pas à induire l'expression protéique du canal HCN4, important pour l'apparition de l'activité spontanée [11]. Ainsi, bien que les cellules adultes traitées avec le Tbx3 manifestent plusieurs effets physiologiques similaires aux cellules pacemakers (diminution de Cx, diminution I_{K1} et I_{Na}), aucun potentiel d'action spontané n'a pu être mesuré dans ces cellules [11]. La différence entre les cellules pacemakers et les cellules pacemaker-like est donc au niveau de la présence ou non d'activité autonome spontanée (Figure 2).

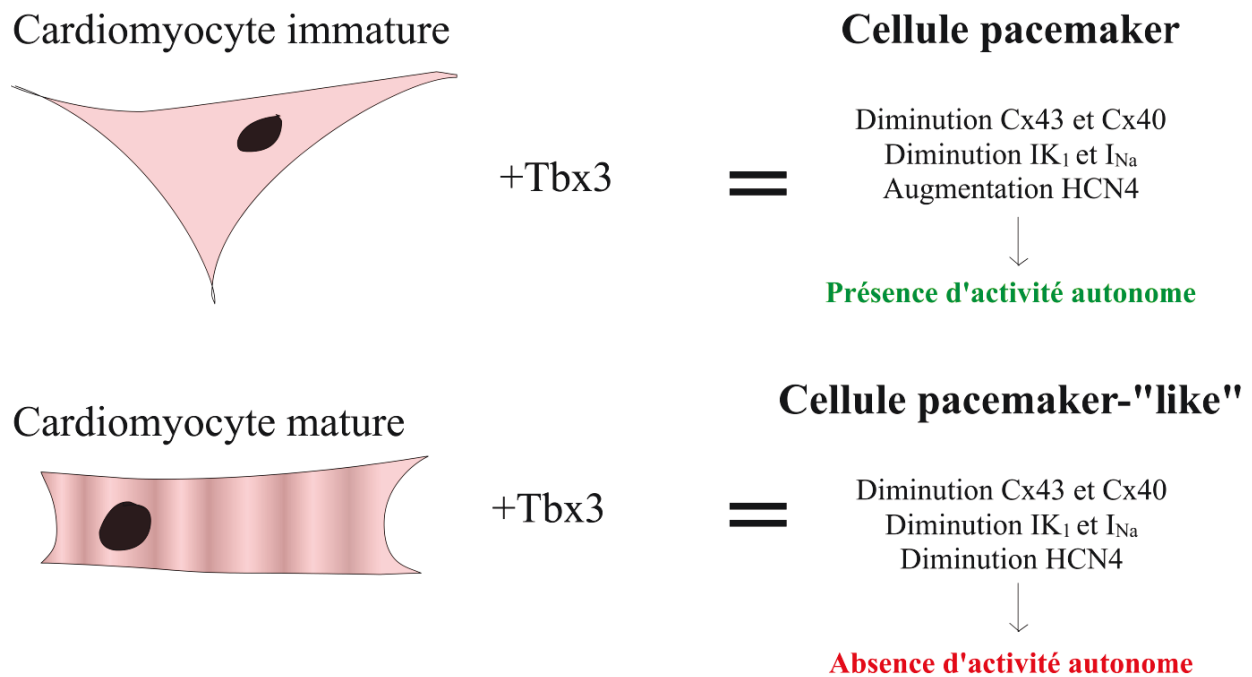


Figure 2 - Différentiation via Tbx3 et effets sur le développement de l'activité pacemaker

Tbx3 agit différemment sur le développement de l'activité pacemaker dans les cardiomyocytes immatures (cellules embryonnaires/néonatales) et dans les cardiomyocytes matures (cellules adultes). Les cardiomyocytes adultes traités avec Tbx3 ne parviennent pas à exprimer HCN4 et se doter de fonctions contractiles spontanées, malgré qu'ils possèdent plusieurs caractéristiques de cellules pacemakers. C'est pourquoi elles ont été définies comme des cellules pacemakers-« like » (similaires à des cellules pacemakers).

Les protéines Tbx sont connues pour replier l'ADN selon une séquence spécifique sous le nom de domaine T [12]. Ces repliements sont associés à des syndromes du développement et de plus en plus d'évidence démontre leur implication dans certains cancers. La présence ou l'absence de certains facteurs Tbx spécifiques lors des étapes d'embryogénèse et l'impact que cela avait sur le développement ont conduit de récentes équipes à accorder plus d'intérêts aux facteurs Tbx, par exemple, dans l'utilisation et la transformation des cellules souches. Nous discuterons de ce point plus en détails plus tard dans la thèse.

Mésoderme postérieur 1 (*Mesp1*) est le premier facteur de transcription à être détecté lors du développement [13] et il est impliqué dans le développement du mésoderme, la migration des cellules progénitrices et leur différenciation et spécialisation [5]. Le développement du cœur en un organe à 4 cavités est le résultat de plusieurs étapes se passant dans les premières semaines du développement embryonnaire (figure 3). Le processus débute par la formation de 2 tubes endocardiaux qui se joignent pour former le tube cardiaque primitif. C'est ce dernier qui va se replier et se séparer pour former les 4 cavités et le tronc artériel qui forment le cœur humain. Chaque étape est cruciale au bon développement structurel et fonctionnel du cœur en devenir. *Mesp1* est donc un facteur important dans le développement embryonnaire cardiaque. D'ailleurs, son inactivation chez la souris donne lieu à d'importantes malformations cardiaques (*cardia bifida*) dues à un problème de fusion du mésoderme ventral et ceci mène l'embryon à la mort dès le jour 10.5 [13]. Au niveau cellulaire, malgré l'absence de *Mesp1*, il est possible d'observer certains signes de différenciation en myocarde et endocarde; suggérant une possibilité de compensation des fonctions de *Mesp1* par l'entremise d'autres gènes (*Mesp2*) [13]. Des études fonctionnelles ont également démontré qu'une augmentation de l'expression de *Mesp1* favorise la différenciation des cellules souches embryonnaires en cardiomyocytes auriculaires, ventriculaires et de type « pacemaker » [14, 15].

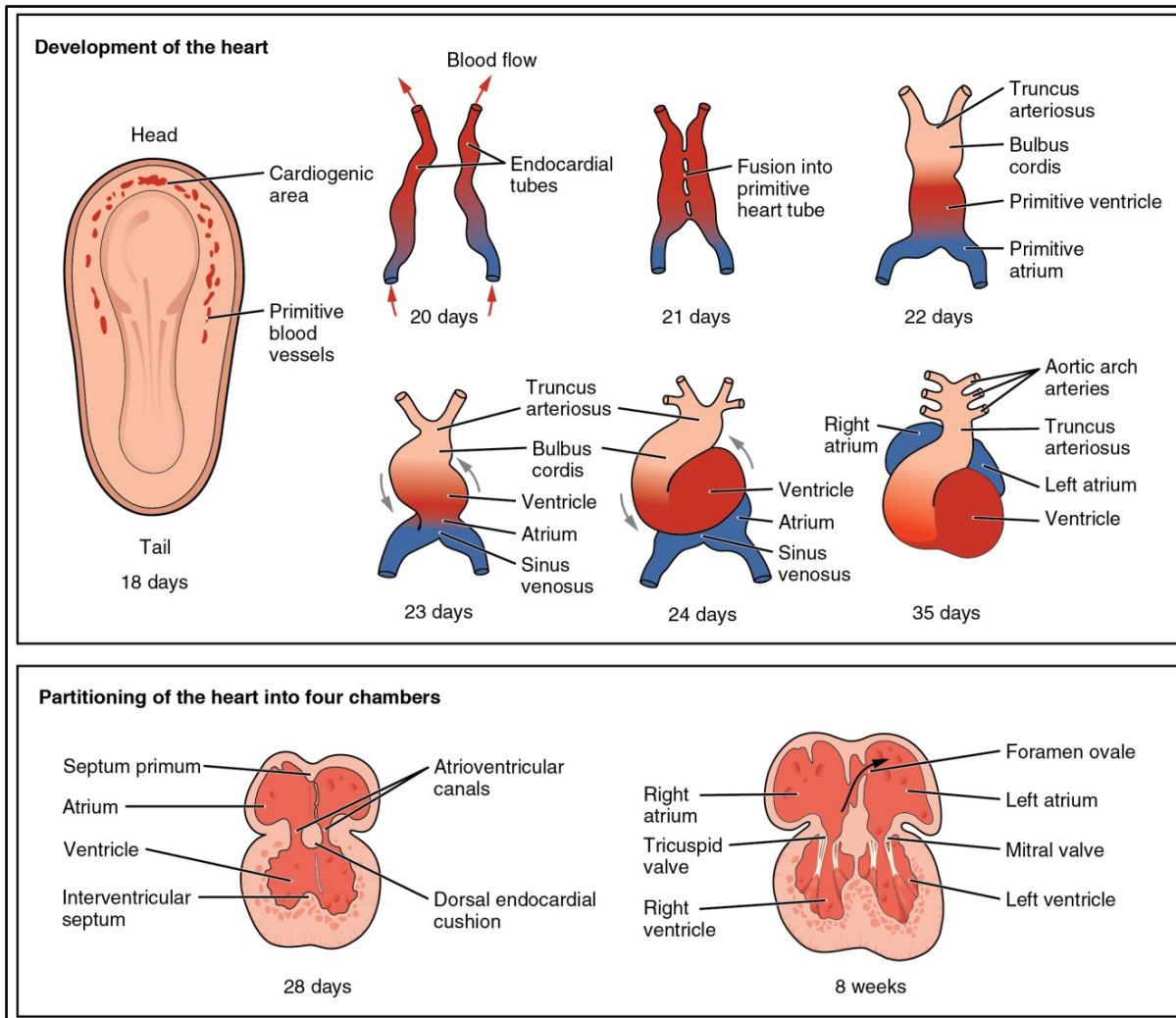


Figure 3 – Étapes de développement du cœur durant les premières semaines du développement embryonnaire.

Le développement du cœur en un organe à 4 cavités est le résultat de plusieurs étapes se passant dans les premières semaines du développement embryonnaire. Tiré de : Wikimedia commons, Author : OpenStax College, Anatomy & Physiology, Connexions Web site. Licence Creative Commons Paternité 3.0 (non transposée).

Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) est un facteur de transcription exprimé durant l'embryogénèse et dans le tissu adulte. L'isomère Mef2cb serait impliquée dans la formation du tube cardiaque primitif [5]. L'expression de MEF2 dans le cœur est contrôlée via un MEF2 cardiac enhancer qui est régulé à son tour via Tinman (NK-homeodomain transcription factor)

et Pannier (*GATA transcription factor*). L'ajout de MEF2 avec d'autres facteurs de transcription comme Tinman et Pannier augmente dramatiquement l'expression de marqueurs cardiaques (Hand et *Sulphonylurea receptor*) [16].

Wnt joue un rôle important durant le développement cardiaque chez les vertébrés. Il est généralement silencieux chez les personnes saines, mais une réactivation est observée dans certaines pathologies [17]. En l'absence d'un ligand, la protéine bêta-catenine est phosphorylée par un complexe de protéines cytoplasmiques (le « complexe de la destruction »). La protéine bêta-catenine est ubiquitinée et se fait dégrader. Wnt interagit avec le récepteur Frizzled (Fz) et le co-récepteur Low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6 (Lrp5/6) bloquant la dégradation de la bêta-catenine via la destruction du « complexe de destruction ». Cette dernière est alors transportée au noyau où elle régule l'expression de plusieurs gènes ciblés (figure 4) [18].

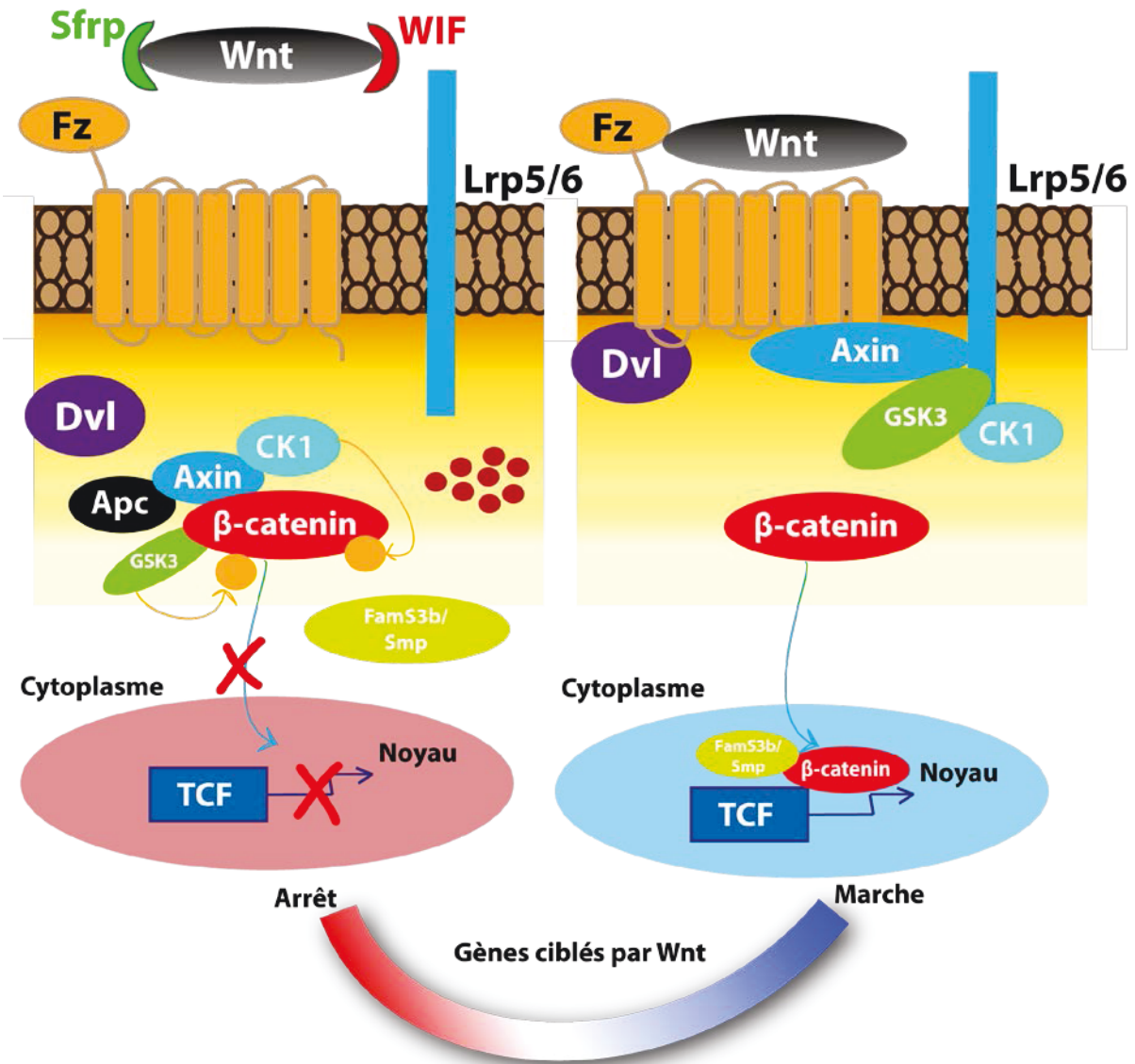


Figure 4 - Cascade de signalisation de Wnt/beta-catenin

En interagissant avec les récepteurs Fz et Lrp5/6, Wnt empêche la formation du complexe de la destruction qui empêche l'ubiquitination de la bêta-catenine et sa dégradation subséquente. Plusieurs gènes du développement cardiaque sont sous l'influence de Wnt via son action sur la bêta-catenine. Adaptée de Ozhan et al. [18].

Il a été démontré que Shox2 régule le réseau génétique par la répression qu'il exerce sur Nkx2.5, sa phosphorylation [19] permet le développement des caractéristiques *pacemakers* via un profil génétique d'expression spécifique incluant HCN4 et Tbx3 [4]. Des variations au

niveau de Shox2 sont reliées à des pathologies du système de conduction spécialisée et à des problèmes de différenciation des cellules du nœud sino-auriculaire menant à de la bradycardie [4]. Plus spécifiquement, la délétion de Shox2 dans le domaine Nkx2-5(+) du nœud sino-auriculaire induit le *sick sinus syndrome* et mène à la perte du « programme pacemaker » qui se traduit par la perte de HCN4. La délétion du Shox2 induit une diminution de la fréquence des contractions autonomes et une baisse d'expression de HCN4, Cx45, Tbx2, Tbx3 et BMP4. Cx40, Cx43, Nkx2.5 et Tbx5 subissent plutôt une hausse d'expression suite à cette même délétion de Shox2 [20]. Les cellules shox2 positive quant à elles présentent certaines caractéristiques électrophysiologiques de cellules nodales et ont la capacité d'entraîner les cellules shox2 négative aux alentours [21]. Shox2 s'avère donc un facteur important du développement de tissu cardiaque de type *pacemaker*.

1.1.3. Morphologie cardiaque

Le chapitre précédent montre qu'un réseau complexe de différents facteurs est impliqué dans le développement du cœur. Parmi ces facteurs, les facteurs de transcription jouent un rôle important pour la régulation de l'expression de gènes associés au développement cardiaque [22] et ceci, dès les premières étapes de la cardiogenèse. Ces étapes mènent à la structure du cœur telle qu'on la connaît aujourd'hui et constituera le sujet de la prochaine section.

Pour les organismes plus primitifs, comme les poissons, le cœur agit tout simplement comme une pompe qui propulse le sang le long de cavités qui sont disposées l'une à la suite de l'autre (cœur en série) (figure 5A). Pour les organismes plus évolués, comme les mammifères, le cœur est situé au centre gauche de la cage thoracique, c'est une pompe constituée de quatre cavités, soit deux ventricules et deux oreillettes (figure 5B). L'accumulation du sang dans le ventricule gauche jumelée au pulse électrique qui induit la contraction du ventricule produit un stress mécanique élevé qui, une fois le niveau de pression suffisant atteint, propulse le sang hors du ventricule gauche dans l'aorte et dans le réseau vasculaire [23]. Il revient ensuite par les veines caves (supérieure et inférieure) et se déverse dans l'oreillette droite. Il traverse la valve tricuspide pour remplir le ventricule droit. Le sang passe, à travers les valvules semilunaires, dans l'artère pulmonaire afin de le réoxygéner, revient par les veines

pulmonaires dans l'oreillette gauche pour remplir à nouveau le ventricule gauche, finalement, le cycle recommence (figure 6). Le cœur se contracte environ 70 fois par minute (en moyenne) pour ainsi propulser 7000 litres de sang par jour à travers le système cardiovasculaire. Le cœur possède une structure hautement organisée et des propriétés électrophysiologiques et mécaniques uniques. Cette matrice extracellulaire permet de maintenir les cardiomyocytes en place, d'assurer le transfert de la force de contraction et de prévenir les dommages musculaires dus à des elongations excessives des fibres musculaires [24]. Les multiples couches de fibres cardiaques en forme d'hélice sont essentielles pour maximiser la force de contraction et la coordination des activations est due au système de conduction (fibres de Purkinje). La matrice extracellulaire sert de soutien pour les fibres cardiaques et ceci dicte l'intégrité structurelle 3D du cœur [24] qui est très importante pour assurer l'intégrité de la fonction cardiaque.

1.1.4. Fonction cardiaque

Le cœur est constitué de divers types cellulaires tels que des cellules endothéliales (vaisseaux), des fibroblastes (structure et maintien), mais surtout composé de cardiomyocytes, des cellules dotées d'une capacité contractile. Ce sont ces cardiomyocytes qui permettent au cœur d'accomplir sa fonction de pompe. Lors de la contraction mécanique, l'apex du ventricule gauche tourne dans le sens des aiguilles d'une montre alors que la base tourne dans le sens inverse. Cette torsion amplifie la contraction des cardiomyocytes de 15 à 40 % et résulte en une fraction d'éjection de plus de 60 % dans un cœur normal [25].

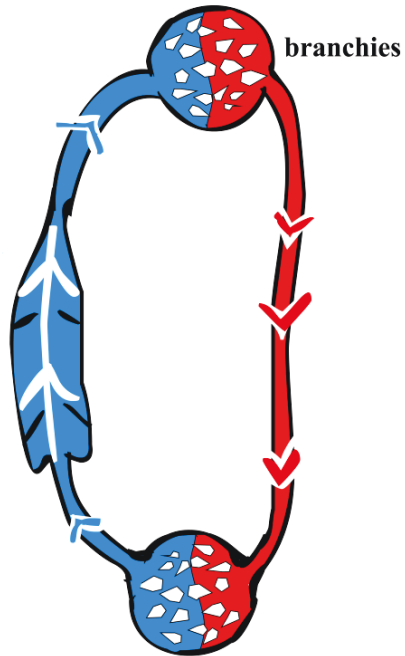
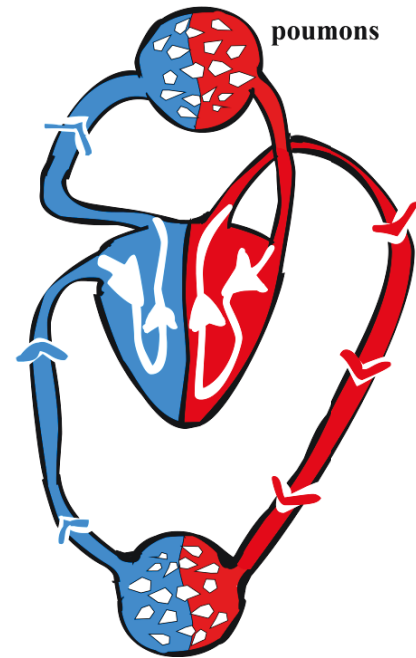
A**Coeur en série****B****Coeur en parallèle**

Figure 5 - Système de circulation sanguine

Système cardiovasculaire dans différentes espèces. A. Chez le poisson (cœur en série). B. Chez le mammifère (cœur en parallèle). Adaptée de Sylva, 2014 [3].

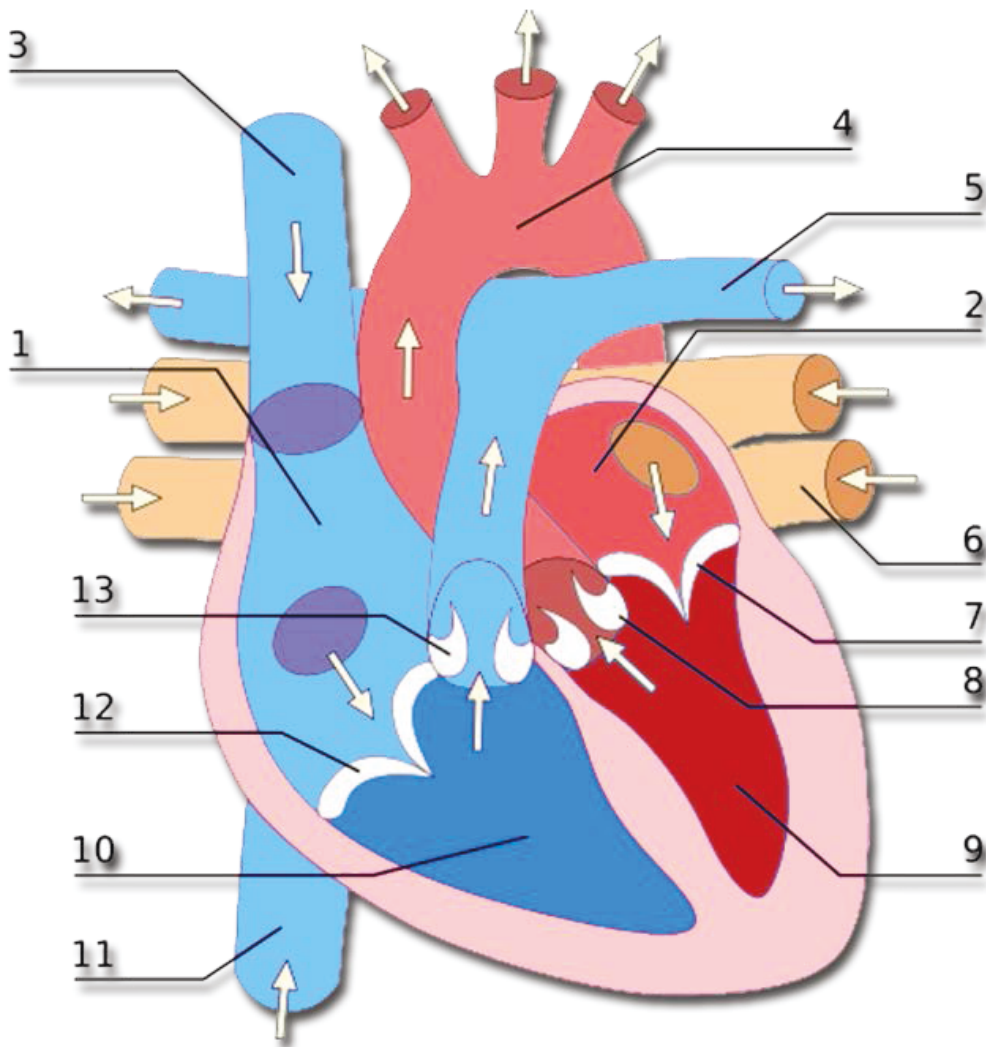


Figure 6 - Les structures du cœur

- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1. Oreillette droite | 8. Valve aortique |
| 2. Oreillette gauche | 9. Ventricule gauche |
| 3. Veine cave supérieure | 10. Ventricule droit |
| 4. Aorte | 11. Veine cave inférieure |
| 5. Artère pulmonaire | 12. Valve tricuspide |
| 6. Veine pulmonaire | 13. Valve sigmoïde |
| 7. Valve mitrale | |

Modifiée de Wikimedia commons, créée par Wapcaplet, Licence Creative Commons Paternité 3.0 (non transposée).

1.2. La physiologie du cœur

1.2.1. Mécanismes responsables de l'automaticité électrique cardiaque

L'activité électrique est initiée au niveau du nœud sinusal et se propage de façon ordonnée via le système de conduction. La formation du potentiel d'action (PA) à l'origine de l'activité électrique autonome est possible grâce à différents courants ioniques (I) dont la dynamique et la perméabilité spécifique en font des acteurs importants à différentes phases. Au niveau cellulaire, l'automaticité repose sur trois mécanismes intimement couplés aux horloges : membranaire, calcique et à une contrainte mécanique (figure 7). Une horloge est un mécanisme autonome capable de générer des PA et de maintenir le rythme d'activation même dans une situation en absence de toute stimulation électrique ou humorale [26].

L'horloge membranaire résulte de la synergie de plusieurs courants membranaires, notamment: le courant pacemaker I_f , les courants potassiques sortants (I_{K1} et I_{to}), le courant de l'échangeur sodium-calcium (I_{NCX}), le courant calcique transitoire (I_{CaT}) et le courant calcique de type L (I_{CaL}) provoquant un flux net de cations entrant dans la cellule durant la diastole qui dépolarisent la membrane jusqu'au seuil d'activation. Une dépolarisation diastolique est favorisée dans les cardiomyocytes (CM) autonomes par la réduction de I_{K1} et I_{to} , la désactivation de I_{Kr} , l'augmentation de I_{CaL} [27] et l'activation de I_f [28]. Le courant I_f , contrôlé par l'AMPC, activé par la stimulation des récepteurs β -adrénergique et inhibé par la stimulation des récepteurs muscariniques de type M2, représente un mécanisme important du système nerveux autonome dans la régulation du rythme cardiaque [29]. I_f circule à travers les Hyperpolarization Cyclic Nucleotide-gated channel (HCN), des canaux qui s'activent lors de l'hyperpolarisation. Chez les mammifères, quatre sous-unités homologues existent (HCN1-4) formant des tétramères distincts ayant des propriétés biophysiques différentes. Le canal formé par HCN4 est prédominant dans le nœud sinusal; selon des résultats obtenus dans un modèle de souris déficiente en HCN4, il n'est pas essentiel à l'obtention de l'automaticité; il sert plutôt à sa stabilisation [30]. Le canal formé par HCN2 est moins fortement exprimé dans le nœud sinusal que celui de HCN4, il sert en complément et prend la relève dans le cas d'une déficience du canal formé par HCN4 [30]. Du point de vue fonctionnel, I_f permet la dépolarisation lente lors de la diastole qui active I_{CaT} . I_{CaT} prend alors le relais d' I_f et active

I_{NCX} . Quand le potentiel d'activation de I_{CaL} est atteint, le PA est initié. Le rôle joué par I_f a été démontré expérimentalement par l'arrêt [31] ou le ralentissement de l'activité autonome dans les CM quand il est inhibé par mutation des canaux HCN ou par blocage pharmacologique par l'ivabradine [32].

De son côté, l'horloge calcique résulte des oscillations de la concentration interne de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) de la cellule. Le réticulum sarcoplasmique relâche spontanément de petites quantités de Ca^{2+} qui se lient localement aux récepteurs à ryanodine (RyR) et à l'inositol-triphosphate (IP3R), amplifiant le phénomène de relâche jusqu'à l'initiation de contractions cellulaires. L'oscillation du Ca^{2+} est indépendante de I_{CaL} et I_{NCX} et du potentiel transmembranaire; elle persiste quand ces courants sont bloqués et que le potentiel est fixé par voltage imposé [33]. Les contractions cessent dans les CM de souris néonatales quand les RyR et IP3R sont inhibés simultanément [33]. Les oscillations du Ca^{2+} peuvent interagir avec l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX); le courant entrant dépolarise la cellule jusqu'au seuil d'activation et initie le PA [33].

Les horloges membranaires et calciques n'expliquent pas la rapidité de l'adaptation du rythme cardiaque aux changements de contraintes mécaniques telles que la charge hémodynamique. Le cœur même *ex vivo* adapte son rythme cardiaque autonome très rapidement. Cette réponse chronotrope positive est indépendante du système adrénergique et cholinergique [34]. Elle est aussi indépendante de l'activation neurale intra- ou extra-cardiaque que ce soit pour le cœur entier ou à différents niveaux isolés tels le tissu auriculaire [35], le nœud sinusal [36] et même la cellule du nœud sinusal [37]. Ce phénomène repose sur la rétroaction mécano-électrique qui décrit la régulation interne liant l'environnement mécanique du CM avec son activité électrique [38]. La contrainte mécanique est donc un stimulus qui perturbe les horloges mentionnés précédemment et dans le meilleur des cas, elle crée une modulation qui peut avoir un impact à long terme sur l'automaticité. Cette régulation par les contraintes mécaniques est aussi existante dans des monocouches de CM de rats néonataux avec activité autonome.

La flexibilité et la robustesse de l'automaticité sont rendues possibles grâce au couplage intime des différentes horloges. La communauté scientifique a longtemps été divisée sur la source primaire de l'automaticité oscillant entre l'horloge membranaire et l'horloge calcique [39]. Récemment, il semble que l'idée du couplage important entre les deux horloges mène au consensus [40]. Ainsi, l'oscillation de la $[Ca^{2+}]_i$ a besoin de NCX pour générer le PA. D'un

autre côté, l'entrée de Ca^{2+} via I_{CaL} et I_{CaT} rehausse la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, qui active les RyR et IP3R. La contrainte mécanique serait aussi couplée aux deux autres horloges. Ainsi, la sensibilité à la stimulation mécanique a été reportée dans les canaux ioniques d' I_f [41, 42], I_{Na} [43], I_{CaL} [44], I_{NCX} [45], I_{K} [46], tous reliés à l'horloge membranaire. D'autre part, la contrainte mécanique est couplée à l'horloge calcique en favorisant l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par une éventuelle élévation de la probabilité d'ouverture des RyR [47], une augmentation de la fuite de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique [48] et une diminution du taux de recapture [49].

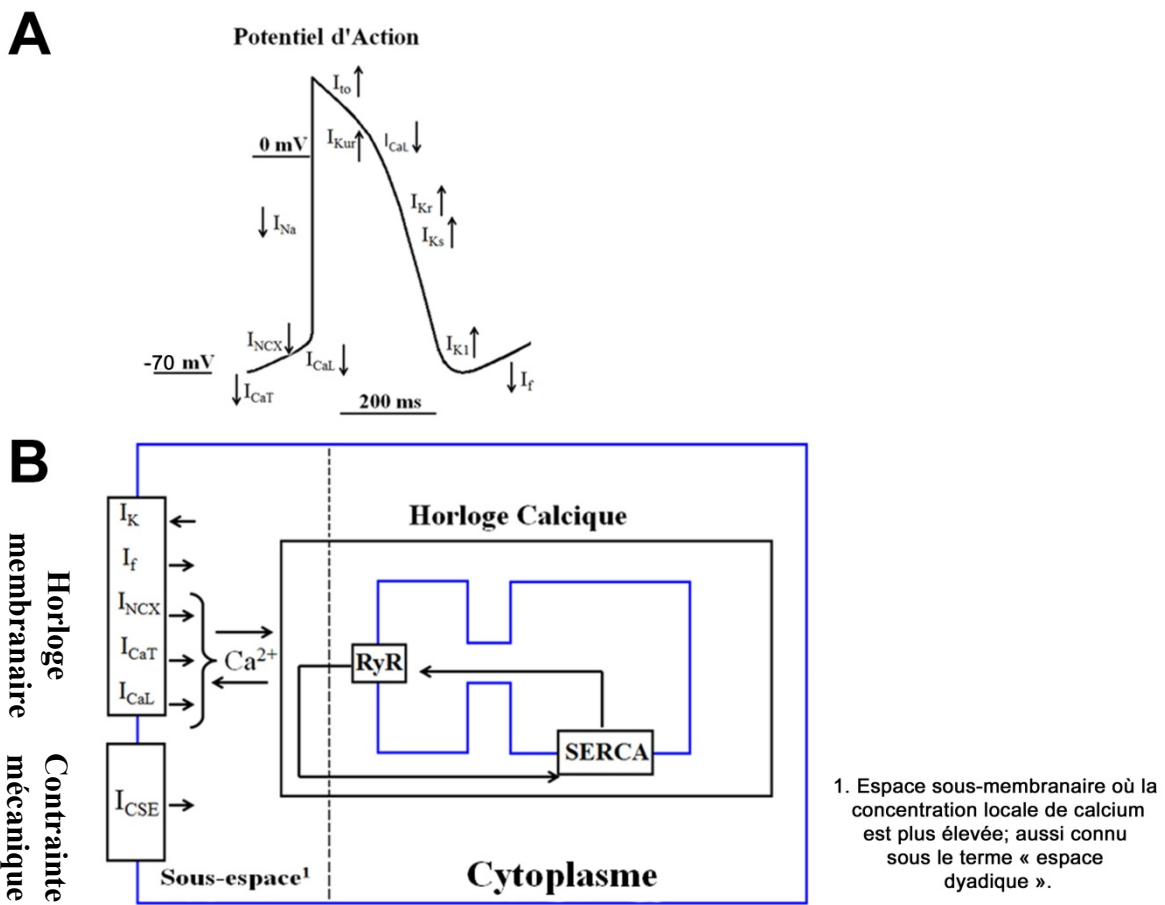


Figure 7 - L'automaticité cardiaque

Tiré de B.Beland et al. 2013 (CRCQ-2012 Vol.2 No.2 : <http://www.msamerique.ca/articles/genie-tissulaire-applique-a-l-activite-electrique-cardiaque-autonome-une-alternative-au-pacemaker-electronique>)

1.2.2. La propagation électrique

L'activité contractile cardiaque ordonnée est possible grâce à la participation de facteurs actifs et passifs. Un de ces facteurs est la présence de jonctions communicantes. Le rôle des jonctions communicantes est de connecter le milieu intracellulaire de CM pour permettre à l'activité électrique de se propager rapidement et de manière ordonnée. Ces jonctions sont formées de plusieurs connexines (Cx) : Cx40, Cx43, Cx45 et Cx30.2 [50, 51] et l'organisation de ces Cx dans les jonctions communicantes va varier selon la région et l'état du cœur (situations physiologiques et pathologiques) [52]. Cx43 est prédominante dans les ventricules. Les jonctions communicantes peuvent s'adapter selon la fréquence de contraction des cardiomyocytes afin d'assurer une propagation adéquate (jusqu'à un certain niveau où leur propriétés électriques seront affectées) [50]. De plus, une diminution des niveaux de Cx augmente la résistance intercellulaire pouvant contribuer à perturber la conduction électrique et constitue ainsi une cause importante d'arythmies [51, 53]. Le ratio de Cx peut également affecter la transmission d'un signal entre les cellules (couplage); un ratio élevé Cx43:Cx40 diminue le couplage alors qu'un ratio bas de Cx43 :Cx40 l'augmente [51] à cause de la différence de conductance entre ces sous-types de Cx. De plus, il a été observé que, dans le cas d'une insuffisance cardiaque, l'expression de Cx43 est diminuée alors que celle de Cx45 est augmentée [54].

Les disques intercalaires sont des structures offrant un site de contact électrique et mécanique favorisant la formation de Cx fonctionnelles (par accouplement de connexons venant de chacune des cellules). Récemment, il a été montré que ces structures pourraient également avoir un rôle dans la propagation électrique entre les cardiomyocytes [55].

Lorsque survient une perte du nombre de cardiomyocytes, par exemple, suite à une maladie ischémique comme l'infarctus du myocarde, la pompe cardiaque perd une portion de sa capacité contractile. Cette perte de fonction peut se traduire progressivement vers d'autres pathologies compensatoires comme l'insuffisance cardiaque ou l'hypertrophie cellulaire. Il s'avère donc essentiel de tenter de renverser cette situation en trouvant le moyen de renouveler les cardiomyocytes et d'en optimiser leur capacité. Il est possible de parvenir à cette fin par l'utilisation de diverses approches de régénération cellulaire.

1.2.3. Régénération cardiaque

Il est intéressant de constater que chez certains animaux comme les poissons et les amphibiens, la régénération du tissu cardiaque est tout à fait possible [18]. Également, chez la souris néonatales, on observe également ce phénomène de régénération cardiaque via la prolifération de cellules différenciées en cardiomyocytes, toutefois, cette habileté est rapidement perdue (en dedans de 7 jours) [18]. Un certain renouvellement des cardiomyocytes est également observable chez l'homme, par contre, ce dernier est à un niveau beaucoup trop lent pour arriver à régénérer le cœur. Par exemple, en 2009, Bergmann *et collaborateurs* ont évalué le taux de renouvellement annuel des cardiomyocytes à entre 0.5 et 1 % [56]. D'autres équipes sont arrivées à des pourcentages de renouvellement un peu plus optimistes, soit entre 4 à 10 % [57].

Ainsi, le cœur a dû développer certains mécanismes d'adaptation et de remodelage (comme l'hypertrophie) pour s'adapter aux blessures auxquelles il fait face. Nous allons aborder ces mécanismes dans la section qui suit sur les pathologies cardiaques. De plus, lorsque survient des problèmes au niveau des stimuli de l'environnement cardiaque (fonctions primaires du cœur), il peut s'ensuivre divers troubles d'ordre électrique ou mécanique (figure 8).

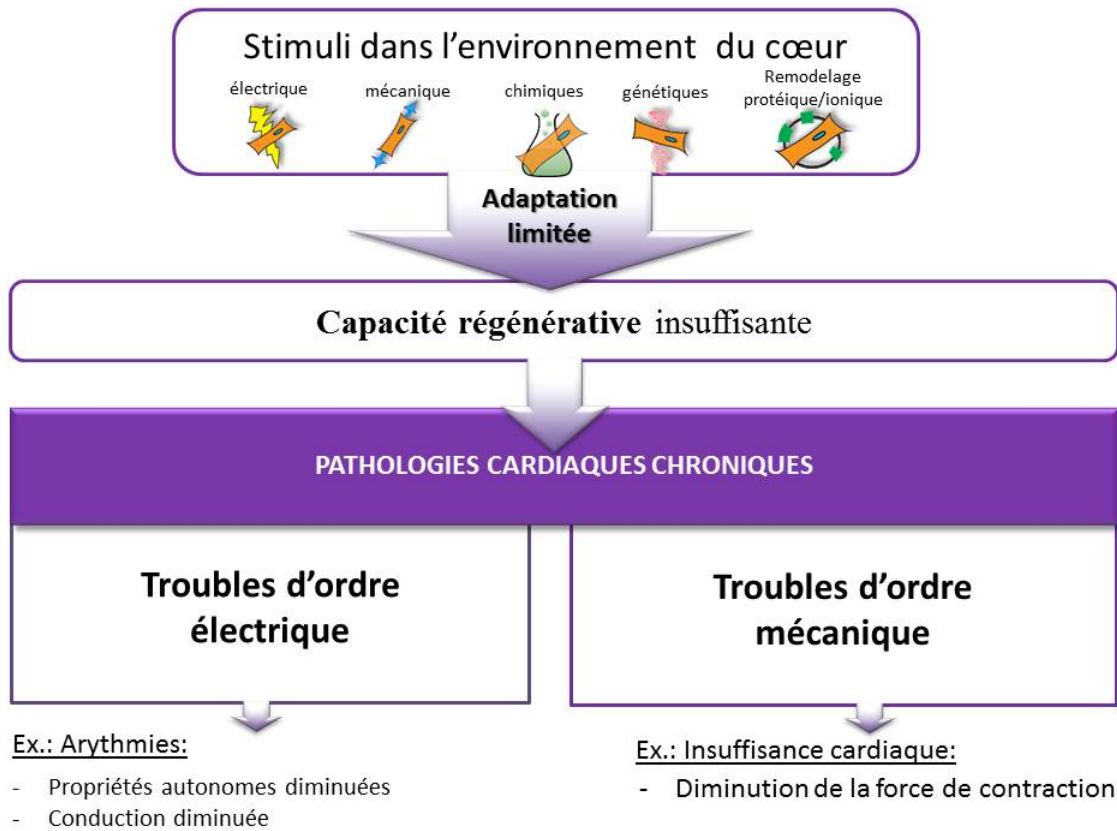


Figure 8 - Pathologies cardiovasculaires en réponse à des perturbations de l'environnement cardiaque

Créée à partir de Lazzara et al.[58], Kopanic et al.[59], Shimkunas et al.[60].

1.3. Les pathologies cardiaques

1.3.1. Leur origine

Le cœur des mammifères a longtemps été considéré comme un organe post-mitotique, c'est-à-dire, qu'un nombre total de cardiomyocytes est défini à la naissance et que ce nombre ne fait que diminuer avec les années [61]. Toutefois, des études récentes ont démontré que les cellules cardiaques pouvaient se régénérer chez les mammifères adultes [62, 63]; environ 50% des cardiomyocytes seraient renouvelés durant une vie normale avec un taux de renouvellement d'environ 1 % à l'âge de 25 ans et de 0.45 % à l'âge de 75 ans [56]. Une étude de Senyo *et coll.* en 2013 a montré que la genèse de ces cardiomyocytes provenait de la division des cardiomyocytes adultes préexistants et que ce processus constituait la source principale de renouvellement des cardiomyocytes en conditions physiologiques et pathologiques (processus accéléré en périphérie d'une blessure ischémique) [57]. Toutefois, ce faible taux de renouvellement est insuffisant pour renverser certaines situations pathologiques où de grandes quantités de cardiomyocytes sont perdues.

Les pathologies sont souvent de causes multifactorielles, toutefois, on observe qu'elles partagent fréquemment des mécanismes similaires [64]. Elles peuvent être autant causées par de la mortalité cellulaire (apoptose ou nécrose), des mutations génétiques causant des malformations congénitales [65] au niveau du cœur, des déficiences de fonctionnement de certaines protéines ou canaux ioniques impliqués dans le fonctionnement normal du cœur (figure 9 **Error! Reference source not found.**), certains facteurs environnementaux (toxicité) ou psychologiques (stress), de même que par des processus normaux qui surviennent lors du vieillissement (diminution d'efficacité).

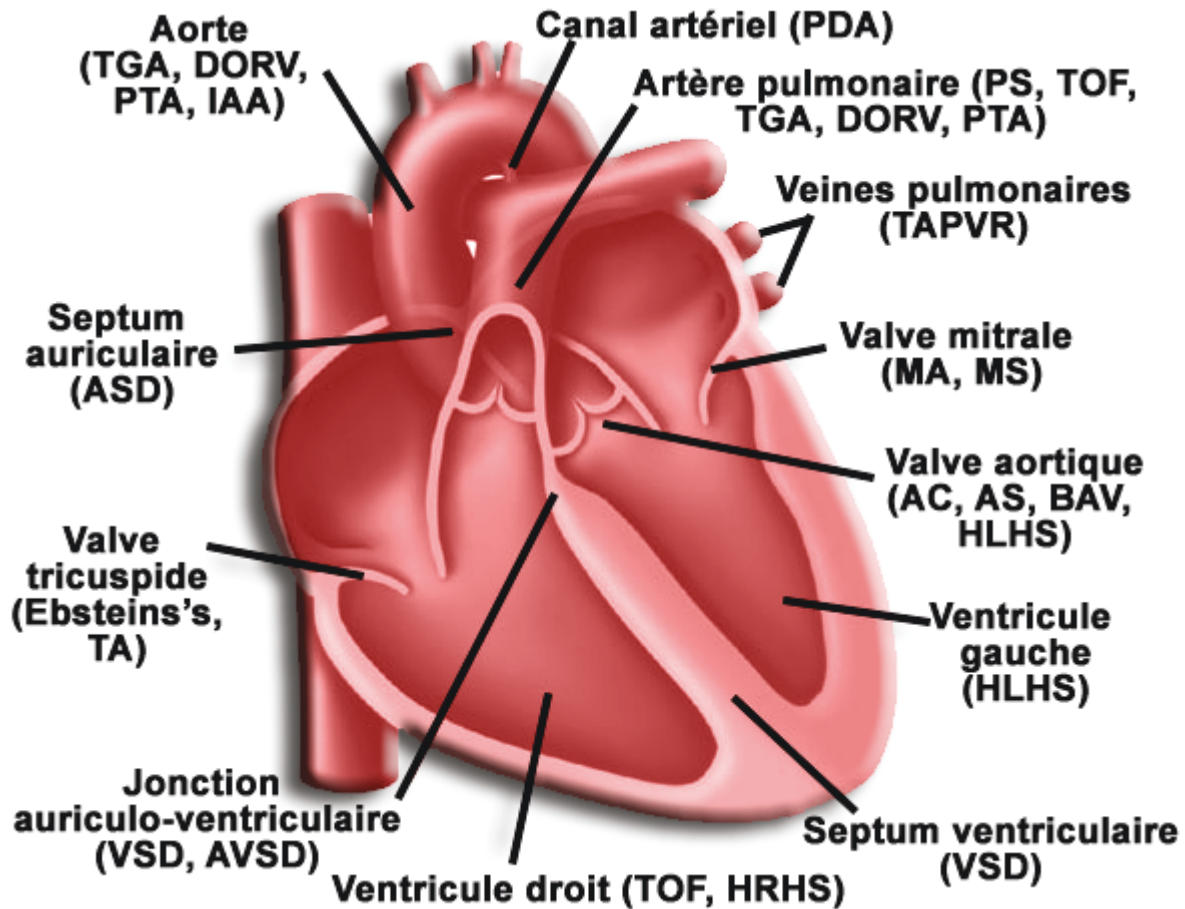


Figure 9 - Développement de pathologies cardiaques congénitales.

Diagramme d'un cœur adulte illustrant les différentes structures affectées par des pathologies congénitales, l'incidence estimée par 1000 naissances est indiquée entre parenthèses. **Canal artériel** : PDA, patent ductus arteriosus (0,8); **artères pulmonaires** : PS, pulmonary artery stenosis (0,7); TOF, tetralogy of Fallot (0,4); TGA, transposition of the great arteries (0,2); DORV, double outlet right ventricle (0,2); PTA, persistent truncus arteriosus (0,1); **veines pulmonaires** : TAPVR, total anomalous pulmonary venous return (0,1); **valve mitrale** : MA, mitral atresia; MS, mitral stenosis; **valve aortique** : AC, aortic coarctation et AS, aortic stenosis (0,8); BAV, bicuspid aortic valve (14,0); HLHS, hypoplastic left heart syndrome (0,2); **ventricule gauche** : HLHS, hypoplastic left heart syndrome (0,2); **septum ventriculaire** : VSD, ventricular septal defect (4,0); **Aorte** : TGA, transposition of the great arteries (0,2); DORV, double outlet right ventricle (0,2); PTA, persistent truncus arteriosus (0,1); IAA, interrupted aortic arch (0,02); **septum auriculaire** : ASD, atrial septal defect (1,0); **valve tricuspide** : Ebstein's, Ebstein's anomaly of the tricuspid valve (0,1); TA, tricuspid atresia (0,1); **jonction auriculo-ventriculaire** : VSD membranaire, ventricular septal defect (4,0); AVSD, atrioventricular septal defect (0,3); **ventricule droit** : TOF, tetralogy of Fallot (0,4); HRHS, hypoplastic right heart (0,2). Image modifiée de [65].

1.3.2. Mécanisme de mort cellulaire

L'apoptose cellulaire est un mécanisme de mort cellulaire programmée par lequel la cellule déclenche sa propre autodestruction par fragmentation de l'ADN. Cette mort programmée est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire et constitue donc un mécanisme physiologique nécessaire à la survie de l'organisme. Ce type de mortalité est caractérisée par une absence d'inflammation dû au fait que les corps apoptotiques formés sont vite phagocytés par les cellules en périphérie. L'apoptose est responsable pour une grande portion de la perte massive de cardiomyocytes lors du vieillissement [62]. En considérant seulement les mécanismes d'apoptose (absence de régénération et d'autres pathologies causant la mortalité des cardiomyocytes), les cardiomyocytes finiraient par disparaître avec les années [62].

La nécrose est, par opposition à l'apoptose, une mort cellulaire prématurée. Le processus implique une perte de l'intégrité de la membrane qui provoque l'écoulement de fluide induisant une réponse inflammatoire dans les tissus environnant et une accumulation de cellules mortes. Ainsi, lors de la nécrose, on observe généralement un gonflement de la cellule et des organites (mitochondries) et la formation de renflements membranaires. Ce type de mortalité provoque une fragmentation de l'ADN et un débalancement irréversible de l'homéostasie calcique.

1.3.3. Cardiomyopathies

La cardiomyopathie hypertrophique est la forme la plus commune des cardiomyopathies (avec une prévalence de 0.2%), elle provient de plus de 100 mutations dans 11 gènes qui codent pour les protéines contractiles. Elle est caractérisée par une hypertrophie du myocarde en absence d'étiologie identifiable (comme l'hypertension, la sténose aortique, la fibrose interstitielle, la performance réduite du ventricule gauche...)[25]. L'hypertrophie cellulaire est un phénomène potentiellement perturbant pour la cellule particulièrement au niveau des cellules cardiaques. En effet, celles-ci doivent s'adapter au changement de taille du cardiomyocyte et de nouveaux sarcomères doivent être ajoutés (croissance en 3D) en plus des constituants nécessaires à l'expansion de la membrane cellulaire. Ces changements doivent se

faire dans un certain équilibre afin d'éviter tout débalancement au niveau de la structure cellulaire [66]. Malheureusement, cela est seulement possible dans certaines limites et bien que l'hypertrophie puisse paraître bénéfique à certains niveaux à court terme, le mécanisme de croissance débalancée prend souvent le dessus à la longue et est souvent associé à un état pathologique.

La cardiomyopathie dilatée est caractérisée par une augmentation de la masse et du volume du ventricule gauche accompagnée d'un étirement et d'un amincissement de la paroi du ventricule gauche [25]. Une anomalie génétique a été observée chez 25-35 % des patients avec cette pathologie, mais plusieurs autres causes sont possibles (infarctus du myocarde, l'alcool, toxicité à l'adriamycine, sarcoïdose, myocardite virale). Il existe aussi des cas sans explications, soit les causes idiopathiques). La cardiomyopathie dilatée est associée avec une réduction de la tension dans toutes les directions (longitudinales, radiales et circonférentielles) [25] ce qui diminue la capacité du cœur à effectuer sa fonction de pompe (diminution de la fraction d'éjection).

Certaines déficiences structurelles, comme par exemple du système de conduction, vont également être une cause de pathologies cardiaques. Le nœud sinusal est une structure qui produit le pulse électrique nécessaire à l'activation de la contraction des cavités cardiaques. Des anomalies structurelles au niveau du nœud sinusal ou le long du système de conduction (faisceau de Hiss, fibres de Purkinje...) vont affecter la propagation de l'activité électrique et ainsi perturber le rythme cardiaque. Le rythme cardiaque peut alors être ralenti ou accéléré. En cas de bloc du nœud sinusal, le progression du signal électrique est ralentie considérablement et donc le rythme cardiaque l'est pour autant [67]. Ainsi, s'il était possible de restaurer une activité sinusale « normale » par différentes approches (comme par l'utilisation du *biopacemaker* que nous verrons plus loin dans cette thèse), cela pourrait diminuer un grand nombre de cas pathologiques.

1.3.4. L'infarctus du myocarde

L'occlusion d'une artère causée par un caillot suite à la rupture de la plaque athéromateuse provoque l'arrêt de la perfusion de la zone irriguée par cette artère. Après une

période sans apport sanguin, la zone subit des dommages ischémiques. Après un évènement ischémique de type infarctus avec nécrose ou zone infarctée, des mécanismes de réparation cellulaire s'installent rapidement. Ces mécanismes réparateurs permettent la formation de la cicatrice et l'infiltration de cellules inflammatoires afin de permettre l'élimination des cellules nécrosées du site de la blessure [64]. Lorsqu'une grande quantité de cardiomyocytes est ainsi perdue, des complications d'ordre mécanique peuvent survenir comme la dilatation ventriculaire, les troubles de rythme, la défaillance cardiaque.

1.3.5. L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est définie comme l'incapacité du cœur à maintenir la perfusion sanguine adéquate pour suffire aux besoins de l'organisme et constitue une des finalités de plusieurs pathologies cardiaques [68]. La diminution de la densité de canaux ioniques, des changements dans le transport du calcium intracellulaire, des déficiences dans le couplage entre les cellules, l'augmentation de la fibrose et l'hypertrophie cellulaire sont parmi les causes identifiées dans l'insuffisance cardiaque [68]. Ainsi, environ cinq millions d'Américains sont touchés par l'insuffisance cardiaque avec une incidence d'environ 10 cas par 1 000 habitants âgés de plus de 65 ans [69].

1.3.6. Les troubles du rythme

Le déséquilibre des horloges mène à des conséquences importantes, notamment des troubles de rythme se manifestant par une perturbation transitoire ou persistante du rythme cardiaque normal. Les perturbations du rythme cardiaque peuvent survenir par exemple à cause de déficiences génétiques, de pathologies acquises ou du vieillissement et leur apparition est souvent causée par la dysfonction des cellules pacemakers cardiaques [70]. Ainsi, une augmentation de I_{CaL} et I_{NCX} durant la période diastolique provoque une surcharge de calcium libre intracellulaire qui est une source majeure des post-dépolarisations retardées. Des dépolarisations précoces de la phase 2 et de la phase 3 peuvent également survenir par une augmentation de I_{CaL} et une diminution de I_{K1} respectivement.

La réentrée est causée par la présence d'un battement ectopique qui se propage dans un tissu réfractaire dans une direction pendant que ce même battement se propage plus rapidement dans des portions du tissu avec une période réfractaire plus courte dans l'autre direction [71] ou que cette vague d'activation se propage autour d'un obstacle fonctionnel ou anatomique [68]. Afin d'être maintenue, le pulse doit traverser le circuit suffisamment lentement pour permettre à chaque cellule de retrouver son excitabilité (le temps de conduction doit être plus grand que la plus longue période réfractaire). Cette période réfractaire est due au fait que les canaux sodiques sont inactivés lors de la dépolarisation et qu'ils ont besoin d'être repolarisés à -60 mV afin de retrouver leur excitabilité [71]. Ainsi, la durée du potentiel d'action qui dépend de la balance entre les courants entrants (surtout calciques) et sortants (surtout potassiques) affecte la période réfractaire.

La fibrillation auriculaire est une des arythmies les plus couramment rencontrées en clinique puisqu'elle peut survenir à tout âge, bien qu'elle soit plus fréquente chez les personnes âgées [71]. La fibrillation auriculaire est causée par une activation focale rapide causant un phénomène de réentrée due à une brisure de la vague d'activation des cellules auriculaires [71]. Des évidences montrent également l'implication du système rénine-angiotensine-aldostérone dans le développement de la fibrillation auriculaire. Les effets physiologiques connus de AT1 (récepteur de l'angiotensine II) sont la vasoconstriction, le relâchement d'aldostérone et de vasopressine, la rétention d'eau et de sodium, l'hypertrophie des cardiomyocytes auriculaires et le développement de la fibrose. Ainsi, ces répercussions négatives du système rénine-angiotensine-aldostérone prédisposent les patients à la fibrillation auriculaire en créant des conditions favorables à la formation de réentrée [72]. Par exemple, le développement de la fibrose va créer des zones qui ne conduisent pas uniformément les stimuli électriques et qui donc prédispose l'individu à l'apparition d'une réentrée pouvant causer la fibrillation auriculaire.

Le syndrome de dysfonction sinusale est un trouble de rythme affectant autant les hommes que les femmes [73]. Un patient sur 600 (de plus de 65 ans avec pathologie cardiaque) en est affecté. Il est souvent lié à un processus dégénératif, une fibrose du nœud sinusal, affectant également des sections adjacentes du système de conduction comme le nœud auriculo-ventriculaire et les faisceaux de His causant des troubles dans l'automaticité et dans la

propagation électrique [74]. Chez l'enfant, ce rare syndrome est associé à des malformations cardiaques congénitales pouvant causer des anomalies du système de conduction, à une hypertonie vagale ou à des complications post-chirurgies [73, 75]. Le syndrome de dysfonction sinusale peut également être causé par des mutations des canaux ioniques et des jonctions communicantes qui ont pour effet d'induire une augmentation de la durée du PA et de diminuer la vitesse de conduction [73].

1.3.7. Le remodelage cardiaque

Le remodelage est défini comme un changement cellulaire, moléculaire, génomique et interstitiel qui se manifeste cliniquement par des variations de la taille, forme et fonction du cœur suite à une blessure ou un stress [64]. Le remodelage peut survenir suite à plusieurs pathologies, par exemple, en réponse au stress mécanique causé par la nécrose des cardiomyocytes qui créent une augmentation de la pré-charge, les cardiomyocytes toujours en vie vont relâcher des cytokines qui activeront des mécanismes de survie et d'hypertrophie. Ainsi, il s'en suit un remodelage structurel de la géométrie globale du cœur.

Au niveau des oreillettes, le remodelage peut affecter la densité des canaux sodiques à la membrane, des jonctions communicantes ou modifier la structure du tissu. Le remodelage auriculaire peut également avoir un effet sur la durée du potentiel d'action et conséquemment sur la période réfractaire en réduisant le courant calcique de type L afin de prévenir les effets cytotoxiques d'une concentration trop élevée en calcium et en augmentant les courants potassiques (principalement I_{K1}). Ainsi, il contribue de manière très importante à favoriser et maintenir la fibrillation auriculaire [71].

Au niveau des ventricules, le remodelage est également un déterminant de l'occurrence d'arythmies ventriculaires. Plusieurs études ont montré que l'hypertension jumelée avec la présence d'une hypertrophie du ventricule gauche augmente la fréquence de battements ectopiques prématurés et conséquemment des arythmies [72]. Ces changements structurels et électriques au niveau du cœur ont souvent pour finalité la perte de la contractilité du cœur.

Le muscle cardiaque peut perdre son efficacité pour diverses raisons certes, toutefois, par le développement et l'utilisation de nouvelles approches dont cette thèse discutera dans le prochain chapitre (comme le génie tissulaire (utilisation des *biopacemakers*)), il serait possible d'envisager de pouvoir améliorer la fonction cardiaque des patients vieillissant ou présentant certaines pathologies cardiaques.

1.4. Les méthodes palliatives

Tel que démontré dans la section précédente, le corps humain fait face au quotidien à une vaste gamme de pathologies cardiaques possibles. Ces pathologies sont souvent d'une origine variée, multifactorielle et souvent complexe. Malgré tout, la recherche dans le domaine de la cardiologie a permis de découvrir et d'élaborer des plans d'action concrets qui permettent dans certains cas de palier ou de renverser certaines situations pathologiques, d'en ralentir la progression ou d'en contrôler les effets indésirables. Bien entendu, pratiquement tous les patients avec dommage myocardique sont traités avec des thérapies pharmacologiques comme des diurétiques, des bloqueurs α et β , de l'anticoagulothérapie et par des changements au niveau de la diète et de leur style de vie [76]. Cette section de ma thèse parlera plus en profondeur des avantages et inconvénients des autres approches actuelles et en développement.

1.4.1. Traitement des maladies cardiovasculaires

1.4.1. Les moyens de défense intrinsèque du corps humain!

Le corps humain possède une certaine capacité intrinsèque, bien que limitée, à se protéger et se réparer par lui-même. Les macrophages ont un rôle central dans le contrôle de la progression et de la guérison face à des pathologies, comme l'infarctus du myocarde. La migration des monocytes qui se transforment en macrophages provoque l'inflammation qui est un processus essentiel pour nettoyer les débris cellulaires et former la cicatrice. Toutefois, ce processus intrinsèque peut également provoquer dans plusieurs cas de lourdes conséquences.

En effet, le débalancement de ce processus inflammatoire crée des dommages et aggrave le remodelage post infarctus [77]. Une activation contrôlée des macrophages est donc souhaitable pour améliorer la guérison post infarctus.

Lorsque le cœur subit un dommage (ex. : mortalité cellulaire suite à une ischémie), le tissu cardiaque qui n'est plus fonctionnel est remplacé par des fibroblastes et du collagène (fibrose) pour assurer de maintenir l'intégrité du cœur. Ce processus de cicatrisation est essentiel à court terme pour réparer une blessure, toutefois, à plus long terme, il crée, lui aussi, plusieurs problèmes. Par exemple, à cause de la fibrose cardiaque certaines zones transmettent moins bien le signal électrique et induisent ainsi des conditions pro arythmiques. En effet, l'accumulation de collagène ou de fibroblastes entre les cardiomyocytes va les éloigner les uns des autres et va perturber les connexions cellule-cellule. L'équipe de Bakker a également démontré qu'une augmentation de la quantité de collagène était associée avec une diminution de l'expression des connexines et que ceci était lié également avec diminution du couplage cellule-cellule et conséquemment une diminution de la vitesse de propagation de l'influx électrique [78].

1.4.2. La transplantation d'organe

La transplantation d'organe consiste à remplacer un organe dysfonctionnel par un organe sain ou fonctionnel (greffon) via une anastomose des vaisseaux sanguins qui nourriront le greffon. Selon Transplant Québec (<http://www.transplantquebec.ca/>, consulté le 15 novembre 2015), au 31 décembre 2014, il y avait 993 personnes en attente d'un organe (non-disponible). Et selon le rapport du Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes (RCITO) de 2015, à travers le Canada en 2013, il y avait 4 433 patients en attente d'une transplantation d'organe. Toujours selon le rapport du RCITO, en 2013, 2 367 transplantations d'organes ont été réalisées, soit environ seulement 50 % du nombre requis. Ainsi, la plus grande limitation reste toujours aujourd'hui la disponibilité d'organes sains et compatibles pour transplantation. La transplantation cardiaque est le dernier recours pour les patients insuffisants cardiaques et la troisième transplantation la plus courante, après celle du rein et du foie.

La première transplantation cardiaque chez l'humain a eu lieu il y a plus de 40 ans par le Dr. Christian Barnard. Le taux de survie après une transplantation cardiaque a augmenté depuis les premières transplantations [79], toutefois, les transplantations cardiaques restent limitées par le manque de disponibilité d'organes compatibles (20 % des patients meurent en attente d'un cœur compatible [69]), les conséquences liées à l'immunosuppression essentielles pour diminuer les possibilités de rejet et les risques liés à la chirurgie. Toutefois, la transplantation cardiaque reste une option thérapeutique efficace lorsque le patient présente une insuffisance cardiaque chronique et que ce dernier ne répond plus aux traitements pharmacologiques [69]. Selon le rapport du RCITO de 2015, en 2013, il y avait 2 611 Canadiens vivant grâce à une transplantation de cœur sain et 167 Canadiens attendaient pour recevoir un nouveau cœur fonctionnel. Le taux de survie post transplantation reste élevé malgré les limitations d'une telle intervention (83,9 % de survie à plus de 5 ans après la transplantation). Un suivi serré reste cependant nécessaire afin d'améliorer la survie des patients transplantés [80]. De plus, il faut garder en tête que le besoin en organe augmentera au fil des années à cause du vieillissement de la population en général. Certains traitements alternatif sont en développement et devront être optimisées pour combler ce phénomène.

1.4.3. Le pacemaker électronique

L'implantation d'un pacemaker (PM) est de plus en plus utilisée pour contrer certains troubles de rythme et diminuer la mortalité et la morbidité associées [81]. La technologie a beaucoup évolué depuis l'implantation du premier PM en 1958 passant d'un module très simple à des systèmes comportant des électrodes multichambres pouvant générer des fréquences de stimulation variables s'adaptant, grâce à des algorithmes appropriés, aux besoins du patient [75]. Toutefois, comme le concept des pacemakers est resté relativement le même durant les derniers 50 ans [82], plusieurs limitations sont encore associées à leur utilisation. Par exemple, la durée de vie des batteries varie entre 3 et 15 ans et dépend du nombre de fonctions, de la fréquence et de l'intensité qui sera requise pour stimuler adéquatement le cœur. Il est important de noter qu'actuellement le remplacement des pacemakers est la cause principale des cas d'infection et qu'environ 1 individu sur 40 qui aura

un pacemaker aura des complications qui nécessiteront une intervention chirurgicale et ce, dans les 3 premiers mois de l'implantation [82]. De plus, la formation de tissu fibreux le long de l'électrode a également été observée et est liée avec des incidents de perforation ou des déchirements des parois cardiaques lorsque l'on essaie de retirer le pacemaker pour le remplacer [83]. Il s'avère important d'augmenter au maximum la durée de vie de ces appareils électroniques. En attendant l'arrivée de batteries ultraperformantes qui pourront durer pour la totalité de la vie d'un patient, plusieurs approches sont envisagées pour augmenter la durée de vie de ces dernières, parmi celles-ci, des électrodes qui peuvent relâcher certaines drogues, qui ont une meilleure conduction électrique et des appareils qui utilisent des algorithmes pour en augmenter l'efficacité [84].

Chez l'enfant, les électrodes sont généralement positionnées dans l'épicarde afin de ne pas obstruer la circulation vasculaire et pour éviter d'affecter l'intégrité de la valve auriculo-ventriculaire alors que chez l'adolescent, les électrodes sont plus souvent implantées dans l'endocarde car elles demandent une chirurgie moins complexe [85]. Chez l'enfant, le PM monochambre est privilégié; il est plus petit et a une durée de vie supérieure [85]. L'utilisation de PM est associée à un fardeau important pour le système de la santé lorsque les PM deviennent défectueux et doivent être remplacés. Les limitations liées aux PM électroniques pourraient être surpassées chez certains patients si un regain de la fonction automatique électrique était possible. L'avenue du génie tissulaire est potentiellement intéressante afin de rétablir les fonctions automatiques électriques du cœur.

1.4.4. La médecine régénérative

Le remplacement et la réparation d'organes via des techniques de génie tissulaire est de plus en plus en vogue dans les différentes approches utilisées pour compenser les limitations des approches actuelles, citées ci-dessus. En effet, l'augmentation de la diversité culturelle à travers le monde est fort probablement une des causes de l'augmentation de la résistance à certains traitements actuels. La recherche dans le domaine de la génétique prend de plus en plus d'ampleur chaque année, car il est évident que des traitements personnalisés, face aux patients qui sont devant nous, sont la clé pour optimiser les taux de réussite d'un plus grand

ensemble de la population. Les techniques de génie tissulaire cadrent bien dans la lignée d'une médecine plus « personnalisée » par le développement d'outils permettant d'adapter le traitement aux besoins du patient.

La mise en culture de cellules primaires cardiaques de rats néonataux s'avère une option avantageuse et plutôt simple, comparativement à l'utilisation des cellules souches. L'utilisation de trousse d'extraction permet un excellent rendement (voir figure 10) par rapport aux isolations de type maison (« DIY »). Les trousse permettent d'avoir accès à une grande quantité de cellules cardiaques par une méthode simple et reproductible et s'avérait une technique intéressante pour notre approche de développement. Ainsi, nous avons choisi d'opter pour la trousse d'extraction de la compagnie Worthington pour récolter les cardiomyocytes de rats néonataux utilisés dans les travaux rapportés dans cette thèse.

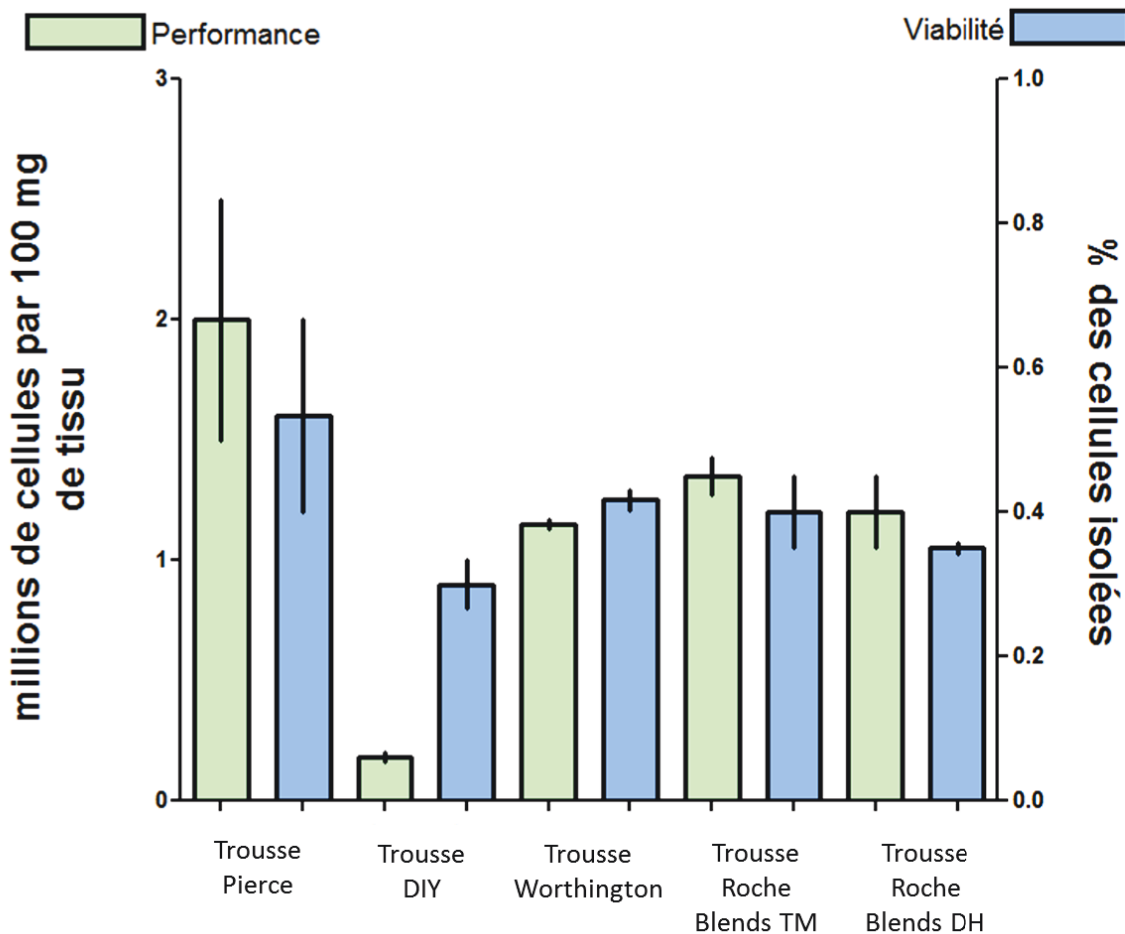


Figure 10 – Rendement de diverses méthodes d’isolation des cardiomyocytes

Modifiée de Wu et al. [86].

Parmi les différents types cellulaires utilisés jusqu’à maintenant afin de réparer ou générer le tissu, on note les cellules progénitrices circulantes dérivées de la moelle osseuse (BMPCs) et leur sous-population (cellules souches stromales de la moelle (MSCs), les cellules progénitrices endothéliales (EPCs)), les myoblastes squelettiques (SMs), les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASCs), les cellules souches dérivées du cordon ombilical (UPCs), les cellules souches embryonnaires (ESCs), les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) et les cellules souches ou progénitrices résidentes cardiaques (CSCs) [69]. Le tissu adipeux constitue une source considérable de cellules souches pluripotentes qui sont accessibles de manière peu intrusive et les cellules souches dérivées du tissu adipeux représentent une ressource prometteuse pour combler les besoins du génie tissulaire. Par exemple, des

chercheurs ont montré, dans des modèles d'animaux avec infarctus, que les MSCs injectés avaient le potentiel de se différencier en cardiomyocytes, de recruter d'autres cellules souches endogènes et de sécréter des facteurs paracrines [87]. Les impacts de l'injection de cellules souches ont été observés sur la fonction ventriculaire gauche, sur le remodelage (induit un renversement) et sur la diminution de la cicatrice (tableau I) [87] et de la rigidité du tissu cicatriciel [88].

Tableau I - Bénéfices de la thérapie par injection de MSCs chez les gros animaux

Espèce	Modèle	Injection	Suivi	Bénéfices / Effets
porc	IM chronique	Transendocarde	RMC	Diminution taille cicatrice Augmentation fraction d'éjection Augmentation de la contractilité locale Augmentation de la perfusion du myocarde
porc	IM aïgu	Transendocarde	RMC	Augmentation fraction d'éjection Diminution taille cicatrice
porc	IM aïgu	transendocarde	RMC	Augmentation de la fonction diastolique Augmentation fraction d'éjection Diminution taille cicatrice
porc	IM aïgu	Intracoronarienne	RMC	Augmentation fraction d'éjection Diminution taille cicatrice
porc	IM chronique	Chirurgie à cœur ouvert	RMC	Diminution taille cicatrice Augmentation fraction d'éjection Augmentation de la contractilité locale Augmentation de la perfusion du myocarde

Modifiée de Williams et collaborateurs [87].

RMC : résonnance magnétique cardiaque, IM : infarctus du myocarde

Les iPSCs humaines sont dérivées de la masse cellulaire avant l'implantation de l'embryon et sont dérivées d'une reprogrammation des cellules somatiques grâce à divers facteurs. Elles ont la particularité de pouvoir se renouveler en culture pour de longues périodes (mois, voire même années) et de pouvoir générer tous les types cellulaires. Quant à la lignée cardiovasculaire, la production de cardiomyocytes, de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses est maintenant possible [89]. Les premières procédures de différenciation

des iPSCs utilisaient une inhibition de Wnt et produisaient environ 10-50 % de cardiomyocytes seulement. Toutefois, les avancées faites quant à la production de cellules différenciées provenant de iPSCs ont permis de créer des modèles robustes pour des applications à haut débit [89]. Les cardiomyocytes dérivés des iPSCs produits commercialement à ce jour représentent des fractions purifiées (environ 90 % de cardiomyocytes) et sont vendus, à ce jour, à un prix élevé [89]. Ces avancées permettent malgré tout aux compagnies pharmaceutiques ainsi qu'aux chercheurs de pouvoir tester certains composés (et ceci, sans biais causé parfois par des pathologies multifactorielles et complexes) et surtout, de le faire à un stade précoce dans le développement sauvant ainsi temps et argent aux personnes concernées [89]. Au niveau des caractéristiques électrophysiologiques, les cardiomyocytes dérivés de iPSCs semblent posséder la majorité des canaux ioniques cardiaques bien qu'ils sont toutefois immatures [90]. Parmi les différences importantes entre les cardiomyocytes adultes et les cardiomyocytes dérivés des iPSCs, il y a l'absence de I_{K1} qui est important pour maintenir le potentiel de repos et l'absence de I_f qui contribue à l'automaticité via la dépolarisation lente entre les contractions [91]. De plus, bien que les CM dérivés des iPSCs présentent certaines similitudes dans leur manière de transporter le calcium, elles présentent plusieurs différences importantes, comme l'absence de tubules-T (invagination du sarcolème). Le tableau II présente l'ensemble des similitudes et des différences observées et la figure 11 présente un schéma de ces répercussions. Amano et collaborateurs ont également démontré le potentiel des iPSCs pour produire un tissu 3D de cardiomyocytes intégrant un réseau présentant des similitudes avec les capillaires sanguins et ils ont montré des réponses toxicologiques différentes entre ce tissu 3D vascularisé comparativement et la monocouche 2D de iPSCs dérivés en CM [92]. Les iPSCs présentent donc un potentiel intéressant pour la médecine régénérative, pour tester la toxicité ainsi qu'évaluer l'efficacité de nouveaux agents pharmacologiques en développement [93].

Tableau II - Caractéristiques des cardiomyocytes dérivés des iPSCs comparativement aux cardiomyocytes adultes

Similitudes avec les CM adultes	Différences avec les CM adultes
Caractéristiques morphologiques	Ressemble plutôt aux CM immatures
Canaux ioniques majeurs présents	Expression des canaux ioniques majeurs ressemblent plutôt au stade néonatal
Machinerie contractile	Potentiel membranaire diastolique est entre -70 et -60 mV
Réticulum sarcoplasmique fonctionnel	Contractions spontanées
Transport du calcium	Force de contraction faible
Récepteurs à la ryanodine	Absence de tubules T / Mécanisme Ca^{2+} induit- Ca^{2+} largué immature
Mécanisme Ca^{2+} induit- Ca^{2+} largué	Courant I_f et I_{k1}
Potentiels d'action similaire aux cellules auriculaires et ventriculaires	Taille cellulaire variable

Modifié de Del Alamo et collaborateurs [89].

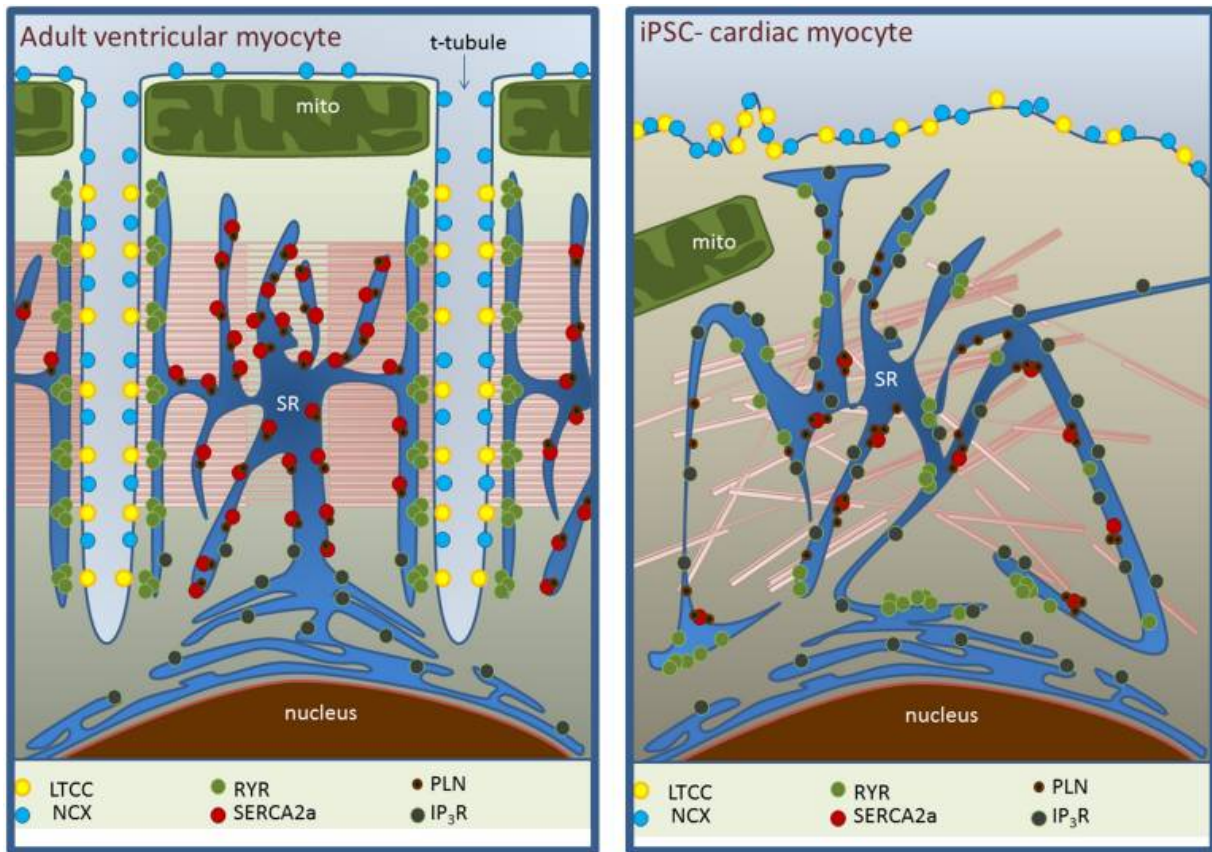


Figure 11 – Schéma présentant les différences entre un cardiomyocyte adulte et un cardiomyocyte dérivé de cellule iPSCs

Bien que la majorité des éléments soit présents, il existe d'importantes différences dans l'organisation et fonctionnalité (maturité) des CM-dérivés des iPSCs (à droite) en comparaison avec les cardiomyocytes adultes ventriculaires (à gauche).

Tiré de Kane et collaborateurs [94].

Optimisation des cellules souches en culture cellulaire

Les cellules adhérentes produites en culture cellulaire sont également difficile à séparer du support de culture sans les endommager dans le but d'un éventuel transfert vers l'hôte. Toutefois, certaines techniques peuvent être utilisées pour contourner ce problème. En effet, une étude de Matsuura et collaborateurs a montré qu'il était possible d'utiliser le Poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm), un polymère qui réagit à la température, comme support de

culture et que les cellules adhèrent à ce dernier à 37 °C, car il est hydrophobe. Ensuite, par une simple variation de la température (amener en-dessous de 32 °C), cela rendait le support hydrophile et ce changement dans la température permet de détacher les cellules du support de PIPAAm à cause du gonflement et de l'hydratation rapide des cellules [95]. Cette approche permet ainsi de récolter le feuillet tissulaire créé tout en préservant les liaisons cellule-cellule.

Les cellules souches peuvent être différenciées en sous-types de cardiomyocytes et être sélectionnées ensuite en fonction de leurs propriétés morphologiques, moléculaires et fonctionnelles pour purifier une culture en un sous-type précis. Ainsi, il est maintenant possible de purifier une sous-population de cellules souches différenciées en cellules « pacemakers-like » grâce à une technique de sélection par biologie moléculaire démontrée par Hashem et collaborateurs en 2013. En résumé, ils réalisent une transfection avec le promoteur Shox2-neo (résistance à la néomycine) dans des cellules CJ-7 ES pour purifier la population de cellules qui contiennent le vecteur Shox2-neo, soit les cellules sino-auriculaires de type « *pacemaker-nodal-like* » par sélection avec l'antibiotique. Ensuite, ils font la culture des cellules CJ-7 ES durant 7 jours après la transfection, amorcent un processus de différenciation en corps embryonnaires et ils font appliquer deux étapes de sélection à la néomycine « G418 » à une concentration de 200 µg/mL. Les cellules qui ont survécu aux étapes de sélection sont ensuite mises en culture pour en amplifier le nombre; un passage est réalisé tous les 4 jours. Ils utilisent le même principe en utilisant le promoteur Cx30.2 pour isoler les cellules auriculo-ventriculaire de type « *pacemaker-nodal-like* » des autres sous-populations cellulaires [70].

Méthodes pour induire la différenciation en cardiomyocytes

Conjointement avec les stimuli retrouvés *in vivo*, tel que la stimulation électrique et mécanique, il est également possible d'utiliser certains agents ou composés chimiques ou pharmacologiques afin d'induire une différenciation des cellules souches en phénotype cardiaque. Ceci est tout à fait pertinent dans un contexte de thérapie cellulaire, mais également dans un contexte de test de composés pharmacologiques par l'utilisation de modèle cellulaire

physiologique et pathologique. La possibilité d'obtenir des modèles cellulaires représentatifs des conditions *in vivo* est intéressante pour les entreprises pharmaceutiques ou œuvrant dans le domaine des biotechnologies. Ces modèles cellulaires permettent d'échantillonner plusieurs molécules à la fois et permettent d'effectuer des tests d'efficacité ou de toxicité qui sont rapides, peu coûteux et efficace. Cela permet au final une économie importante pour l'entreprise qui évite les études cliniques non fructueuses.

Plusieurs avenues sont présentement investiguées, voici un bref survol de quelques-unes de ces possibilités qui verront peut-être le jour dans un avenir proche.

❖ *1-ethyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO)*

Ce composé induit l'ouverture des canaux SK4 (courant IK_{Ca}) et provoque la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris en cardiomyocytes avec une forte quantité de cellules avec des propriétés d'automaticité (enrichissement en cellules de type pacemakers). En bref, 1-EBIO agit en changeant l'expression d'environ 2400 gènes (tropomyosine, Nkx2.5, Mesp1,...). Les propriétés automatiques sont favorisées par l'induction de gènes spécifiques au nœud sino-auriculaire (HCN4, Tbx3, Shox2, Cx45, Cx30.2) parallèlement avec une perte de gènes spécifiquement impliqués dans la différenciation en cellules cardiaques ventriculaires [96, 97]. Les canaux SK sont retrouvés majoritairement dans l'oreillette, le nœud sino-auriculaire et les veines pulmonaires et jouent un rôle important sur la régulation de la durée des potentiels d'action [98]. Il est à noter que l'activation de SK4 via 1-EBIO diminue la prolifération cellulaire (réduction du nombre de cellules dans la phase S et une augmentation de celles dans la phase G1 et G2/M) [98].

❖ *Facteur T-box 3*

T-Box 3 (Tbox3) est connu pour avoir un rôle dans tous les stades du développement cardiaque : spécialisation initiale du mésoderme, segmentation du tube cardiaque primitif en structure du myocarde (formation des cavités et des autres composantes), formation des valves et du septum qui sépare les cavités et finalement, dans la formation du système de conduction. [12]. Par leur grand rôle dans plusieurs étapes de la formation du myocarde, il est assez facile

de croire que les gènes T-box pourraient avoir un impact important sur la prolifération ou la différenciation des cellules souches en cellules cardiaques. Particulièrement, Tbox3 serait même un pilier dans la régulation de la pluripotentialité (maintien des cellules souches dans un état pluripotent) [99].

❖ *Angiotensine II*

L'angiotensine II (Ang-II) est le principal agent impliqué dans le mécanisme d'action du système rénine-angiotensine. Plusieurs études ont montré l'implication de Ang-II dans la différenciation des cellules souches. Plus spécifiquement, une étude de Xue *et al.* a confirmé la présence du courant I_f et par le fait même de l'expression des canaux HCN dans des cellules souches (positive pour le marqueur de surface cellulaire C-kit) suite à un traitement avec Ang-II [100]. Ang-II constitue donc un agent intéressant à garder en tête dans un contexte de génie tissulaire orientée vers une approche de « biopacemakers » pour biotransformer une source de cellules souches en cellules cardiaques de type pacemakers.

❖ *Icariin*

C'est le principal agent actif de l'extrait de Epimedium, une herbe médicinale chinoise qui fait partie de la famille des flavanoïdes [101]. Icariin est un nouvel agent de différenciation qui a démontré sa capacité à améliorer la différenciation des cellules souches embryonnaires et les cellules souches dérivées du tissu adipeux [102]. Son mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, toutefois, une étude de Zhou *et al.* en 2014, a montré que la « phosphatidylinositol 3-kinase enhancer » (PIKE) était impliquée dans le processus puisque son inhibition par un Si-RNA empêchait la différenciation [103]. De plus, l'expression augmentée de gènes spécifiques cardiaques pourrait être partiellement expliquée par la cascade de signalisation ERK-MAPK [101].

❖ *Combinaison de 3 facteurs de transcription du développement*

La combinaison de Gata4, Mef2c et Tbx5 a montré une reprogrammation rapide et efficace de fibroblastes de la peau chez la souris directement en cellules de type « cardiomyocyte-like ».

❖ *Culture en suspension (corps embryonnaires)*

L'injection de cellules souches comme les myoblastes squelettiques ou les cellules progénitrices endothéliales ont été proposées par certaines équipes comme étant une approche prometteuse pour la régénération cardiaque [104]. Ces lignées cellulaires uniques peuvent être amplifiées en culture dans un état non différencié et peuvent éventuellement être différenciées dans le type cellulaire désiré [105]. Un tel processus a été démontré par plusieurs équipes de chercheurs, par exemple, des cellules embryonnaires humaines ont été mises en culture via une méthode de culture en 3D (corps embryonnaires, figure 12) et les cellules isolées des endroits qui montraient de l'activité spontanée se sont révélées présenter des caractéristiques structurelles, moléculaires et fonctionnelles de cardiomyocytes. Ce procédé permet ainsi de générer en culture un syncytium de cardiomyocytes fonctionnels possédant de l'activité spontanée [106] et une propagation des potentiels d'action [105].

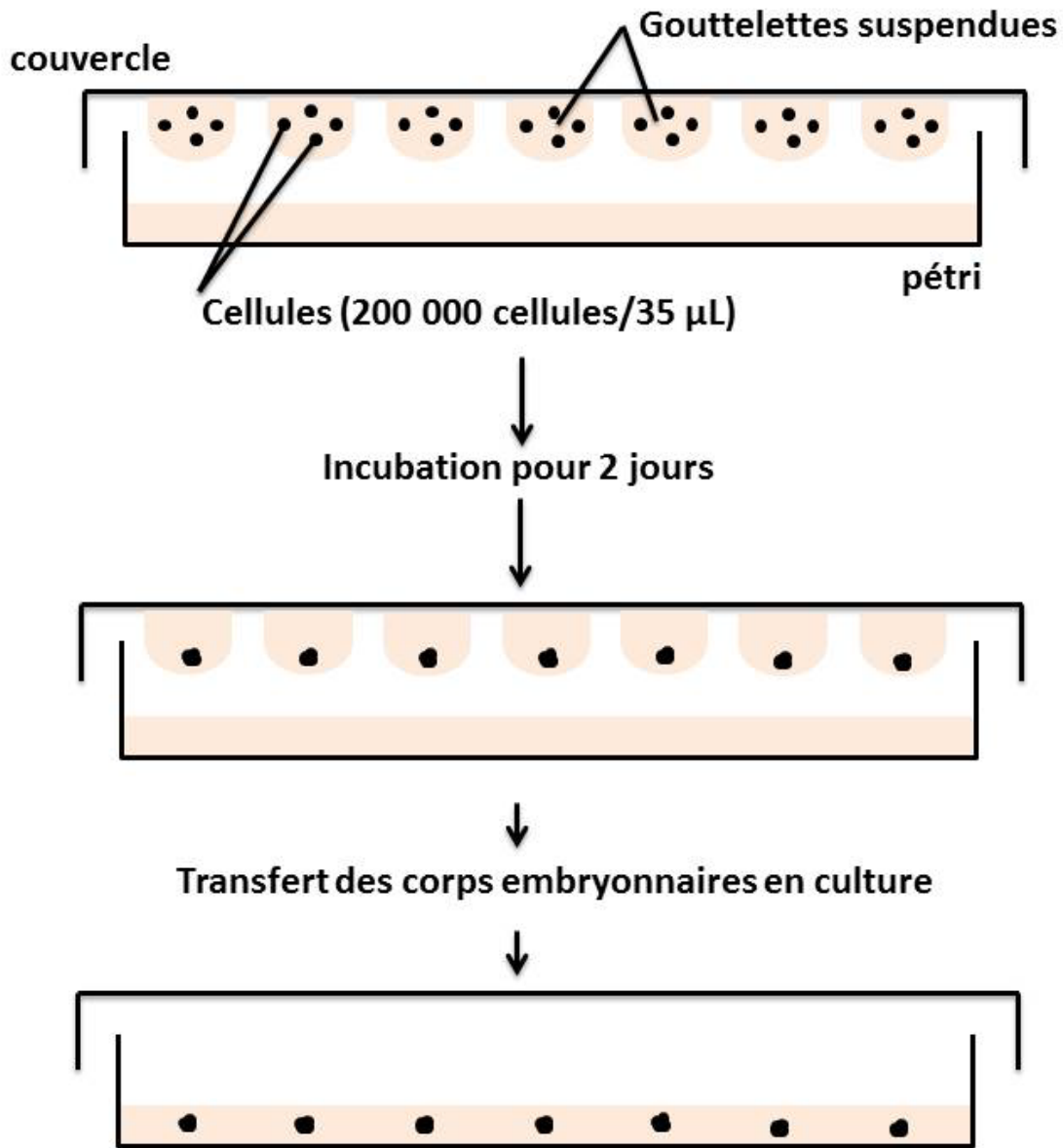


Figure 12 - Méthode de culture en sphéroïdes ou corps embryonnaires

Tel que décrit précédemment, l'injection de cellules souches dans l'organisme, soit via une injection tissulaire (localisée) ou circulatoire (systémique), a montré des effets positifs. Toutefois, bien qu'étant une technique prometteuse, l'injection de cellules souches reste une méthode plutôt limitée puisque les résultats obtenus jusqu'à présent semblent indiquer un

succès thérapeutique plutôt modeste qui serait lié à une mauvaise optimisation des cellules souches injectées [107]. En effet, la cause la plus importante de perte d'efficacité thérapeutique ou de l'obtention de résultats non satisfaisants lors d'une approche par injection de cellules souches est la mortalité des cellules [104]. Les cellules sont injectées dans un environnement déjà hostile et non favorable à la croissance et prolifération. Ainsi, la conséquence est souvent que ces cellules meurent également à leur tour après une courte période. L'adhésion des cellules souches injectées est un autre des facteurs limitant les taux de succès de cette approche. Funakoshi et collaborateurs ont montré qu'une mauvaise optimisation/différenciation des cellules souches injectées avait un impact significatif sur les taux de cellules injectées qui restaient dans la zone d'intérêt [107]. Dans cet ordre d'idée, plusieurs études ont montré que les bénéfices obtenus à court terme à partir de ces cellules sont perdus très rapidement après l'injection [95], que l'amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche est de seulement 0.9-6.1 % et que dans près de la moitié des études, ces bénéfices disparaissaient à plus long terme [108]. Cela démontre que la régénération cellulaire est un processus complexe d'où l'importance de développer d'autres approches.

Afin de dépasser les limites d'utilisation des cellules souches par technique d'injection localisée ou systémique, une approche prometteuse est présentement en développement par plusieurs équipes à travers le monde qui consiste à produire des feuillets cellulaires en culture pour créer du tissu de remplacement. La culture cellulaire de tissu analogue est de plus en plus populaire en médecine régénérative (pour le conditionnement de cellules souches dérivées en cardiomyocytes [109, 110], la construction de tissu [111-115]) et pour l'évaluation de la cardiotoxicité [116, 117]). Il existe également une grande demande pour des pièces de remplacement tel que des artères coronaires et des valves. Ces structures issues du génie tissulaire constituent des substituts intéressants aux greffes autologues [118]. Récemment, des équipes ont créé du tissu cardiaque à partir de diverses sources (ex. : cardiomyocytes isolés, cellules mésenchymateuses, cellules souches pluripotentes...) et l'ont greffé à un hôte; dans plusieurs cas, une intégration fonctionnelle a même été démontrée [119-122]. L'utilisation de la culture cellulaire est donc une option avantageuse et envisageable pour réparer ou remplacer un tissu dysfonctionnel. Un autre avantage du génie tissulaire est la possibilité de jumeler différents types cellulaires pour créer un tissu de remplacement optimisé et personnalisé en

fonction des besoins du receveur. Par exemple, il a été montré que des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux en co-culture avec des fibroblastes préalablement transfectés avec Kv1.3 (canal potassique sensible au voltage) avaient une fréquence de contraction autonome réduite de 68% et que le couplage de cardiomyocytes avec des cellules rénales embryonnaires (HEK293) qui surexpriment la Cx43 ralentit la conduction électrique par 5 fois [123]. L'idée ici était de voir l'impact de cellules non excitables (HEK293) sur l'activité propagatrice électrique. Ainsi, les cellules HEK293 agissent en diluant le stimulus électrique. On peut donc s'attendre à ce qu'une augmentation de cellules non excitables ait le même effet *in vivo*. Une étude a d'ailleurs montré des résultats similaires d'une interaction entre les cardiomyocytes et les fibroblastes (cellules non excitables) exprimant la Cx43 et de plus, elle a montré une diminution du potentiel de repos de -78 à -50 mV [124]. Une étude réalisée par Ko et ses collaborateurs [125] a montré que l'ensemencement de cellules souches embryonnaires humaines dérivées en CM sur un support poreux biodégradable permet de créer une construction tissulaire qui peut être greffée *in vivo* sur un cœur de rat. L'épaisseur de la construction reste une limitation due aux conditions de diffusion limitant la survie des cellules à une distance de quelques centaines de micromètres du capillaire le plus près [125]. Récemment, l'utilisation de tri-culture (cellules souches embryonnaires dérivées en CM + cellules endothéliales + fibroblastes embryonnaires) a permis de former un tissu vascularisé [122]. L'équipe de Lesman [122] a injecté des billes fluorescentes à l'intérieur des ventricules de rats, ils ont alors pu démontrer l'intégration fonctionnelle du greffon et de l'hôte en montrant l'accumulation de ces billes fluorescentes dans le myocarde de l'hôte, ainsi que dans le greffon [122]. La création de tissu vascularisé à partir de techniques de génie tissulaire permettra de surpasser les limites d'épaisseur maximale de la construction tissulaire actuelle et ceci permettra ainsi de pousser encore plus loin les répercussions positives de la création de tissu de remplacement. Toutefois, les propriétés électriques (couplage avec les autres CM ou activité autonome) de même que les propriétés mécaniques (force de contraction) du greffon restent encore à être étudiées. De plus, le faible nombre de CM humains disponibles (à cause de la complexité de les amplifier en culture) associé à une perte significative de CM viables après une transplantation limitent actuellement les bienfaits à long terme de cette approche [122].

Il ne faudrait pas passer sous silence également l'immense controverse que suscite l'utilisation des cellules souches pour une utilisation clinique. En effet, la compagnie Geron (USA), est l'entreprise pionnière quant à l'utilisation des hESC en médecine régénérative. Après avoir été approuvée par la FDA en 2009 pour réaliser la première étude mondiale par thérapie de cellules souches, cette dernière a été rapidement mise sur la glace suite à différents cas de tumeur au cerveau (reliés ou non avec l'étude clinique de Geron). Cela a pris non moins d'un an pour faire le point sur le dossier et permettre à Geron de continuer son étude qui a pris ensuite fin quelques mois après par manque de fonds de la compagnie [126]. Les études cliniques utilisant les cellules souches voient de plus en plus le jour, le premier critère doit rester la sécurité pour le patient et seulement, ensuite, évaluer l'efficacité de la thérapie pour corriger la pathologie [126]. L'utilisation des ESCs en recherche constituent un enjeu éthique important dont certains voudraient bannir l'utilisation et d'autres voient l'énorme potentiel qu'elles ont à offrir [127]. Comparativement, les iPSCs ont l'avantage de ne pas être confrontées à ces limitations d'ordre éthique [127].

1.5. L'importance de l'environnement et son impact sur la différenciation des cellules cardiaques

Différentes techniques sont utilisées pour induire un remodelage protéique, soit : contrôler l'environnement de culture, utiliser la biologie moléculaire ou utiliser la thérapie génique. Le contrôle de l'environnement est important afin d'amener les cellules à avoir, idéalement, des caractéristiques structurelles et fonctionnelles semblables au tissu d'origine. Le cœur, *in vivo*, est assujéti à deux types de stimulation principalement : électrique et mécanique. Ainsi, les conditions de culture doivent être similaires à l'environnement *in vivo* puisque les cellules pluripotentes induites en CM seront affectées par la présence ou l'absence de ces stimuli. Globalement, l'environnement exerce une énorme influence sur la morphologie et la physiologie cellulaire. Plusieurs cas dans la littérature ont montré que la simple variation de certains facteurs dans l'environnement entourant les cellules pouvait modifier leur apparence ainsi que leur fonction. Par exemple, les cellules souches vont se différencier en un produit final selon l'influence du milieu environnemental [69].

1.5.1. Effets des propriétés biomécaniques (rigidité) du support de culture

Parmi les propriétés qui peuvent influencer l'environnement biomécanique et par conséquent avoir un impact sur la physiologie des cellules, il y a tout d'abord, la rigidité du support de culture sur lequel les cellules sont cultivées. Les tissus cardiaques *in vivo* ont une rigidité connue (4-11 kPa : rats néonataux, 12-70 kPa : rats adultes et 20-500 kPa : cœur humain) [128], ainsi, les cardiomyocytes vont ressentir un étirement en fonction de la résistance qu'ils auront au phénomène de contraction/relaxation (systole/diastole) [129]. Les cardiomyocytes ont une capacité à s'adapter aux changements, par exemple, de la rigidité de la matrice cellulaire en situation pathologique comme la fibrose, l'infarctus du myocarde, l'hypertrophie cardiaque et le vieillissement qui peuvent conduire jusqu'à l'inhibition complète de la contraction [130]. Il a été montré que les cardiomyocytes en culture conservaient leurs propriétés contractiles plus longtemps s'ils étaient mis en culture sur un substrat d'une rigidité qui ressemble à celle retrouvée *in vivo* [130]. Un substrat mal adapté (trop mou ou trop rigide) mène à une dégradation et désorganisation structurelle des cardiomyocytes en empêchant la cellule d'atteindre sa pleine maturité via l'implication de la cascade « *Rho-associated protein kinase* » menant à la formation des « fibres de stress ». La formation de ces « fibres de stress » lorsque les cellules sont mises en culture sur un substrat trop rigide ou trop mou interfère avec le développement et la maturation des cardiomyocytes de rats néonataux [128].

Des protéines impliquées dans la détection de l'étirement ont été identifiées dans le sarcomère (α -actinine) et le complexe costamère (intégrine $\beta 1$, titine, jonctions adhérentes) [128]. Le costamère fait le lien entre les disques Z et la membrane cellulaire afin de transmettre la force générée à l'ensemble de la matrice extracellulaire. L'intégrine $\beta 1$ est particulièrement importante pour la régulation des interactions cellules-matrice (protection cytosolique). Les intégrines s'accrochent aux disques Z via des protéines structurelles comme la desmine, la vinculine, la taline, ou la zyxine [130]. La rigidité du substrat affecte également le stress généré à l'intérieur du cardiomyocyte et ceci est un processus adaptatif et dépendant du temps qui affecte la contractilité [130]. Par exemple, les cardiomyocytes de rats néonataux en culture auraient une force de contraction maximale sur un support de 10 kPa [128] et comme la force de contraction est directement liée à l'amplitude de la transitoire calcique, on peut alors

conclure que la dynamique calcique est affectée également par la rigidité du substrat. Les expériences effectuées ne révèlent pas seulement que le stress va inhiber la dégradation des protéines structurales par certaines enzymes, mais révèlent également que l'expression des ARNm varie avec l'expression protéique puisque plusieurs facteurs importants de transcription sont également régulés par ces protéines structurales [131].

Lorsque des cellules cardiaques mises en culture sur un support très rigide comme le verre (matériel standard pour la culture) se contractent, ce sont les protéines d'ancrage qui se déforment. Ceci génère certaines cascades de signalisation, par exemple, en libérant certains sites de phosphorylation [132]. En opposition, un support de culture mou (module de Young petit; ex. PDMS) aura tendance à lui-même se déformer (plutôt que de déformer les protéines d'ancrage) suite à une contraction de la cellule. Ainsi, l'effet biologique serait influencé par le support sur lequel la cellule est mise en culture (figure 13).

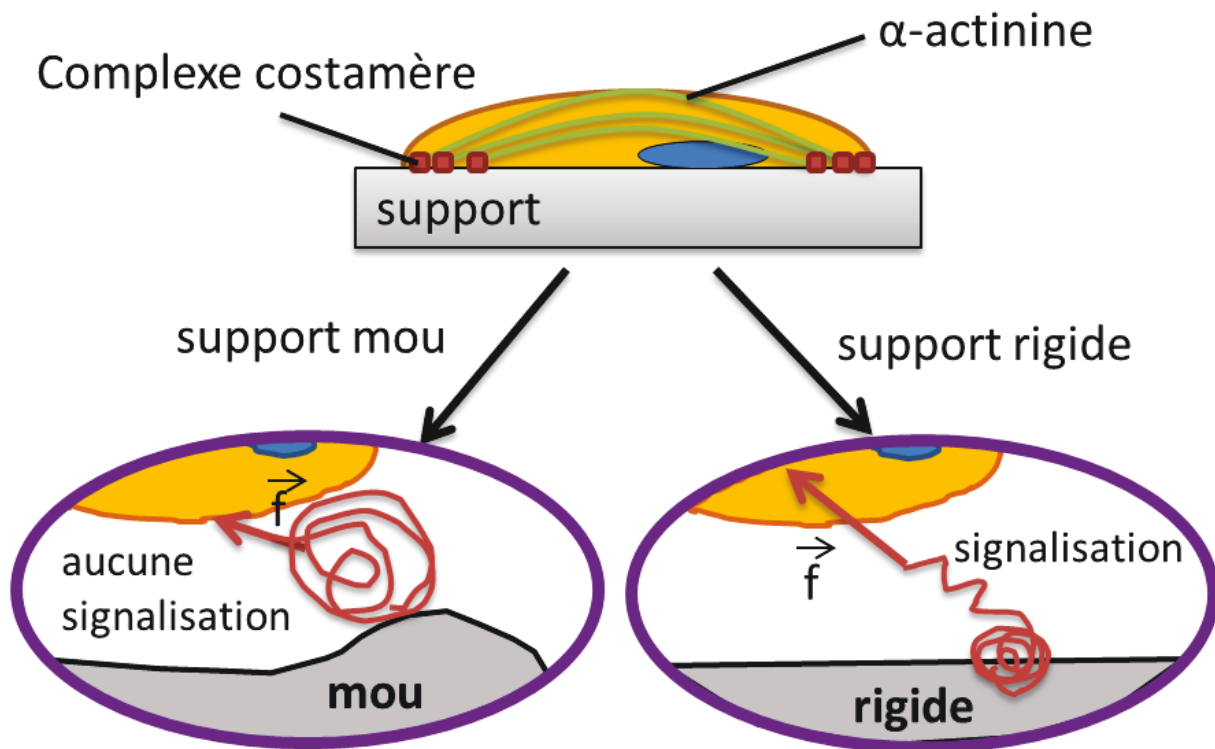


Figure 13 - Effet de l'environnement biomécanique sur les fonctions physiologiques

Le cytosquelette (α -actinine) de la cellule est représenté en vert, les protéines d'ancrage sont représentées en rouge (complexe costamère : intégrines + protéines structurales). Lorsqu'une contraction cellulaire se produit, une force (f) est appliquée.

Il a été montré que l'organisation des sarcomères habituellement structurée chez les cardiomyocytes de rats adultes isolés était perturbée par l'utilisation de substrats d'une rigidité intermédiaire, soit entre 7 kPa et 255 kPa [129]. Galie et collaborateurs [129] ont également montré que l'inhibition de l'activité phosphatase pouvait bloquer la dégradation du système contractile sur un support d'une rigidité intermédiaire sans toutefois complètement élucider le mécanisme impliqué. Qui et collaborateurs ont montré que les propriétés biomécaniques de la matrice extracellulaire vont affecter le cycle cellulaire et la prolifération des cellules souches résidentes progénitrices (recrutement), diminuer le potentiel de ces cellules progénitrices à se différencier en lignée cardiaque et accélérer le vieillissement cellulaire [133]. Ainsi, les propriétés biomécaniques constituent une cible intéressante à investiguer d'un point de vue thérapeutique dans le traitement de la fibrose cardiaque, par exemple.

Les fibroblastes sont importants pour maintenir la structure et la fonction cardiaque, en effet, le tissu cardiaque doit être suffisamment résistant à la charge de pression, mais assez souple pour permettre l'action de pompage. Il existe une communication croisée entre les cardiomyocytes et les fibroblastes pour maintenir l'homéostasie et assurer un remodelage du cœur en réponse à une augmentation physiologique de la charge (ex. : durant l'exercice) [134].

La structure et les fonctions des iPSCs sont également affectées par les caractéristiques du substrat sur lequel elles sont mises en culture. En effet, Heras-Bautista et collaborateurs [135] ont montré des signes de stress mécanique (augmentation de l'expression de l'actine des muscles lisses α) après 5 semaines en culture sur une surface rigide de verre, comparative à une surface en polyacrylamide (55 kPa). La culture sur surface rigide mène à une perte de la fonction contractile. Macri-Pellizzeri et collaborateurs ont montré une différenciation favorisée des iPSC en lignées cardiaques sur une matrice de polyacrylamide (0.6 kPa) avec un revêtement de fibronectine [136].

Ainsi, les caractéristiques de l'environnement biomécanique dans lequel les cellules sont placées doivent être identifiées et doivent reproduire le plus près possible les conditions retrouvées *in vivo*. C'est d'ailleurs ce sujet qui constituera la nature du premier article inclus

dans cette thèse. De ce fait, deux types de stimulations, retrouvés *in vivo*, sont importants pour assister le développement de la construction tissulaire : la stimulation électrique (courant) et la stimulation mécanique (étirement) [24].

1.5.2. Effets de la stimulation électrique

Afin de reproduire l'environnement électrique *in vitro*, un conducteur électrique (des électrodes) est nécessaire pour établir un lien avec les parties non métalliques d'un circuit. Pour ce faire, différents types de matériaux sont utilisés pour fabriquer les électrodes : argent-chlorure d'argent [137, 138], titane [139, 140], titane-nitride [140], acier inoxydable [138], hydrogel [138], platine [141-143], platine-iridium [144]. Les électrodes en carbone [140, 145-147] semblent être un choix plus populaire offrant une meilleure efficacité [140, 145, 148] que les autres métaux [138] et produisent un meilleur transfert de charges donc, elles constituent d'excellent matériaux pour un bioréacteur [140]. Il existe deux méthodes de stimulation électrique : locale et globale. La stimulation locale se fait par injection de courant en un point précis du milieu extra- ou intracellulaire à l'aide d'une électrode générant l'activation de cellule locale et la propagation à toutes les cellules interconnectées. D'un autre côté, la stimulation globale dépolarise l'ensemble des cellules par l'application d'un champ électrique issu de la différence de potentiel entre deux électrodes parallèles; cette forme de stimulation est à favoriser, car elle facilite l'enlignement ordonné des cellules qui, par séparation de charges du cytosol, se comportent comme des dipôles s'alignant dans la direction du champ [149]. De plus, la stimulation globale ne nécessite pas que toutes les cellules soient interconnectées afin de propager l'activation à l'ensemble des cellules se trouvant à l'intérieur du champ créé [140].

Lorsque des CM de rats néonataux sont cultivés *in vitro*, la stimulation électrique affecte la géométrie, l'alignement des sarcomères et la distribution spatiale des connexines Cx-43 (jonctions cellule-cellule) et des mitochondries [24, 150]. La stimulation électrique favorise la prolifération cellulaire et la formation des jonctions communicantes électriques [24]. Sans stimulation électrique, les cardiomyocytes adoptent une forme arrondie et un remodelage de l'actine et de la troponine-I provoquant ainsi une perte progressive des propriétés contractiles

[151]. D'un point de vue fonctionnel, les CM soumis à la stimulation électrique ont une plus grande amplitude de contraction synchronisée, une plus grande fréquence maximale d'entraînement [150] et sont moins hypertrophiés [152]. La stimulation électrique permet la génération de contractions régulières qui optimise la gestion interne du Ca^{2+} [153], la densité et la fonction des canaux calciques de type L (CCL) qui est un élément clé de l'horloge membranaire. Parallèlement, un rythme irrégulier ou trop rapide provoque une diminution de ICaL [154] et de l'activité de la pompe SERCA [155] et pourrait influencer la fréquence d'activation. Ainsi, la fréquence d'activation d'un BPM dépend de l'expression de canaux ioniques et peut être modifiée par la stimulation électrique [154].

1.5.3. Les systèmes de stimulation électrique

Parmi les différents systèmes commercialement disponibles, le C-PACE EP de Ion Optix permet la stimulation des cellules grâce à un courant pouvant atteindre une amplitude allant jusqu'à 240 mA, un voltage jusqu'à 40 V, une durée du pulse électrique entre 0,4 et 24 ms et une plage de fréquences de 0,010 jusqu'à 99 Hz. Les plages variées permettent de personnaliser les protocoles de stimulation selon les besoins expérimentaux et constituent un avantage important dans l'élaboration d'un système qui pourra ainsi être utilisé à diverse fins (plusieurs types cellulaires, mimer différentes pathologies...). Le système développé par Ion Optix utilise, tout comme notre bioréacteur, une stimulation biphasique, c'est-à-dire que le premier pulse créé est envoyé dans une direction du champ et le pulse suivant est envoyé dans la direction opposée de ce même champ. Ceci permet de diminuer l'effet d'électrolyse (accumulation de charges sur une surface des électrodes). Il est également possible d'utiliser des protocoles spéciaux de stimulation permettant de simuler des arythmies via l'intégration de variations aléatoires ou de décalages à certains moments fixes.

1.5.4. Effets de la stimulation mécanique

L'environnement biomécanique joue un rôle important dans la fonction des cellules cardiaques et ceci a un grand impact sur le développement physiopathologique cardiaque [156]. Pourquoi est-il intéressant d'étudier l'environnement mécanique des cardiomyocytes?

En fait, ces derniers possèdent des canaux ioniques à la surface de leur membrane. Ces canaux ont comme fonction primaire de laisser passer un flux d'ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , ...) de part et d'autre de la membrane qui peuvent établir des gradients de voltage importants. Il existe différentes classes de canaux ioniques, il y a entre autre les canaux ioniques couplés au voltage qui sont activés par des différences de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane, les canaux ioniques activés par la présence d'un ligand dans leur site actif (la liaison du ligand permet l'ouverture ou la fermeture du canal) et finalement, une classe qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette thèse, les canaux sensibles à l'étirement. Une augmentation de volume au niveau du cœur influence la régularité et la fréquence des contractions cardiaques [66]. Au niveau cellulaire, c'est-à-dire au niveau du CM, l'activité électrique est directement reliée à l'activité mécanique par le couplage excitation-contraction. Sachs a montré en 2011 la présence d'une rétroaction mécano-électrique [157] due aux canaux sensibles à l'étirement (CSE). Les CSE sont des canaux ioniques dont l'activation ou l'ouverture est régulée par l'environnement mécanique (étirement, pression, stress mécanique). Ces canaux jouent un rôle très important dans l'adaptation électrophysiologique des cardiomyocytes face à un stress mécanique [158, 159] en transformant ce signal mécanique en signal électrique ou biochimique [160]. Les cellules cardiaques sont assujetties à subir des changements dynamiques au niveau de l'étirement et du stress mécanique au cours de la contraction musculaire et du remplissage-expulsion du sang [161]. Il a été démontré aussi bien dans des cardiomyocytes isolés de souris, d'humain, de rat et de cochon d'Inde que dans des cellules provenant de ventricule de rat et de grenouille ou que dans des coeurs isolés de lapin, de chien et de cochon d'Inde qu'un étirement mécanique peut induire une dépolarisation du potentiel de repos membranaire [162]. La majorité du temps, la dépolarisation est proportionnelle au pourcentage d'étirement appliqué [162]. Toutefois, une exception a été observée pour les cellules ventriculaires du cochon d'Inde qui en réponse à un étirement important induisent une hyperpolarisation probablement due à l'augmentation de la conductance du potassium suite à l'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [163]. En résumé, les CSE sont répandus dans plusieurs types cellulaires et ils ont pour fonction de répondre aux perturbations mécaniques comme la régulation du volume, l'augmentation du calcium, l'activité électrique cardiaque... Les effets des CSE peuvent être bloqués par des composés comme le gadolinium

(Gd³⁺) (peu spécifique) ou plus spécifiquement par une toxine provenant de la tarentule *Chilean Rose* (GsMTx4) [164].

Il existe premièrement des étirements qu'on dit statiques (aigus ou chroniques), selon Riemer et Tung en 2013, un haut niveau d'étirement pourrait induire des extrasystoles et de l'activité spontanée dans certaines cellules isolées ventriculaires de grenouille [165]. Stacy et collaborateurs ont également montré qu'un étirement augmentait l'incidence de cas arythmiques [166]. Les chercheurs semblent s'entendre sur le fait que la durée du PA est diminuée au début de la repolarisation, mais augmentée vers la fin de repolarisation suite à l'application d'un étirement [167]. L'effet semble varier entre les études, ceci est probablement dû à la modulation du Ca²⁺ dans la réponse du muscle cardiaque suite à l'étirement (puisque en présence d'un tampon de Ca²⁺, nous observons l'effet inverse) [162]. Quant à la stimulation à plus long terme, des études ont démontré des effets importants durant le développement cardiaque. Un étirement statique de cellules souches embryonnaires de 10 % durant quelques heures induit une augmentation des marqueurs cardiaques MEF2 et GATA-4 et augmente les taux de cellules qui se contractent de façon spontanée [128].

Il existe également un étirement qu'on dit cyclique, c'est-à-dire qu'il fait des allers retours mimant l'activité contractile cardiaque. Une activité cyclique chronique (5 % à 1 Hz durant 48 h) est associée avec une orientation des cellules parallèlement au champ d'étirement et une contraction plus prononcée. Un des joueurs potentiel du réalignement des cardiomyocytes serait TRPV4, car son inhibition par les antagonistes RN1734 & HC067047 lors d'une stimulation cyclique dans des PSCs dérivés en CM bloque ce réalignement, toutefois la stimulation de TRPV4 avec l'agoniste 4- α -PDD n'est pas suffisante pour induire ce changement d'orientation [168]. La stimulation mécanique cyclique a induit une augmentation de la troponine cardiaque de type T, de la tropomyosine, de la Cx-43 et du facteur GATA4 [169]. Nguyen et collaborateurs ont montré qu'un étirement cyclique (8-15 % à 2 Hz durant 4 jours) de CM de poulet embryonnaires accéléreraient la fréquence de contraction et amélioreraient la réponse à l'isoprotérénol du feuillet cellulaire [170]. Finalement, Banerjee et collaborateurs ont aussi démontré qu'un étirement cyclique de 16 % à 1 Hz pendant 24 h était suffisant pour augmenter la prolifération de cardiomyocytes embryonnaires de souris, de même que leur

taille et l'expression de certains myofibrilles (environ 60 % d'augmentation de la titine et environ 40 % de la chaîne lourde de la myosine) [171].

De manière générale, l'étirement provoque l'ouverture des canaux dépolarisant la cellule au repos par l'entrée de Na^+ et de Ca^{2+} . L'entrée de Ca^{2+} accentue l'entrée de Na^+ via NCX qui dépolarise le potentiel membranaire parfois jusqu'au seuil initiant le PA [172]. L'étirement peut induire des extrasystoles et de l'activité spontanée dans les CM ventriculaires [165]. Il produit une augmentation de I_{K1} via une surexpression des canaux K^+ à rectification entrante et ce remodelage est responsable du raccourcissement de la durée du PA dans des CM auriculaires [173]. Un étirement chronique augmentera I_f via une surexpression de HCN2 [41] et pourrait ainsi produire un PA qui proviendrait purement d'une activation mécanique. Il a également été montré que des CM soumis à un étirement du support flexible de culture (*in vitro*) ou à une surcharge de volume (*in vivo*) vont modifier l'expression de certaines protéines, facteurs de croissance et cytokines, favorisant le développement de l'hypertrophie cardiaque [53]. L'hypertrophie cellulaire peut faire varier la fréquence autonome par le prolongement du PA [174], l'augmentation de la capacité membranaire et la diminution de I_{CaL} [175]. Un étirement uniaxial cyclique de 10% module la propagation électrique en surexprimant Cx-43 produisant une augmentation de la vitesse de conduction [24, 53]. Cet étirement uniaxial cyclique module également l'expression des protéines de jonction mécanique (ex. : N-Cadherine, desmoplakin, plakoglobin) via l'activation des « focal adhesion kinase (FAK)» [24]. L'activation de FAK ainsi que de RhoA initie la formation de myotubes ce qui favorise le développement de la matrice extracellulaire et ceci contribue à améliorer le niveau de l'organisation cellulaire [176]. Ainsi, la stimulation mécanique favorise un alignement ordonné des cellules cardiaques parallèlement avec le sens de l'étirement [24] et conséquemment, améliore la force de contraction [176, 177]. Toutefois, la variation de la fréquence de la stimulation mécanique ne semble pas avoir d'impact sur cette force de contraction, mais semble plutôt influencer l'expression de certaines protéines du couplage cellule-cellule [176]. Au niveau du génie tissulaire, l'application de la stimulation mécanique cyclique améliore la fonction contractile, l'alignement des cardiomyocytes le long de l'axe d'étirement et l'expression des marqueurs cardiaques [169]. La stimulation mécanique devient

un élément essentiel pour optimiser le tissu de remplacement produit *in vitro* dans le but de réparer ou de remplacer un tissu cardiaque endommagé.

1.5.5. Les systèmes de stimulation mécanique

Il faut remonter jusqu'en 1939 pour voir les premières études de méchanosensibilité par l'équipe de Glucksmann [178]. Depuis, la littérature révèle un large éventail d'appareils afin d'induire une stimulation mécanique, chaque système est développé selon une méthode qui lui est propre et tente d'améliorer certains aspects des modèles déjà existants. La pressurisation hydrostatique, fréquemment utilisée dans le passé, a l'avantage de causer un étirement homogène dans l'espace et nécessite un équipement peu complexe [178]. Toutefois, la pression exercée sur le milieu de culture induit une importante augmentation de la pO_2 et de la pCO_2 dans le milieu de culture ce qui se traduit en un stress important sur les cellules [178]. Subséquemment, beaucoup d'études ont été réalisées en utilisant simplement une micropipette afin de provoquer la déformation de la paroi cellulaire [178]. Toutefois, avec ce type de méthodologie, il est très difficile de quantifier l'étirement produit. Ensuite, est apparue l'étirement uniaxial qui consiste à déformer les cellules à l'aide d'un système de crochets et de moteurs [178]. Par exemple, Le Guennec et collaborateurs ont utilisé des fibres de carbone et les ont attachées à chaque extrémité, ensuite, en augmentant la distance entre les deux fibres, ils sont parvenus à étirer des cardiomyocytes isolés [178]. Similairement, un étirement cyclique dans un bioréacteur a été réalisé dans les années 2000. Les paramètres mécaniques n'étaient malheureusement souvent pas conservés à l'époque, mais la fréquence et l'amplitude qui étaient grandement dépendantes de la rigidité de la membrane utilisée, pouvaient être programmées entre 0,1 Hz et 1 Hz [178]. La méthode utilisée était d'accrocher les deux bouts du tissu musculaire avec des pinces et d'étirer (étirement uniaxial) [179]. Toutefois, la manipulation nécessaire afin d'accrocher le tissu d'intérêt peut abimer son intégrité et donc, changer la réponse biomécanique mesurée. Il a donc fallu développer une technique utilisant l'étirement linéaire, mais impliquant la déformation d'un support de culture flexible. L'étirement des moteurs est transmis aux cellules qui sont adhérentes au support flexible [178] (figure 14A). Plus récemment, un mode d'étirement biaxial (figure 14B) a été conçu. Un module appelé Flexercell FX-4000T (Flexcell Int. Corp., USA) a été réalisé afin d'obtenir des

étirements biaxiaux. Ce dernier utilise une différence de pression entre le dessus et le dessous de la membrane afin de l'étirer contre une base (plateau circulaire), par ceci, le Flexercell arrive à produire un étirement plus uniforme dont le champs de vision au centre ne changera pas ou très peu durant l'étirement [178]. Toutefois, le Flexercell n'intègre pas d'autres types de stimulation, comme la stimulation électrique combinée à la stimulation mécanique. Ainsi, cela montre la nécessité de continuer à développer des outils dans le domaine. Le « *IsoStretcher* » a été spécialement conçu pour améliorer les enregistrements (imagerie) des expériences d'étirement. Le but est de diminuer le déplacement en z lors de l'imagerie et permettre de conserver le focus [180].

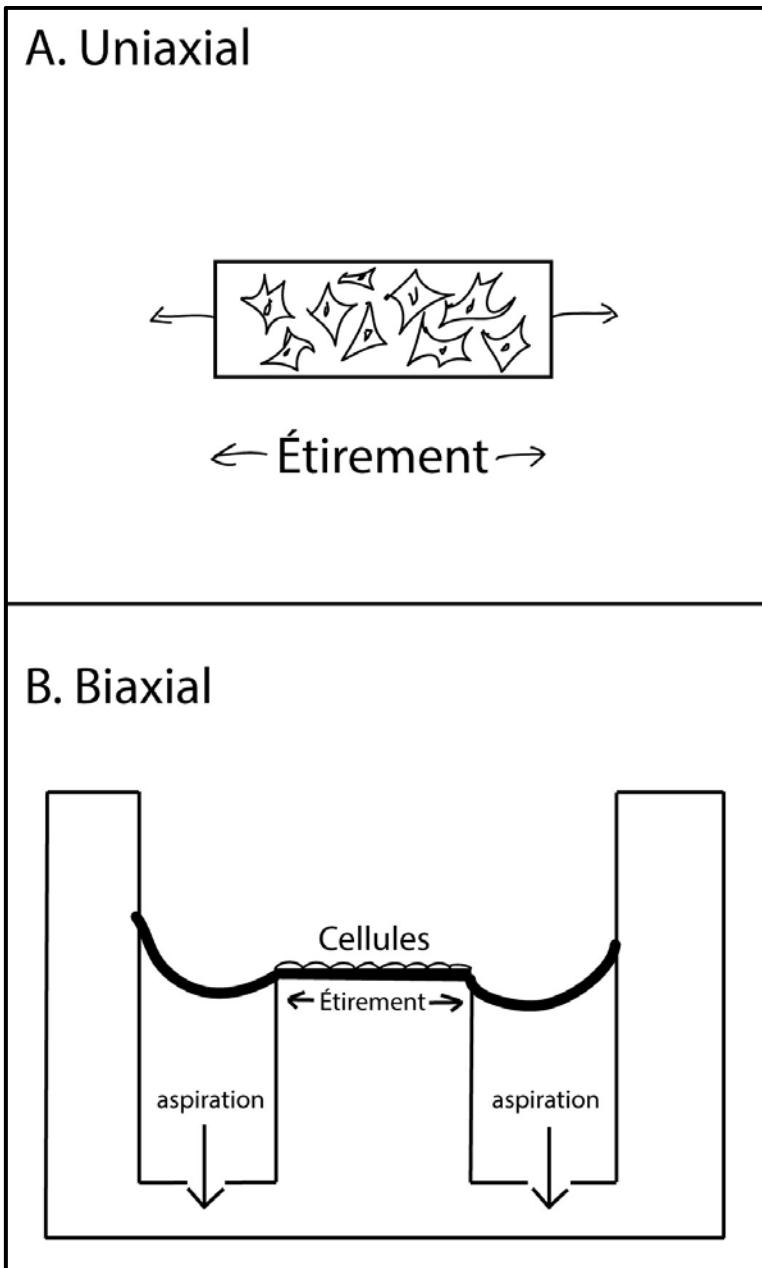


Figure 14 - Différents types d'étirement

A. Étirement non-uniforme sur l'axe de X et l'axe des Y. **B.** Étirement uniforme sur l'axe des X et l'axe des Y.

Lors de la création d'un système de stimulation, il faut donc considérer les avantages et les inconvénients connus des différentes approches pour ainsi optimiser l'utilisation du système

afin qu'il puisse répondre à nos besoins. Le tableau III présente un résumé des caractéristiques connues à ce jour des différentes approches possibles.

Tableau III - Avantages et limitations des différents types de stimulation [23]

Stimulation électrique	Stimulation mécanique
<p><i>Stimulation globale</i> (<i>par champs</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> + Facile à intégrer. + Matériel peu coûteux. + Stimulation de l'ensemble des cellules, même si peu de connexions. - Possibilité de génération de gradients de pH. 	<p><i>Linéaire</i></p> <ul style="list-style-type: none"> + Échantillon localisé près du plan focal. - Possibilité que l'échantillon se déplace hors du champ.
<p><i>Stimulation locale</i> (<i>par microélectrode intra- ou extracellulaire</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> + Stimulation d'une cellule isolée. - Si peu de connexions (connexines) entre les cellules, absence de stimulation pour l'ensemble des cellules 	<p><i>Hors plan (déplacement dans un même plan)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> + Profil d'étirement ciblé. - Échantillon migrant hors du focus durant la stimulation. - Étirement non homogène.
	<p><i>En plan (déplacement courbé)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> + Étirement homogène dans la région d'intérêt. - Déplacement non linéaire en dehors de la zone d'intérêt.
<hr/> <p>+ : Avantage - : Limitation</p>	

1.5.7. Effets de la stimulation électrique et mécanique combinée

En se rapprochant des conditions *in vivo*, l'utilisation de la combinaison (électrique et mécanique) induit un impact synergique positif sur la morphologie et la fonction de cellules cardiaques mises en culture. Toutefois, puisque l'impact isolé de ces stimulations n'est pas encore complètement connu, la majorité des études évitent d'appliquer la stimulation mécanique et électrique simultanément. Dans ce sens, Wang a décellularisé une portion du myocarde pour obtenir une matrice extracellulaire naturelle. Il a ensuite injecté des cellules mésenchymateuses à l'intérieur de cette matrice naturelle et il a transformé les cellules en cardiomyocytes à l'aide d'un traitement avec la 5-azacytidine (3 $\mu\text{mol/L}$, 24h) et de protocoles de stimulation combinée, soit mécanique (20 % d'étirement) et électrique (5 V, 1 Hz). Il est arrivé à démontrer une augmentation significative de la densité cellulaire (repopulation de la matrice extracellulaire) en présence de stimulation combinée par rapport à une stimulation électrique uniquement ou mécanique uniquement [24]. La stimulation combinée produit un effet synergique sur la repopulation cellulaire, l'alignement des cardiomyocytes et sur la formation de jonctions communicantes. Bien que les deux types de stimulations semblent produire des effets bénéfiques sur l'organisation cellulaire et la force de contraction, il semble que les mécanismes impliqués soient différents. La stimulation mécanique augmente le nombre total de cellules alors que la stimulation électrique semble plutôt augmenter le pourcentage de cardiomyocytes dans une culture [176] (tableau IV).

Tableau IV - Remodelage des courants ioniques et de la conduction intercellulaire induits par la stimulation électrique et mécanique dans différents modèles de culture cellulaire

Courant	Effet de la stimulation électrique	Effet de la stimulation mécanique
I_f	Baisse de l'expression de HCN2 et HCN4 de plus de 50% dans les cellules du nœud sinusal suite à une stimulation électrique rapide pour reproduire l'effet d'une tachyarythmie [42]	Diminution de I_f de 40% dans les cellules du nœud sinusal de lapins avec insuffisance cardiaque causée par la présence d'une surcharge de volume et de pression [181]
I_{Ca}	I_{CaL} est augmenté de 14% par la stimulation électrique rapide dans les cardiomyocytes auriculaires de rats [182]	I_{CaL} est augmenté de 19% dans les cardiomyocytes de l'épicaarde de rats dans un modèle de surcharge de pression [44]
I_{Na}		L'expression des canaux neuronaux Nav1.1 et Nav1.3 exprimés dans les cardiomyocytes est doublée dans le nœud sinusal durant l'insuffisance cardiaque associée avec une surcharge volumique et de pression [43]
I_{NCX}	La densité de I_{NCX} est augmentée dans cardiomyocytes de patients avec fibrillation auriculaire (peut-être causée par l'activation électrique rapide) [45]	
I_K	Augmentation de I_{Kr} par stimulation rapide dans les cellules auriculaires HL-1 [154]	Accélère l'activation dépendante du voltage et ralentit l'inactivation via la sous-unité Kv des canaux K+ [46] La densité de I_{K1} et I_{Kur} est significativement augmentée dans les cardiomyocytes auriculaires de rats néonataux et la densité de I_{to} est significativement diminuée [173]
Conduction intercellulaire	Augmente la conduction électrique intercellulaire en concentrant les connexines-43 aux extrémités des cellules [150]	Augmente la conduction électrique intercellulaire par la surexpression de connexine-43 [53, 183]

1.5.8. Effets du synchronisme dans la stimulation électrique et mécanique combinée

Lorsque de multiples stimulations sont appliquées en parallèle, comme par exemple lors de la stimulation électrique et mécanique combinée, il est important de synchroniser ces deux stimulations afin que le pulse électrique et l'étirement mécanique se produisent conformément au principe de contraction isovolumique tel que l'on observe *in vivo*. En effet, la stimulation mécanique reproduit le remplissage du ventricule, alors que la stimulation électrique reproduit l'induction de la contraction ventriculaire (figure 15) [176]. Un meilleur synchronisme permet d'améliorer la force de contraction des cellules en culture en augmentant l'expression des protéines contractiles (Troponin T) et de celles impliquées dans le transport du calcium (SERCA2) [176]. De plus, un synchronisme non physiologique aurait un effet néfaste sur la fonction de la construction cellulaire [176] et affectera la tension produite. Par exemple, un étirement trop hâtif au moment de la stimulation électrique ou avant cette dernière aura pour effet de diminuer la tension produite. Toutefois, un étirement survenant après le pic d'augmentation du Ca^{2+} serait responsable de 50 % de la désactivation des myofilaments [184]. Pouvoir modifier le synchronisme dans un système de stimulations est donc important pour mimer certains états physiopathologiques.

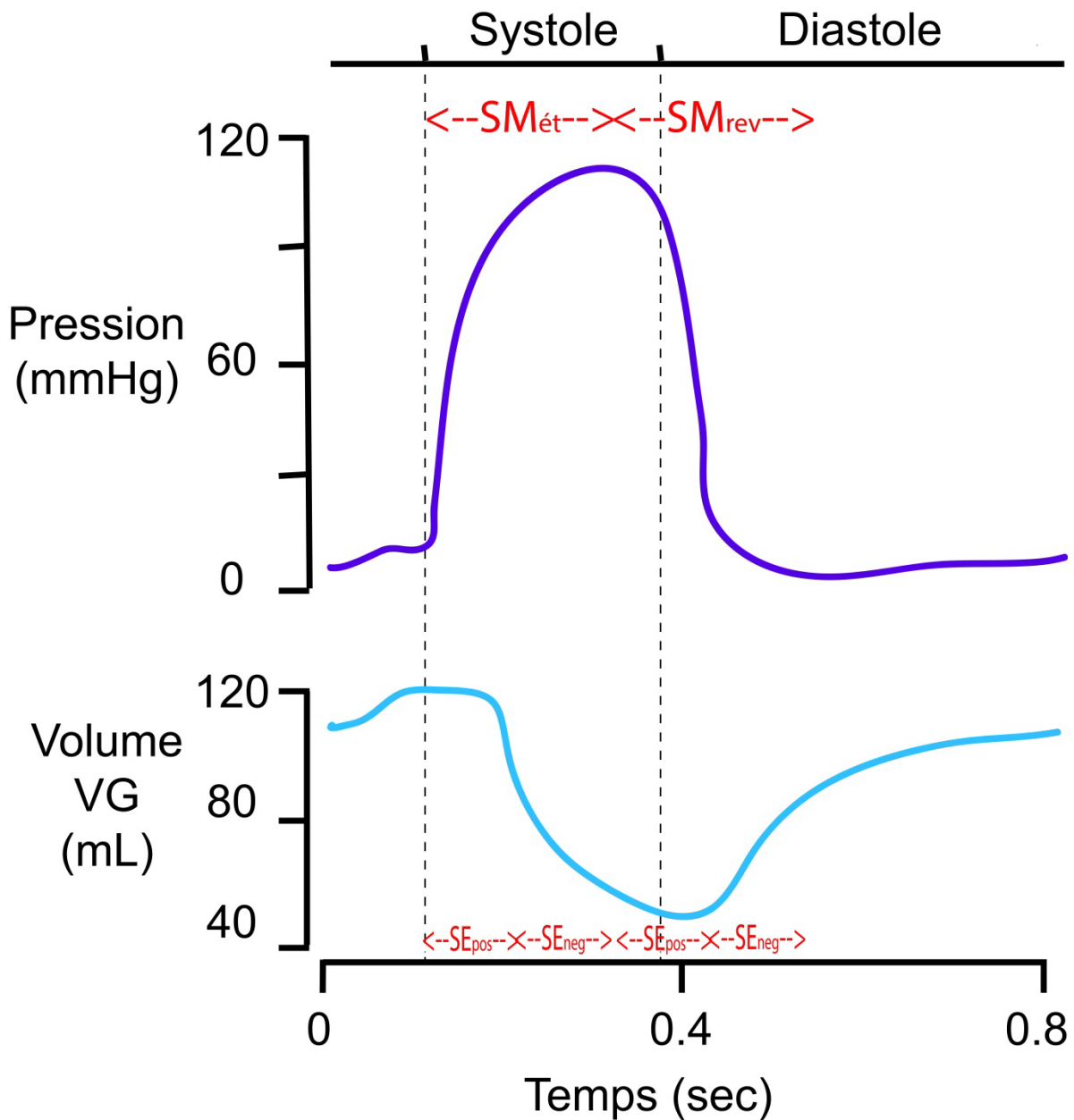


Figure 15 - Relation entre la pression et le volume sanguin dans le ventricule gauche lors du cycle cardiaque

Modèle proposé pour synchroniser les stimulations avec le cycle cardiaque. SMét : Portion de la stimulation mécanique (étirement). SMrev : Portion de la stimulation mécanique (relâchement). SEpos : Portion de la stimulation électrique (pulse positif). SEneg : Portion de la stimulation électrique (pulse négatif).

Les approches en génie tissulaire ont pour mission d'optimiser la fonction et d'assurer l'intégration fonctionnelle du tissu construit selon les besoins du receveur. Il est également important de penser au substrat sur lequel le tissu sera développé. Le substrat doit fournir le support nécessaire pour l'assemblage des cellules et ainsi assurer une bonne intégration dans l'organisme, mais avant tout, il faut connaître l'impact qu'il aura sur la physiologie des cellules afin de pouvoir optimiser les conditions de culture. L'environnement biomécanique est un facteur important qui détermine les propriétés fonctionnelles des cardiomyocytes [109, 129, 185], comme la contractilité. En fait, *in vitro*, les cardiomyocytes peuvent garder leur activité contractile pour quelques jours lorsqu'ils sont cultivés sur des surfaces rigides (verre ou polystyrène) recouvertes d'un revêtement pour permettre leur adhésion au support. Toutefois, les cardiomyocytes vont progressivement perdre leurs myofibrilles avec le temps qui se traduira par une perte de leur propriété contractile [130]. Pour étudier l'impact de la stimulation mécanique sur les cellules, beaucoup de chercheurs ont recours à un support de culture flexible en induisant une déformation mécanique de ce dernier (ex.: Flexercell) [186-190]. La nature et la rigidité du substrat jouent un rôle essentiel sur la fonction des cellules, en particulier, pour optimiser la force de contraction [191]. Il a été également proposé que la rigidité puisse influencer l'activité autonome électrique de cardiomyocytes dérivés de cellules souches [192]. La conduction électrique serait significativement améliorée lorsque la rigidité du support de culture concorde avec la rigidité de la cellule cardiaque [193]. Parmi la vaste liste de matériaux utilisés, il y a le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyacrylamide, l'alginate, le chitosan, l'agarose, certains polyestères [194] et certains nouveaux composés poreux, comme l'acide polyglycolique (PGA) [186]. Les matériaux à base de silicone offrent une meilleure tolérance à la déformation mécanique et sont donc de meilleurs candidats pour effectuer des études d'étirement, comparativement aux hydrogels, comme le polyacrylamide, qui sont plutôt fragiles [195]. Le PDMS est quant à lui un composé hydrophobique qui ne permet pas l'adhésion directe des cellules cardiaques et leur prolifération [196]. Un revêtement de protéines adhérent au PDMS, comme par exemple la gélatine, le collagène [197] ou la fibronectine [196], est requis pour faire le pont entre le PDMS et le cardiomyocyte. Les supports dérivés d'un mélange de protéines, comme le Matrigel, sont à éviter pour produire des supports à grande échelle à cause d'une grande variabilité entre les lots [93]. Dans le but d'améliorer l'adhésion, en plus d'ajouter un revêtement de protéines, la surface de

PDMS peut être exposée à un plasma à base d'air qui aura pour effet d'ajouter des groupements SiOH à la surface afin de rendre cette dernière hydrophile [196]. Pour évaluer l'impact des différents stimuli de l'environnement sur la physiologie des cardiomyocytes, différentes techniques ont été utilisées.

1.6. Différentes techniques d'évaluation fonctionnelle

La vidéomicroscopie utilise une caméra et un système numérique d'enregistrement des images pour suivre les processus biologiques, comme par exemple, les mouvements contractiles des cellules cardiaques. Les contractions et les relaxations induisent un déplacement de la membrane et des organelles qui peut être suivi par vidéomicroscopie. Un enregistrement peut couvrir différentes échelles d'espace (une cellule, un amas de cellules ou un mince feuillet cellulaire). La vidéomicroscopie constitue une approche non invasive (aucun contact avec le milieu), non toxique, non terminale et qui peut être potentiellement automatisée [198]. Par contre, on ne peut mesurer certaines caractéristiques électrophysiologiques comme les potentiels d'action. Lorsqu'on évalue certaines caractéristiques électrophysiologiques par vidéomicroscopie, il est très important de tenir compte de l'effet de la température. Une variation de ± 5 °C aura un impact d'environ 40 à 60 % sur la fréquence de contraction observée [198]. Plusieurs méthodes sont utilisées pour analyser le comportement contractile des cardiomyocytes (tableau V). Toutes ces méthodes basées sur l'enregistrement par vidéomicroscopie permettent un échantillonnage fiable et rapide de l'activité contractile des cardiomyocytes.

Tableau V - Caractéristiques des approches d'analyse de l'activité contractile des cardiomyocytes basée sur la vidéomicroscopie

Approches	Type cellulaire	Taux Images/seconde (FPS)	Drogues	Algorithme
Kamgoué et coll.	CM ventriculaires de rats adultes	N/A	Aucune	<i>Block matching</i>
Hayakawa et coll.	CM néonataux de rats (monocouche)	125	Ach terfénadine DL-sotalol 1-heptanol	<i>Block matching</i>
Liu et coll.	CM-dérivés de cellules souches (cellule isolée et monocouche)	15-30	Aucune	<i>Texture movement</i>
Ahola et coll.	CM-dérivés des iPSCs humains (cellule isolée)	30	Aucune	<i>Block matching</i>
Maddah et coll.	CM-dérivés des iPSCs (commercial)	24	Cisapride norépinéphrine	<i>Correlation coefficient</i>
Chen et coll.	CM-dérivés des H9-hESC (monocouche)	7 et 20	Isoprénaline E-4031	<i>Block matching</i>
Huebsch et coll.	CM-dérivés des iPSCs humains (cellule isolée et amas)	14 et 100	Isoprénaline	<i>Block matching</i>

FPS : Fréquence d'images par seconde (« *frame rate per second* »)

Modifié de Laurila et collaborateurs [198].

Les enregistrements par microélectrode intracellulaire produisent des données détaillées sur les courants ioniques et constituent une approche très sensible. Toutefois, cette approche est également très invasive et terminale (conduit à la mort cellulaire), car on doit briser la membrane cellulaire afin d'obtenir un joint étanche ou « *seal* » avec la pipette et à cause de ceci, cela ne permet que de courts enregistrements [198]. Cette approche est considérée comme peu efficace, car elle prend une longue période avant d'obtenir un enregistrement, du matériel couteux, une bonne expertise du personnel et ne permet pas d'évaluer une activité

multicellulaire de même que l'organisation de cette activité [198]. Les enregistrements par électrodes extracellulaires quant à eux permettent de couvrir l'ensemble du tissu ou de la monocouche cellulaire et permettent d'avoir ainsi accès aux données quant à la propagation de l'activité, toutefois, nous ne pouvons analyser le potentiel d'action par cette dernière approche, mais seulement le potentiel du champs (donnée partiellement comparable au potentiel d'action) [198].

L'imagerie par fluorescence (figure 16) est basée sur l'insertion d'une sonde fluorescente développée pour suivre les variations de certaines cibles, comme le calcium ou le voltage (les composantes de temps et d'espace y sont donc évaluées) [198]. Pour ce faire, les cellules marquées avec une sonde fluorescente spécifique comme le Fluo-4, le Fura-2, le FluoVolt ou le Di-4-ANEPPS sont excitées par un faisceau lumineux de longueur d'onde spécifique qui provoquera l'émission d'une lumière d'une longueur d'onde différente et qui sera finalement captée par la caméra. Les filtres permettent de sélectionner les longueurs d'ondes désirées pour améliorer le ratio signal/bruit. Le signal est ensuite enregistré dans l'ordinateur et le logiciel crée une carte montrant les données mesurées (ex. : transitoires calciques, potentiels d'action). Toutefois, l'ajout de ces indicateurs chimiques qui s'attacheront aux molécules à l'intérieur de la cellule va fort sensiblement interférer avec la fonction cellulaire, sans oublier de mentionner leurs effets cytotoxiques [198] et ceci doit donc être pris en considération dans l'interprétation des résultats.

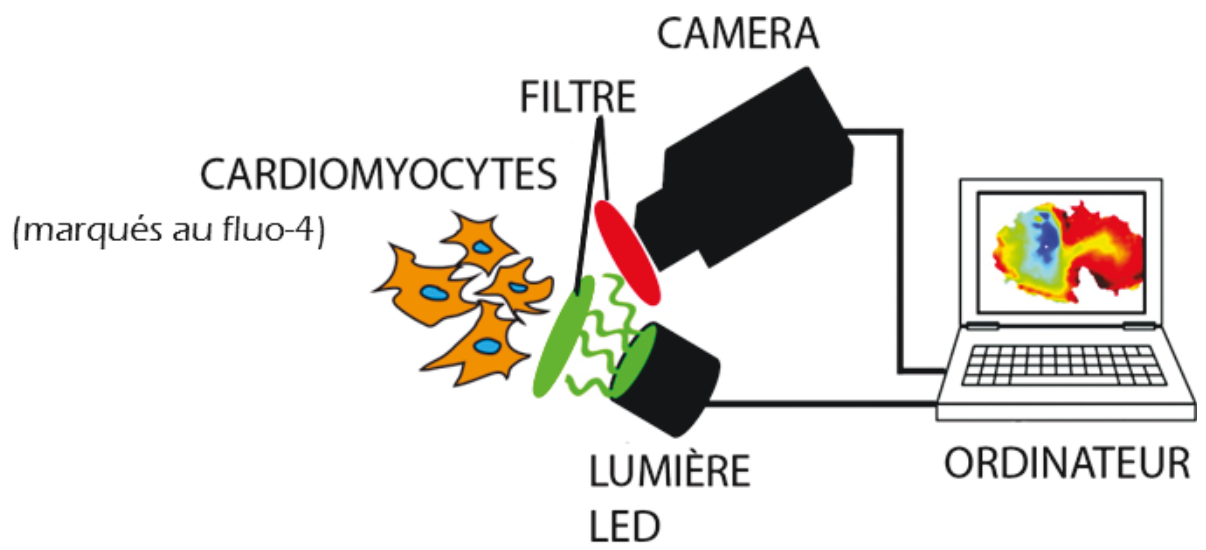


Figure 16 - Principes de la cartographie optique

2. Les objectifs de la thèse

L'objectif principal est de créer un appareil permettant la culture de cellules cardiaques afin d'optimiser le processus de production de tissu cardiaque de remplacement. Les objectifs secondaires sont de définir les effets du support de culture flexible et de la stimulation électrique, mécanique et combinée sur la physiologie des cardiomyocytes en culture. Et finalement, d'établir une nouvelle approche pour évaluer les caractéristiques des cellules contractiles en culture.

Spatiotemporal stability of neonatal rat cardiomyocyte monolayers spontaneous activity is dependent on the culture substrate

J'ai participé à l'élaboration du plan de l'étude, au développement de la méthodologie, à la réalisation des expériences de culture cellulaire, à la capture des données expérimentales, à l'analyse des résultats et finalement, à la rédaction de l'article.

La participation des co-auteurs :

James Elber Duverger : Doctorant ayant participé à la conception de l'étude, à l'acquisition des expériences en cartographie optique par fluorescence, à l'analyse des résultats et à la révision de l'article.

Estelle Petitjean : Stagiaire d'été ayant participé à l'acquisition des données de vidéomicroscopie, à l'analyse et la révision de cette section de résultat.

Ange Maguy : Collègue à l'ICM ayant participé à la conception, l'optimisation des protocoles, l'analyse des résultats et la révision de l'article.

Jonathan Ledoux : Collègue à l'ICM ayant participé à la conception, l'optimisation des protocoles, l'analyse des résultats et la révision de l'article.

Philippe Comtois : Directeur de recherche ayant supervisé le projet et qui m'a grandement guidé à travers les différentes étapes du projet. En outre, par sa participation au niveau de la conception de l'étude, de la conception des outils et algorithmes d'analyse (codes Matlab) pour l'analyse des résultats et de sa critique des travaux et finalement pour sa participation à la rédaction de l'article.

Spatiotemporal stability of neonatal rat cardiomyocyte monolayers spontaneous activity is dependent on the culture substrate

Jonathan Boudreau-Béland^{1,2}, James Elber Duverger^{1,3}, Estelle Petitjean¹, Ange Maguy¹,
Jonathan Ledoux^{1,2,4}, Philippe Comtois^{1,2,3}(*)

¹ Research Centre, Montreal Heart Institute, Montreal, H1T 1C8, Quebec, Canada

² Department of Molecular and Integrative Physiology, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, Quebec, Canada

³ Institute of Biomedical Engineering, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, Quebec, Canada

⁴ Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, Quebec, Canada

(*) Corresponding author:

Philippe Comtois, PhD

There is no potential conflict of interest to disclose.

Résumé

In vivo, les cellules cardiaques doivent continuellement se conformer à divers stimuli nécessitant une adaptation perpétuelle. Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est couramment utilisée en culture cellulaire, pour étudier la réponse cellulaire aux changements dans l'environnement mécanique. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de l'utilisation de substrats en PDMS sur les propriétés de l'activité spontanée des monocouches de cardiomyocytes en culture. Nous avons comparé les différents substrats en PDMS au standard normalement utilisé pour la culture: un substrat en verre. Bien que la fréquence moyenne de l'activité spontanée ne soit pas modifiée, le nombre de cas de réentrées est significativement plus élevé dans les échantillons mis en culture sur du verre par rapport à ceux sur du PDMS. De plus, une plus grande instabilité spatiale et temporelle du rythme d'activation a été observée quand les cardiomyocytes sont cultivés sur PDMS et ceci corrèle avec une diminution de la connexine-43 et une augmentation des taux d'ARNm pour CaV3.1 et pour HCN2. Par rapport aux cultures sur verre, les cultures sur PDMS sont associées à une plus forte réponse à l'isoprotérénol et à l'acétylcholine. Ces résultats révèlent l'importance de choisir soigneusement le substrat de culture pour des études portant sur la stimulation mécanique, en particulier pour les approches en génie tissulaire et pour les études pharmacologiques de criblage à haut débit.

Mots-clés

Propriétés biomécanique; monocouche de cardiomyocytes; activité spontanée; polydiméthylsiloxane; cartographie optique; génie tissulaire; biopacemaker.

Abstract

In native conditions, cardiac cells must continuously comply with diverse stimuli necessitating a perpetual adaptation. Polydimethylsiloxane (PDMS) is commonly used in cell culture to study cellular response to changes in the mechanical environment. The aim of this study was to evaluate the impact of using PDMS substrates on the properties of spontaneous activity of cardiomyocyte monolayer cultures. We compared PDMS to the gold standard normally used in culture: a glass substrate. Although mean frequency of spontaneous activity remained unaltered, incidence of reentrant activity was significantly higher in samples cultured on glass compared to PDMS substrates. Higher spatial and temporal instability of the spontaneous rate activation was found when cardiomyocytes were cultured on PDMS, and correlated with decreased connexin-43 and increased CaV3.1 and HCN2 mRNA levels. Compared to cultures on glass, cultures on PDMS were associated with the strongest response to isoproterenol and acetylcholine. These results reveal the importance of carefully selecting the culture substrate for studies involving mechanical stimulation, especially for tissue engineering or pharmacological high-throughput screening of cardiac tissue analog.

Keywords

Mechanical properties; contractile activity; polydimethylsiloxane; optical mapping; activation site; tissue engineering; biopacemaker.

Introduction

Cardiomyocytes are central to the electromechanical properties of the heart. Cardiac tissue can exhibit sensitivity to arrhythmias, which are complex spatiotemporal electrical activities. Dynamic electrical behaviors of cardiac tissue include normal propagation from pacemaker sites [199, 200], stable rotating spiral waves [201], unstable spiral waves that break up during propagation [202], and bursts of activity often associated with the initiation and termination of spiral waves [203]. *In situ*, cardiomyocytes are electrically excitable; some exhibit spontaneous activity associated with low contractility while most working cardiomyocytes show no spontaneous activity [204]. An increase in membrane potential (diastolic depolarization) above threshold initiates an action potential through the sequential opening and closing of membrane ionic channels, generating membrane currents that trigger contraction of the cell [205].

Sympathetic and parasympathetic stimulation are among the main mechanisms through which the autonomic nervous system controls heart rate; for example, β -adrenergic stimulation positively shifts voltage dependence of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels that results in an increased current density [206] and faster diastolic depolarization.

Spontaneous activity can be physiologically necessary (sinoatrial node as the primary pacemaker site, atrioventricular node, and Purkinje fibers) [204] or detrimental (ectopic activity leading to arrhythmia genesis) [207]. Spontaneous activity, designated the “membrane” or “voltage” clock, is the result of a delicate balance between inward and outward currents resulting from the activity of several voltage-dependent ion channels [204]. HCN forming the funny current (I_f), L-type Ca^{2+} channels, T-type Ca^{2+} channels, and delayed rectifier K^+ channels are among the ion channels expressed at the cardiomyocyte plasma membrane that contribute most to the membrane clock [40]. I_f is believed to be a key player in pacemaker driving capabilities [208]. In the intracellular space, Ca^{2+} cycling contributes to activation through Ca^{2+} release and reuptake from the sarcoplasmic reticulum and membrane flux via the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, and has been designated the “calcium” clock [209].

Excitation–contraction coupling links the electrical excitation of cardiomyocytes to cellular contraction [210]. There is also a feedback mechanism, termed mechano-electrical feedback (MEF), which connects mechanical constraints to cardiac electrical activity [211]. MEF has been shown to modulate the rate of spontaneous activity of the sinoatrial node [212] and the conduction of electrical impulses [213], thus promoting complex spatial activity. *In vivo*, the microenvironment surrounding cells is composed of a mixture of heterogeneous physical, chemical, and mechanical properties. Modification of these parameters impacts cell fate by controlling multiple aspects of their behavior, including growth, proliferation, differentiation, migration, and gene expression [197, 214, 215], as well as regulating functional properties of cardiomyocytes [109, 129, 185], such as contractility. Cardiomyocyte spontaneous activity is dependent on the expression of ion channels that can be modified under many conditions, such as altering the mechanical properties of the cell microenvironment [161, 185, 216], electrical stimuli [154], and mechanical stimuli [173]. Integration of these properties in a culture environment may lead to the ability to control the spontaneous rate of bioengineered cells.

Cell culture of cardiac tissue analog is becoming increasingly interesting for regenerative medicine (conditioning of pre-injected stem cell–derived cardiomyocytes [109, 110] and tissue engineering [111-115]) and high throughput for cardiotoxicity evaluation [116, 117]. *In vitro*, rhythmic contraction can be sustained for days when cardiomyocytes are grown on hard, ligand-coated culture materials (e.g. glass and polystyrene); however, cells ultimately lose their rhythmic contractions and myofibrils [130]. Cardiomyocytes are known to have stretch and stress sensors responsive to changes in myocardial mechanical conditions occurring in pathology or aging [129]. Currently, most mechanical stimulation experiments use the deformation of an elastic substrate (e.g. Flexcell) [186-190]. Adequate understanding of the impact of the elastic substrate on which cells are to be cultured for mechanical stimulation is an important step towards optimizing culture conditions. Many studies have shown an important effect of substrate stiffness on cell function, notably that a substrate with tissue-like stiffness is most appropriate to optimize cardiomyocyte contraction force [191]. It has also been proposed that stiffness influences the rate of spontaneous activity of stem cell–derived cardiomyocytes [192]. Interestingly, myocardial conduction is significantly optimized when the stiffness of the cell culture environment matches that of cardiac cells [193]. Different elastic substrates have been used to study the effect of mechanical properties

(microenvironment or deformation) on cells; these materials include polydimethylsiloxane (PDMS), polyacrylamide, alginate, chitosan, agarose, and polyesters [194]. Silicone-based materials offer better tolerance to mechanical deformation compared to hydrogels like polyacrylamide that are weak and brittle; indeed, polyacrylamide is not a suitable material for stretch-related studies [195]. PDMS is hydrophobic and does not allow direct cell attachment and proliferation [196]. This issue can be resolved by coating PDMS with proteins that attach to hydrophobic surfaces, such as gelatin or fibronectin [196]. In addition to surface coating, PDMS can be temporarily rendered hydrophilic by exposing the surface to air plasma [196].

In the present study, we chose to investigate the impact of substrate type (glass vs PDMS) on the frequency, stability, and organization of spontaneous activity, as well as the impact of sympathetic and parasympathetic stimulation, on neonatal rat cardiomyocyte monolayers. We also evaluated the level of different genes implicated in the generation of action potentials and electrical conduction mechanisms. As such, the expression of HCN2 and CaV3.1 mRNA increased on the softer substrate. When focusing on autonomous activity, we observed an increased number of activation sites (meaning changes in the location of activation) on PDMS compared to the glass substrate. This was related to an increased instability of spontaneous activity and a tendency towards a decreased expression of connexin-43 (Cx43) on the PDMS substrate. Finally, cardiomyocytes cultured on PDMS 1:20 exhibited the greatest increase in the frequency of contraction after stimulation with isoproterenol (ISO) and the greatest decrease with acetylcholine (ACh) compared to cultures on glass. This study highlights the importance of carefully evaluating the choice of elastic substrate for mechanical stimulation. Silicone-based PDMS can favor unstable spontaneous rhythms and responses to pharmacological stimuli by altering intercellular connectivity and ion channels influencing the voltage clock of cardiomyocytes.

Materials and Methods

All animal-handling procedures were concordant with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the institutional Animal Research Ethics Committee (*Permit Number: 2011-35-01P*). Efforts were made to minimize suffering.

PDMS substrate fabrication

Polydimethylsiloxane (*PDMS, SYLGARD 184, Dow Corning*) is a binary compound chosen because of its elasticity and optical transparency. Mass ratio of pre-polymer (base) and cross-linker (curing agent) can be varied to get a softer to harder material after 48 hours of curing at room temperature [217-219]. De-foaming is performed to remove air bubbles and spin coating (2100 rpm) for 10 seconds is applied to get a thin and uniform surface. The estimated thickness of the PDMS layer is 200 μm based on the quantity added and the speed of rotation. After full curing of the PDMS, but just before coating and seeding of the cells, the dishes were plasma-cleaned (*Harrick Plasma, PDC-32G*) to increase the wettability of the surface [220]. Different substrates were used: glass, PDMS ratio (curing agent:base) of 1:20, and PDMS ratio of 1:40. These PDMS ratios were chosen because they are close to the 1:10 ratio suggested by the manufacturer for general applications, while having Young's moduli close to the physiological value. To determine the Young's modulus of the PDMS at different ratio, we created small cylinder with different ratio of PDMS by using a syringe as a mold and we measured the deformation (elongation) of the PDMS cylinder in relation to a series of weight (20 g, 50 g, 70 g, 100 g, 150 g) that was added to the bottom end of that cylinder. Images were captured with a fixed digital microscope camera (*Dino-Lite, AM-413TL-M40, London, Ontario*) and the elongation was measured by using their calibrated software. Stiffness is then calculated using the Young's modulus formula (Appendix S1)

Cell isolation and culture

Isolation was performed according to the protocol of the neonatal cardiomyocyte isolation kit (*Worthington, Lakewood, NJ, USA*). Briefly, rats aged 1–3 days old (*Sprague-Dawley, Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada*) were sacrificed by decapitation (no anesthesia required at this stage). Hearts were rapidly excised and immediately placed in cold Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Hank's Balanced Salt Solution. Ventricular muscle was harvested and then minced on ice into 1–3 mm³ pieces. Purified enzymatic digestion (50 µg/mL trypsin and 136 µg/mL collagenase) was then used to gently dissociate cardiomyocytes. Isolated cells (enriched cardiomyocytes) were counted and seeded at a density of 10⁶ cells/mL in 20-mm diameter glass-bottom culture dishes (*D29-20-0-N, In Vitro Scientific, Sunnyvale, CA, USA*) pre-coated (on glass or on PDMS) with a mixture of 0.2% porcine-derived gelatin (*G1890, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada*) and 0.00125% fibronectin solution (*F1141, Sigma-Aldrich*) [221]. A gelatin-fibronectin mixture was preferred against other coating products after having performed cells adhesion experiments with HEK293t cells and neonatal rat cardiomyocytes cells. Cells were grown for 24 hours in DMEM (*319-050-CL, Wisent Inc., St-Bruno, Canada*) with 5% fetal bovine serum (*SH30396.03, Fisher Scientific Co. Ltd, Ottawa, Ontario, Canada*) and 1% penicillin/streptomycin (*450-201-EL, Wisent Inc.*). Cardiomyocytes were then starved of fetal bovine serum for another 24 hours in DMEM with 1% penicillin/streptomycin prior to experimentation.

The specific methodology for cell population evaluation based on gene expression can be found in Appendix S2.

Spontaneous contraction recordings

Phase contrast images of neonatal cardiomyocytes were acquired 48 hours post seeding *in vitro* with a Dalsa HM640 camera (60 frames by second) coupled to an inverted Nikon optical microscope (10X magnification and a field of view of 0.34 mm × 0.45 mm). Spontaneous activity measurements were performed with an algorithm developed in Matlab. Video analysis was carried out as follows: a frame of reference corresponding to the pre-contraction state of

the cells (M_{rest}) is determined and the corresponding 2D image is then subtracted to all acquired frames ($M_{\text{diff}}(x,y,t) = M(x,y,t) - M_{\text{rest}}$). The sum of the absolute difference $M_{\text{diff}}(x,y,t)$ over all pixels (x,y) divided by the number of pixels serves as an aggregate temporal signal. A moving window of 5 samples is then applied to smooth the signal followed by baseline drift removal (subtraction of 40 samples moving window filtered signal). Spontaneous frequency, standard deviation of period (σ_{noise}), and pauses (corresponding to time interval greater than 3 seconds) were calculated from the video data. Videomicroscopy (30 seconds recordings) was performed at 37 °C over a 20 minutes period at the following time points: 0 (pre-drug; ISO or Ach), 1, 5, 10, 15, and 20 minute(s) for each condition (glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40).

Mapping of calcium dynamics

After 48 hours of culture, the cardiomyocytes were washed once with fresh media and incubated with 10 μM of fluo-4 AM (*F-14201, Life technologies, Burlington, Ontario, Canada*) and 0.2 % Pluronic acid F-127 (*P-3000MP, Life Technologies*) for 30 minutes at 37 °C. Fluo-4–loaded cardiomyocytes were then washed 4 times with fresh media, followed by a 15 minutes resting period to allow de-esterification of the dye before starting calcium transient mapping experiments performed in DMEM at 37 °C. Fluorescence was recorded for 30 seconds at 125 Hz with a *CardioCCD camera (RedShirt Imaging, Decatur, GA, USA)*. The dye was excited with a quartz tungsten halogen lamp (*Oriel Instruments Inc., Stratford, CT*). The filters used for excitation and emission were $\lambda_{\text{excitation}} \approx 480 \pm 20$ nm (*Chroma Technology Corp, Bellows Falls, VT*) and $\lambda_{\text{emission}} \approx 535 \pm 25$ nm (*Semrock Inc., Rochester, NY*), respectively. The system was set to image with an acquisition frame rate of 125 Hz for all experiments. Signals were filtered and analyzed using a program developed in-house using Matlab software (*R2008, MathWorks Inc., Natick, MA*). In brief, raw acquisitions were normalized by the minimum fluorescence for each pixel and the dF/dt (the first time derivative of fluorescence; used to evaluate the activation time) was approximated using a finite difference approach (2 points). The resulting signals were then spatially filtered using a Gaussian kernel (5x5 pixels with $\sigma=1.5$; total field of view = 80x80 pixels) followed by a temporal moving average with a two-sample window.

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Briefly, cultured neonatal cardiomyocytes were harvested in RA1 lysis buffer from Nucleospin RNA II kit (*Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Waltham, MA, USA*). mRNA was isolated using the same kit following the manufacturer's instructions, including DNase treatment to prevent genomic contamination. mRNA was then reverse-transcribed with the High-capacity Reverse Transcription kit (*Applied Biosystems, Burlington, Ontario, Canada*). qPCR was performed with TaqMan probes from Applied Biosystems for housekeeping genes (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and Beta-2 microglobulin (β 2M) and with primers designed for SYBR Green experiments to assess the expression of $K_{ir}2.1$, CaV3.1, CaV3.2, HCN2, HCN4, Cx43, Kir3.1, Kir3.4, and Adr β 1 (**S1 Table** for sequences). The geometric mean of the expressions of HPRT, β 2M and GAPDH was used for normalization. qPCR reactions were performed with TaqMan Gene Expression Master Mix and Power SYBR Green kits from Applied Biosystems. Reactions were run on an Mx3000 qPCR System from *Stratagene*. Relative gene expression values were calculated by the $2^{-\Delta C_t}$ method.

Sympathetic and parasympathetic stimulation

Acute effects of the sympathetic agonist, isoproterenol (ISO, *I6504, Sigma-Aldrich*) and the parasympathetic agonist, acetylcholine (ACh, *A2661, Sigma-Aldrich*) were studied by videomicroscopy and calcium imaging at 48 hours post-culture. Final concentrations of 100 nM ISO and 1 μ M ACh were added to the culture media to stimulate sympathetic and parasympathetic pathways, respectively. Drug effects were evaluated by videomicroscopy. In a second set of experiments, changes in spatiotemporal activity by ISO and ACh were studied using calcium imaging with fluo-4.

Cell proliferation assay

Cultured neonatal rat cardiomyocytes were washed with media (*DMEM, Wisent*) and then fixed with 2 % paraformaldehyde for 15 minutes. Cells were permeabilized in 1% bovine

serum albumin solution (*Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada*) with 1 % triton X-100 (*TRX506, Bioshop, Burlington, Ontario, Canada*). Cardiomyocytes were then stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (*DAPI, D1306, Life Technologies*) (1:1000) and finally the seeding area was cut from the membrane and transposed in 20 mm diameter glass-bottom culture dishes (*D29-20-0-N, In Vitro Scientific*) with Mowiol mounting medium (*Mowiol 4-88, 81381, Sigma-Aldrich*). Imaging was performed with a Zeiss LSM710 inverted confocal microscope.

Statistical analysis

Data were analyzed using Prism 5 by GraphPad. One-way analysis of variance (anova) followed by Tukey multiple comparison test was used to compare groups unless otherwise stated. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

Stiffness of the PDMS substrate

Stiffness measured as a function of the ratio of pre-polymer (base) and cross-linker (curing agent) is presented in supplementary data (Fig. S1). Stiffness is expressed as the modulus of elasticity measured by Young's modulus formula (Appendix S1). PDMS mixed in ratios of curing to base agent (curing:base) produced substrates with mean moduli of 974±32 kPa (1:5), 293±8 kPa (1:10), 112±6 kPa (1:15), 87±22 kPa (1:20), 42±6 kPa (1:25), 27±4 kPa (1:30) and 16±4 kPa (1:40). In comparison, stiffness of the glass surface has been shown to be ~30 GPa [22].

Spontaneous activity in monolayer cultures

The effect of substrate stiffness on spontaneous activity was first evaluated by videomicroscopy. Softer substrate tends to diminish the autonomous contraction frequency of

cultured cardiomyocytes as spontaneous frequency was decreased by 24.4% (PDMS 1:20) and 30.8% (PDMS 1:40) (n=11) compared to glass (Fig. S2A). Interestingly, the variability in the frequency within groups is much greater in the glass group compared to PDMS groups with a subset of higher frequencies.

A mapping study of calcium activity was performed to determine if spatiotemporal activity could explain the presence of high-frequency activity. Although most of the activity was ectopic in nature with spatially restricted origin sites, spontaneous reentry could also be detected in the glass substrate group as illustrated with a typical example in Fig. 1. The time course of normalized calcium transients (Fig. 1A) was obtained from the pixel marked by an “x” (in Fig. 1B). Snapshots of the dF/dt are depicted in Fig. 1B over 1 rotation of reentry. The period of activity in this example was highly stable at 255 ms. Propagation along the circular trajectory (which is not always perpendicular to the activation front) depicted as a white circle (Fig. 1B) shows periodic activity (Fig. 1C). However, it is clear that the local activation delay δ ($\delta = \text{slope}$) is not constant with large regions of rapid velocity along the trajectory from $3\pi/4$ to $3\pi/2$, while the region close to 2π illustrates a slow conduction area. Local activation delay was not uniform along the reentrant trajectory and changed from $\delta_1 = 0.15$ second/cm to $\delta_2 = 0.4$ second/cm, $\delta_3 = 0.18$ second/cm, and finally $\delta_4 = 0.66$ second/cm. The activation map (Fig. 1D) was obtained for the time interval between 0.1 and 0.35 second of reentrant activity. The maps shows a central core of $\sim 0.31 \text{ mm}^2$ (indicated by the arrow) and highlights the slow region of the reentrant pathway (time near 0.1 to 0.15 second).

The high frequency of reentrant activity found in mapping led us to go back to the videomicroscopy data. Further analysis of the videomicroscopy mean frequency recorded at different time points (0, 1, 5, 10, 15, and 20 minutes) for a duration of 30 seconds shows a significantly higher incidence of high-frequency reentrant activities for cardiomyocyte monolayers cultured on glass compared to PDMS (5 % for glass and 0 % for both PDMS 1:20 and 1:40, $p < 0.05$ with Fisher’s exact test when comparing samples with at least 1 episode of frequency > 3 Hz). Note that we couldn’t directly confirmed by optical mapping that these

high-frequency results observed in videomicroscopy were associated to reentrant activity because the staining procedures with the fluorescent dye stopped the reentrant activity. But we have measure the frequency of reentrant activities that we have observed when doing optical mapping recordings and we have estimated that a frequency over 3 Hz was associated with reentrant activity. High-frequency samples were assumed to be associated with reentrant activity and appeared responsible for the frequency of substrate-dependent activity. Indeed, removal of these reentrant-associated samples (defined as frequencies > 3 Hz) resulted in a loss of difference, as the mean spontaneous activity was reduced by 1.5 % and 9.8 % for cardiomyocytes cultured on PDMS (1:20 and 1:40, respectively) compared to glass (Figure S2B). Thus, the higher mean frequency of spontaneous activity observed in our data on glass could be explained by the presence of these spontaneous reentry.

Stability of the spontaneous activity

Temporal variation of the interbeat interval is an important parameter of spontaneous activity, reflecting the stability of cardiac homeorhesis. A strong oscillator, as desired in tissue engineering aimed at the development of biopacemakers [222] should show less variability in the interbeat interval, while a weak oscillator may be more sensitive to perturbation yielding more variation in spontaneous activity. Thus, the standard variation in the interbeat interval (σ_{period}) from a 30 seconds acquisition was used as a measure of temporal activity. Typical examples of peak-detection and period signatures are presented in the left column of Fig. 2A and the correlated interbeat intervals (time difference between peaks highlighted by circles in the column on the left) are displayed in the columns on the right. The rate of spontaneous activation appeared less stable with greater variance of the PDMS groups compared to glass (Fig. 2B, Ansari-Bradley test, $p < 0.05$). PDMS 1:20 had the highest variation (median $\sigma_{\text{period}} = 0.29$ second), followed by PDMS 1:40 (median $\sigma_{\text{period}} = 0.23$ second), and glass (median $\sigma_{\text{period}} = 0.19$ second). Evaluation of the number of pauses (absence of spontaneous contraction for longer than 3 seconds) shows that pauses are significantly more frequent in the PDMS 1:20 group compared with the PDMS 1:40 group (presented in Fig. 2C). The ratio of samples with

at least 1 pause were calculated as 0.1, 0.24, and 0.05 for glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40, respectively. There was a significant difference between the two PDMS groups.

Number of activation sites

Mapping data (30 seconds acquisitions) revealed that the number of activation sites (indicative of spontaneous activity) of the entire seeding area of the petri dishes (20 mm) was generally lower for cardiomyocyte monolayers cultured on glass compared to PDMS. As shown in Fig. 3A, there is a 115 % increase in the number of activation sites on PDMS (2.8 ± 0.4 sites with PDMS 1:20 and 2.8 ± 0.5 sites with PDMS 1:40) compared to glass (1.3 ± 0.3 sites).

Examples of activity obtained from a cardiomyocyte population cultured on different substrates are presented in Figs. 3B-D. Panel i shows a temporal trace of the activity recorded with fluo-4, while panel ii illustrates the activation map of the first beat of each different site of activation found in these examples. Mean interbeat interval of monolayers (Fig. 3B) cultured on glass was 0.64 ± 0.02 second. In the examples shown, only 1 site of activation was found (middle left side of the monolayer). For PDMS 1:20, the mean interbeat interval for the example presented in Fig. 3C was 4 ± 1 seconds. Within a 30 s recording period, a total of 3 different activation sites were found. On PDMS 1:40 (Fig. 3D), the mean interbeat interval was 0.7 ± 0.2 second and activation occurred over 3 sites. Heterogeneity in the spontaneous pacemaking activity of isolated neonatal rat cardiomyocytes is well established [27]. Intercellular communication might therefore affect automaticity of a monolayer consisting of beating and non-beating cells [223, 224]. Intercellular communication was then probed through the expression of Cx43, the main protein involved in cardiac electrical coupling. Surprisingly, a non-significant lower mRNA expression of Cx43 ($p=0.12$; $n=7$) was noted in monolayers cultured on PDMS (1:20 or 1:40) compared with glass (Fig. 4A). Decreased cellular coupling could therefore increase the propensity for the multifocal activation observed on PDMS.

Effect of voltage clock–associated mRNA expression on spontaneous activity

The voltage clock, an essential component of cardiomyocyte excitability and spontaneous activity might also be altered by the culture substrate. Changes in voltage clock–associated gene (Kir2.1, CaV3.1, CaV3.2, HCN2, and HCN4) expression were then sought at the mRNA level by qPCR. Inward-rectifier K⁺ ion channels (Kir2.1) are key stabilizers of cardiac excitability and as expected, mRNA levels for Kir2.1 (Fig. 4B) appear to be lower on PDMS 1:20 and 1:40 than on glass. mRNA expression was 28 % and 23 % lower in PDMS 1:20 and PDMS 1:40, respectively, compared to glass. T-type calcium channels (CaV3.1 and CaV3.2) are native low voltage–activated calcium channels involved in cardiac pacemaker activity [225]. CaV3.1 (Fig. 4C) is significantly increased by 24 % on PDMS 1:40 compared to glass, while a non-significant increase of 9 % was detected for PDMS 1:20. In contrast, CaV3.2 (Figure S4A) decreased by 10% on PDMS 1:40 and by 25 % on PDMS 1:20 compared to glass. HCNs form the pacemaker current (I_f), known to promote spontaneous activity through its hyperpolarization-dependent activation [206]. HCN2 (Fig. 4D) has an increased expression on PDMS 1:40 compared to glass ($p < 0.05$), while there was no significant difference in mRNA expression of HCN4 (Figure S4B).

Parasympathetic and sympathetic modulation of spontaneous activity

Relative spontaneous frequency was obtained by videomicroscopy and calculated by taking spontaneous frequency of contraction recorded at $t=1, 5, 10, 15,$ and 20 minute(s), and by dividing that value by the spontaneous frequency prior to the addition of the drug (pre-drug at $t=0$). Appropriate controls (without drugs) showed lack of time-dependent effects as illustrated in Figure S4C.

Fig. 5A shows the time-dependent effect of sympathetic stimulation by exposure to 100 nM of ISO. The frequency of contractions at $t=1$ minute after the addition of ISO increased by 61.9

% (glass), 64.2 % (PDMS 1:20), and 55.9 % (PDMS 1:40). Interestingly, β -adrenergic stimulation appears to be transient in cardiomyocytes cultured on glass as there was a small increase of 1.3 % at $t=20$ minutes. However, ISO effects were significantly maintained over the same period in monolayers cultured on PDMS (84.0 % with PDMS 1:20 and 53.6 % with PDMS 1:40 vs. glass, $p<0.05$).

Fig. 5B shows the effect of parasympathetic stimulation with 1 μM of ACh that resulted in slower spontaneous activity. Over a 20 minutes period of acquisition after adding ACh, the greatest observed slowing of spontaneous activity was 49 %, 61 %, and 57 % for glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40, respectively. The rate of contractions at $t=1$ minute after the addition of ACh was decreased by 43.5 % (glass), 49.2 % (PDMS 1:20), and 37.0 % (PDMS 1:40). Consequently, no significant differences were observed at $t=1$ minute between the groups ($p=0.7$). The frequency of contractions at $t=20$ minutes after the addition of ACh was not different between the groups ($p=0.33$), as it was decreased by 47.6 % (glass), 55.3 % (PDMS 1:20), and 30.6 % (PDMS 1:40).

The number of pauses (duration longer than 3 seconds) for the set of samples was estimated pre-drug and at $t=1$ minute post-drug. The results of this analysis can be found in Figure A in S7 Fig. (pauses for ISO study) and Figure S7B. (pauses for ACh study). For ISO, the most interesting result is the tendency towards the greatest decrease in the number of pauses in the PDMS 1:20 group (comparison between pre and post-ISO). This result is in accordance with decreased σ_{period} presented in Fig. 5C. As for the effects of ACh, all substrates show an increased number of pauses, although only the PDMS 1:40 group shows a significant augmentation (post-ACh vs. pre-ACh comparison).

Parasympathetic and sympathetic stimulation: effect on instability of spontaneous activity

This section focuses on the impact of parasympathetic or sympathetic stimulation on the instability of spontaneous activity. Mean σ_{period} values for the control group on glass were

0.19±0.04 second (pre-ISO), 0.15±0.03 second (t=1 minute), 0.26±0.06 second (t=5), 0.15±0.03 second (t=10), 0.23±0.07 second (t=15), and 0.21±0.06 second (t=20). Mean σ_{period} values for the control group on PDMS 1:20 were 0.39±0.07 second (pre-ISO), 0.21±0.05 second (t=1), 0.19±0.04 second (t=5), 0.15±0.03 second (t=10), 0.11±0.02 second (t=15), and 0.15±0.03 second (t=20). For cultures on PDMS 1:20, σ_{period} was decreased significantly up to 20 minutes after the addition of ISO ($p<0.05$, Mann-Whitney comparison test). There was a tendency for mean σ_{period} values in the PDMS 1:40 control group to decrease. No significant change in σ_{period} was found over time in cardiomyocytes cultured on glass after the addition of ISO over 20 minutes (Fig. 5C).

Statistical differences for σ_{period} in the presence of ISO were achieved on PDMS 1:20 after 10 minutes of ISO addition, indicating a stronger effect on this substrate that also had the highest median of σ_{period} (as shown previously in Fig. 2A).

Fig. 5D illustrates the increase in σ_{period} in cardiomyocyte monolayers after the addition of ACh. Mean σ_{period} values for the ACh group on glass were 0.15±0.04 second (pre-ACh), 0.93±0.29 second (t=1 minute), 1.09±0.50 second (t=5), 1.11±0.49 second (t=10), 1.00±0.42 second (t=15), and 0.62±0.36 second (t=20). A significant increase in σ_{period} between pre-ACh and post-ACh was observed at t=1 minute ($p<0.05$, Mann-Whitney comparison test), while no significant change was observed for the remaining measures (t=5, 10, 15, and 20 minutes) on glass cultured monolayers. For the ACh group on PDMS 1:20, mean σ_{period} values were 0.35±0.08 second (pre-ACh), 0.36±0.10 second (t=1 minute), 1.30±0.44 seconds (t=5), 1.25±0.38 seconds (t=10), 1.91±0.63 seconds (t=15), and 0.77±0.29 second (t=20). For cardiomyocytes cultured on PDMS 1:20, σ_{period} was increased significantly pre-ACh vs. post-ACh at t=5 and 10 minutes after the addition of ACh ($p<0.05$, Mann-Whitney comparison test). For the ACh group on PDMS 1:40, mean σ_{period} values were 0.27±0.06 second (pre-ACh), 1.07±0.30 seconds (t=1 minute), 1.45±0.37 seconds (t=5), 1.83±0.46 seconds (t=10), 1.71±0.43 seconds (t=15), and 1.68±0.42 seconds (t=20). According to these results, a significant increase in σ_{period} between pre-ACh and post-ACh was observed for PDMS 1:40 at t=1, 5, 10, 15 ($p<0.05$, Mann-Whitney comparison test), and 20 minutes ($p<0.01$, Mann-Whitney comparison test).

Interestingly, increased σ_{period} could be observed at $t=1$ minute after the addition of ACh for glass and PDMS 1:40 substrates, while the effect on PDMS 1:20 appeared later at $t=5$ minutes. Overall, this indicates that the substrate influenced drug action on spontaneous activity. In this example, the destabilization effect of ACh seems to be decreased when cardiomyocytes are cultured on PDMS 1:20.

Parasympathetic and sympathetic stimulation: effect on 1st activation site

As the number of activation sites is significantly higher on PDMS substrates compared to glass substrate, we checked whether the significant decrease in σ_{period} following ISO injection is associated with a diminution in the number of activation sites.

Mapping experiments in presence of ISO show a decrease in the number of activation sites on glass (2 sites pre-ISO compared to 1 site after ISO; Figure S5A and Figure S5B) and PDMS 1:20 (4 sites pre-ISO compared to 2 sites post-ISO; Figs. 6A and 6B). However, no change was observed for PDMS 1:40 (3 sites pre-ISO and post-ISO; Figure S5C and Figure S5D). Once more, ISO has greatest effect on PDMS 1:20, which is in agreement with the data showing the effect of ISO on frequency.

Pharmacological parasympathetic stimulation by ACh increased the number of activation sites on glass (2 sites pre-ACh compared to 3 sites post-ACh; Figure S6A and Figure S6B). No change was observed on PDMS 1:20 (2 sites were observed both pre-ACh in Figure S6C and post-ACh in Figure S6D). Mapping cultures on PDMS 1:40 revealed an increase in the number of activation sites (3 sites pre-ACh compared to 2 sites post-ACh, Figure S6E and Figure S6F). Overall, parasympathetic stimulation with ACh did not exert a clear effect on the number of activation site.

mRNA levels related to the effects of parasympathetic and sympathetic stimulation

There were no significant differences in the mRNA expression of proteins related to parasympathetic (IKACH, Kir 3.1, and Kir3.4; Figure S4D and Figure S4E) or to sympathetic (β 1 adrenergic receptors; Figure S4F) stimulation between substrates.

Stability of cell populations between substrates in culture

Myofibroblasts can be found in cardiomyocyte cultures. These cells can be electrically coupled to cardiomyocytes in culture and possibly in tissue thus affecting depolarization, ectopic activity, electrical conduction, and reentry sensitivity [124, 226-228]. As such, evaluation of possible changes in myofibroblast population between the groups under study has been done. Expression of alpha-actinin gene in primary cultures was evaluated with qPCR (Fig. S8). A similar level of alpha-actinin gene expression was found between the glass and PDMS groups. There is no indication of a difference in the number of cardiomyocytes within monolayers between the groups investigated. Results obtained for alpha smooth muscle actin (alpha-SMA), a marker of myofibroblast, are presented in Fig. S9. No significant differences in gene expression of alpha-SMA was found between the groups of interest (glass, PDMS 1:20, PDMS 1:40). These results indicate that no important difference in the cell population could be behind the difference in dynamics between glass and PDMS substrates.

Discussion

To study stretch-related effects including simulating pathological conditions like hypertrophy, pressure-overload [229], or atrial cardiomyocyte remodeling [230], a flexible cell culture substrate like StageFlexer Membrane with Flexcell systems (*Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA*) or similar silicone-based membrane (e.g. non-reinforced vulcanized silicone membrane) is generally used [231-233]. We hypothesized that culturing on such elastomeric substrates affects the spontaneous activity of cultured neonatal

rat ventricular cardiomyocyte (NRVM) monolayers, based on published studies illustrating the effect of the substrate properties on cardiomyocyte shape [191, 234, 235], calcium transient morphology [129], and spontaneous frequency of contraction (using other types of substrates) [130, 236]. To the best of our knowledge, this is the first investigation aimed at elucidating the impact of silicone-based substrate properties on the spontaneous activity of NRVM. PDMS has numerous advantages as a material for cell study, including optical clarity, biocompatibility, high tolerance to stretch compared to hydrogels, and possibility to modulate its stiffness to reach physiologically relevant ranges [237]. Control of the final geometry is also possible using a simple molding technique for curing the PDMS. This technical aspect is highly important in tissue engineering to control the seeding area and/or apply patterning to the seeding surface to induce orientation of the cells [201]. Culture of cardiomyocytes on a stiff substrate has been shown to impact their function both for force generation [129, 161, 215] and spontaneous activation [130, 236].

Single [238, 239] and multiarmed reentry [240] can be created by point electrical stimulation or spontaneously arise [241] in cardiac monolayers. In the present study, an increased number of spontaneous reentrant events were observed when cardiomyocytes were cultured on a glass substrate compared to a PDMS substrate. This finding increased the intragroup variability. By removing these reentrant events (Fig. 1), we obtained a smaller intergroup variability of frequencies. Stiffness differences between glass and PDMS substrates do not significantly affect the spontaneous beating frequency (Fig. S2), but seem to affect the incidence of reentrant activities.

Another factor that could impact spontaneous activity of monolayers is cell density [242]. Density influences cardiomyocyte function because cells react to the substrate and also to their neighboring cells through mechanosensitivity [243]. In our study, we tried to limit the impact of cell density by counting living cells before seeding and by plating the same quantity of cells on each substrate. Thus, the significant increase in the number of nuclei found for PDMS 1:20 (Fig. S3) indicates a possibly greater proliferation on this substrate. In cases of initial low density at seeding, increased cell proliferation could lead to stronger intercellular coupling and favor faster spontaneous frequency [242]; however, we did not observe this effect.

Stability of the spontaneous activity

Our study illustrated an increased temporal variability in the interbeat period (σ_{period}) on PDMS 1:20 (Fig. 2). Lower expression of Cx43 tends to uncouple cardiac cells and could highlight the intrinsic rhythm of each cell (pacemaker activity) [224]. Subsequently, the decrease tendency of Cx43 mRNA detected in our study could explain why we observed an increased number of activation sites on PDMS compared to the glass substrate (Fig. 3). Reentry is more likely to occur in excitable tissue that is partially uncoupled [199]. Probability of reentrant activity has been shown to be increased in low to mildly coupled monolayers [54,72]. Here, Cx43 mRNA has the tendency to be lower on PDMS 1:20 compared to glass while the incidence of reentry is increased on glass compared to PDMS. This result indicates that other factors could protect from spontaneous formation of reentry on PDMS. This might be explained by a non-uniform distribution of Cx as highlighted by the change in local activation delay along the trajectory (more importantly for the region close to 2π illustrated in Fig. 1). A non-uniform distribution of Cx can facilitate reentry and non-uniform conduction properties [244]. However, curvature effects can also induce change in conduction velocity [245, 246]. The increase in the number of activation sites on PDMS could possibly be linked to the increased median σ_{period} calculated in PDMS compared to glass (52.6 % for PDMS 1:20 and 21.1 % for PDMS 1:40). These different σ_{period} values are affected by the increased variation between beats, but also by occasional pauses between bursts of faster beats in PDMS 1:20 recordings. These results are in agreement with Ponard *et al.*, who demonstrated that stochastic gating of transmembrane currents and calcium release channels can affect ion channel turnover and thereby induce variability in the spontaneous rate [247]. However, we detected a larger change in spatial position of focal activation than Ponard *et al.*, which we attribute to greater distances (~6 mm) between interacting pacemaker sites compared with smaller distances (1 mm) reported by the authors [247].

Changes in the voltage clock–associated mRNA and effects on spontaneous activity

The voltage clock encompasses membrane currents that play a role in the spontaneous activity of cardiomyocytes, and more importantly, in sinus node cells [40]. Modifications in expression or function of membrane currents could alter the rate of spontaneous activity. In our study, we observed an increased expression of CaV3.1 (I_{CaT}) and HCN2 (I_f) mRNA. Increased expression of Ca²⁺-permeable (T- and L-type) channels and HCN channels including HCN2 [248] could promote automaticity [206, 208, 249, 250]. Although not a significant finding, the tendency towards decreased Kir2.1 expression (Fig. 4) could also favor acceleration of spontaneous activity [251]. However, no significant difference in frequency was detected (Fig. S2). Instead, there was a significant increase in the number of activation sites on PDMS (Fig. 3). One possible explanation is that the global change in mRNA expression could lead to protein changes that do not cause a linear shift in the local intrinsic period of individual spontaneous cells. We perceive monolayers to consist of quiescent and spontaneous cells (with a set of individual frequencies)[224]. Cells with higher frequency are thought to become the drivers of monolayers; however, locally connected strong pacemakers could more easily overcome the source/sink ratio and drive spontaneous activation. Therefore, a decrease in cellular coupling (through Cx43 mRNA) and increase in local spontaneous activity (decreased Kir2.1 and increased HCN2) would favor regionalized depolarization. As such, these results suggest that culture on a PDMS substrate may favor the *appearance* of spontaneous activity in multiple cells and increase the number of regions that can depolarize and generate a propagating response.

Response of different substrates to sympathetic and parasympathetic stimulation

Vagal nerve stimulation slows heart rate, predominantly by the action of the vagal neurotransmitter, acetylcholine, at muscarinic receptors. The binding leads to the dissociation of G proteins and activation of the potassium current, $I_{K,ACh}$ [252]. In our study, ACh (1 μ M)

significantly decreased the rate of spontaneous activity of monolayers in all groups, with the greatest decrease on PDMS 1:20 compared to the glass substrate (Fig. 5B) and the greatest instability on PDMS (Fig. 5D, higher number of time points with significant increase in σ_{period} compared to pre-ACh data). Increased instability is a known hallmark of ACh-induced slowing effects [253]. Interestingly, instability was more rapid on glass and PDMS 1:40, while its effect was more gradual on PDMS 1:20. Increased σ_{period} was only visible after 5 minutes on PDMS 1:20. The mRNA levels for both Kir3.1 and Kir3.4 (Figure S4D and Figure S4F), coding for ACh-activated K⁺ channels, were not significantly different but showed a tendency towards a slight increase on PDMS. At early developmental stages, $I_{K,ACh}$ is known to be primarily formed by Kir3.1, while in late embryonic and adult cells, Kir3.4 is the predominant subunit [254]. Here, the change in culture substrate did not induce variation in the ratio of Kir3.4/ Kir3.1, indicating that there was no modification in the rectification properties of $I_{K,ACh}$ and therefore function between substrates.

It has recently been shown that substrate stiffness can regulate cellular responses to β -adrenergic receptor agonist (ISO) in human mesenchymal stem cells [255]. It was unknown whether ISO could exert different effects on cardiomyocytes cultured on PDMS. Interestingly, cardiomyocytes cultured on PDMS (1:20) exhibited the greatest increase in frequency of spontaneous activity by 100 nM ISO (relative to pre-drug at t=0). More precisely, the effect lasted significantly longer on PDMS 1:20 compared to culturing on glass. ISO significantly reduced σ_{period} on the PDMS 1:20 substrate (Fig. 5C), which confirms that instabilities are greater for slower activity [253]. However, we found that decrease in instability is also associated with a diminution in the number of activation sites (Fig. 6 and Fig. S5). This result is in agreement with a previous study that claims the positive inotropic effect of ISO is associated with a decrease in the relative value of the potentiating effect of the pause (instability) [256].

We hypothesized that expression of beta-1 adrenergic receptor (AdrB1) could be altered by the culture substrate; however, no significant change at the mRNA level was found. It remains to be determined if post-transcriptional regulation process including a change in internalization rate of the receptor [255] could be responsible for the differences. The

increased duration of the effect of ISO stimulation may be a consequence of the substrate on phosphodiesterase action. cAMP plays a central role in regulating metabolic and cellular processes through protein kinase A (PKA). Phosphodiesterases are directly involved in the degradation of cAMP controlling the duration and intensity of the response in cAMP signaling [257] and has an impact on sinoatrial node activation frequency [258].

Conclusion

This study is part of the greater project aimed at the development of a system to evaluate the effects of stretch on cardiomyocytes. To apply deformation, a flexible substrate is needed. Due to the brittle characteristics of currently available hydrogels, we opted for the use of a deformable silicone-based substrate to approach *in vivo* tissue stiffness. According to our results, selecting the appropriate material for the substrate is highly important since it will affect the *in vitro* spontaneous activity via ionic channel expression modulation. Our study also presents evidence that the substrate mechanical properties (stiffness) can influence the sensitivity to sympathetic (ISO) and parasympathetic (ACh) stimulation, and act as a stabilizer for the propagation of activation through even non-significant changes in Cx43 mRNA. Our results indicate that PDMS 1:20 would be a better choice of substrate for studies who aim to apply mechanical stimulation amongst the tested substrate in our study. These results reveal the importance of carefully selecting the culture substrate involving mechanical stimulation, especially for tissue engineering investigations or pharmacological high-throughput screenings of cardiac tissue analog.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge Louis Villeneuve for his assistance with confocal imaging acquisition, Patrice Naud for helping with the qPCR procedure and the anonymous reviewers for the constructive evaluation.

Figures and figure captions

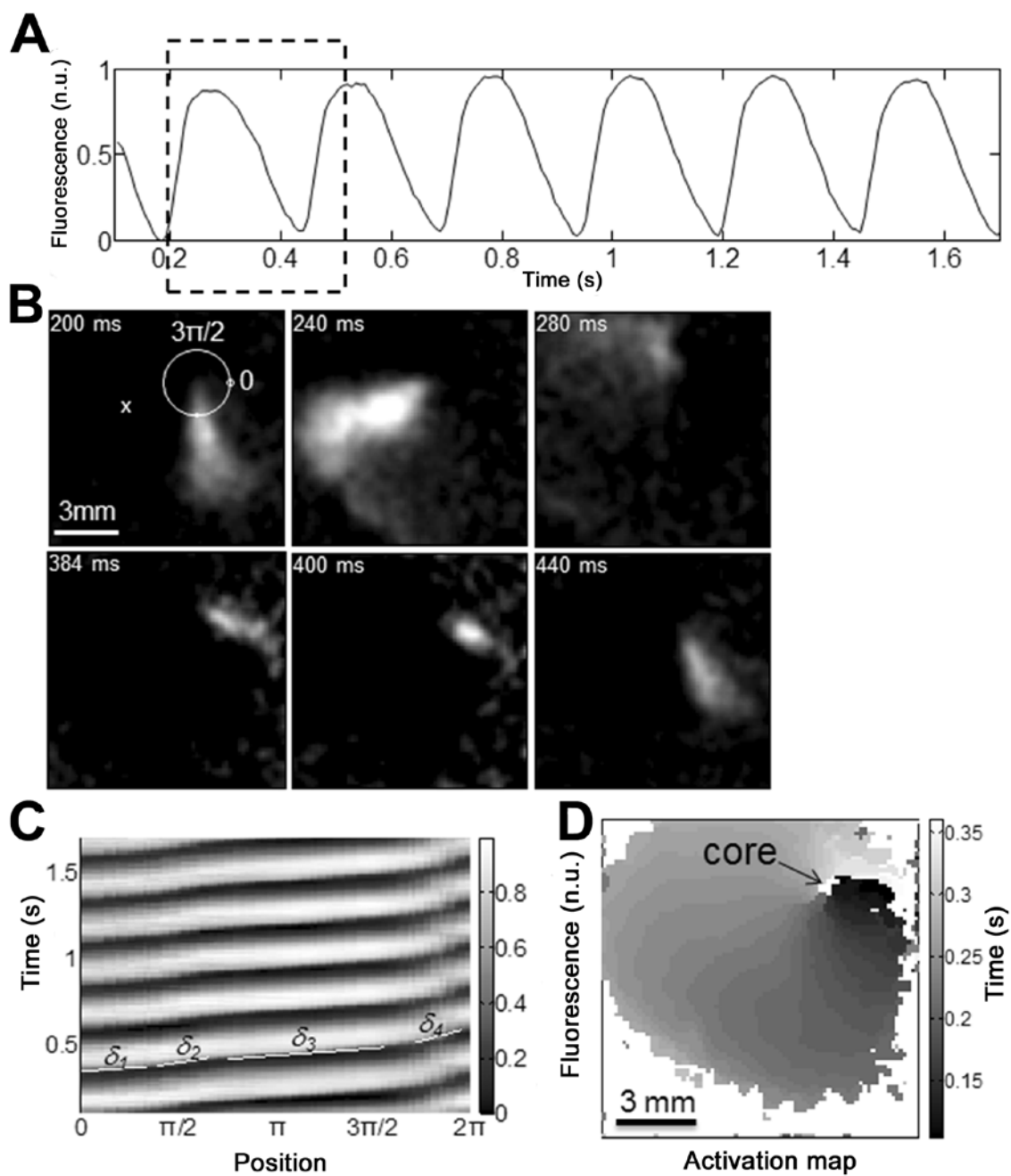


Fig. 1 – Spontaneous frequency on glass vs. PDMS substrates

Example of one spontaneous reentry as observed on glass substrate. **A.** Normalized calcium transients over time obtained from the pixel marked by a white \times in panel **B.** **B.** Snapshots of the dF/dt over 1 rotation of reentry with time stamps indicated at the top left of each panel.

The white circle in the top left snapshot at 200 ms illustrates a trajectory around the reentry core (scale bar is 3 mm) used for the time/phase plot depicted in panel C. The period of activity in this example was highly stable around 255 ms. **C.** Propagation along the trajectory depicted as a white circle in panel B shows periodic activity. However, it is clear that the activation delay δ ($\delta = \text{slope}$) is not constant with large regions of rapid velocity along the trajectory from $3\pi/4$ to $3\pi/2$, while the region close to 2π illustrates a slow conduction area. The local activation delay was not uniform along the reentrant trajectory and changed from $\delta_1 = 0.15$ second/cm to $\delta_2 = 0.4$ second/cm, $\delta_3 = 0.18$ second/cm, and finally $\delta_4 = 0.66$ second/cm. **D.** Activation map obtained for the time interval between 0.1 and 0.35 second of reentrant activity. The maps shows a central core of $\sim 0.31 \text{ mm}^2$ (indicated by the arrow) and highlights the slow region of the pathway of reentry (time near 0.1 to 0.15 second on the top right of the map).

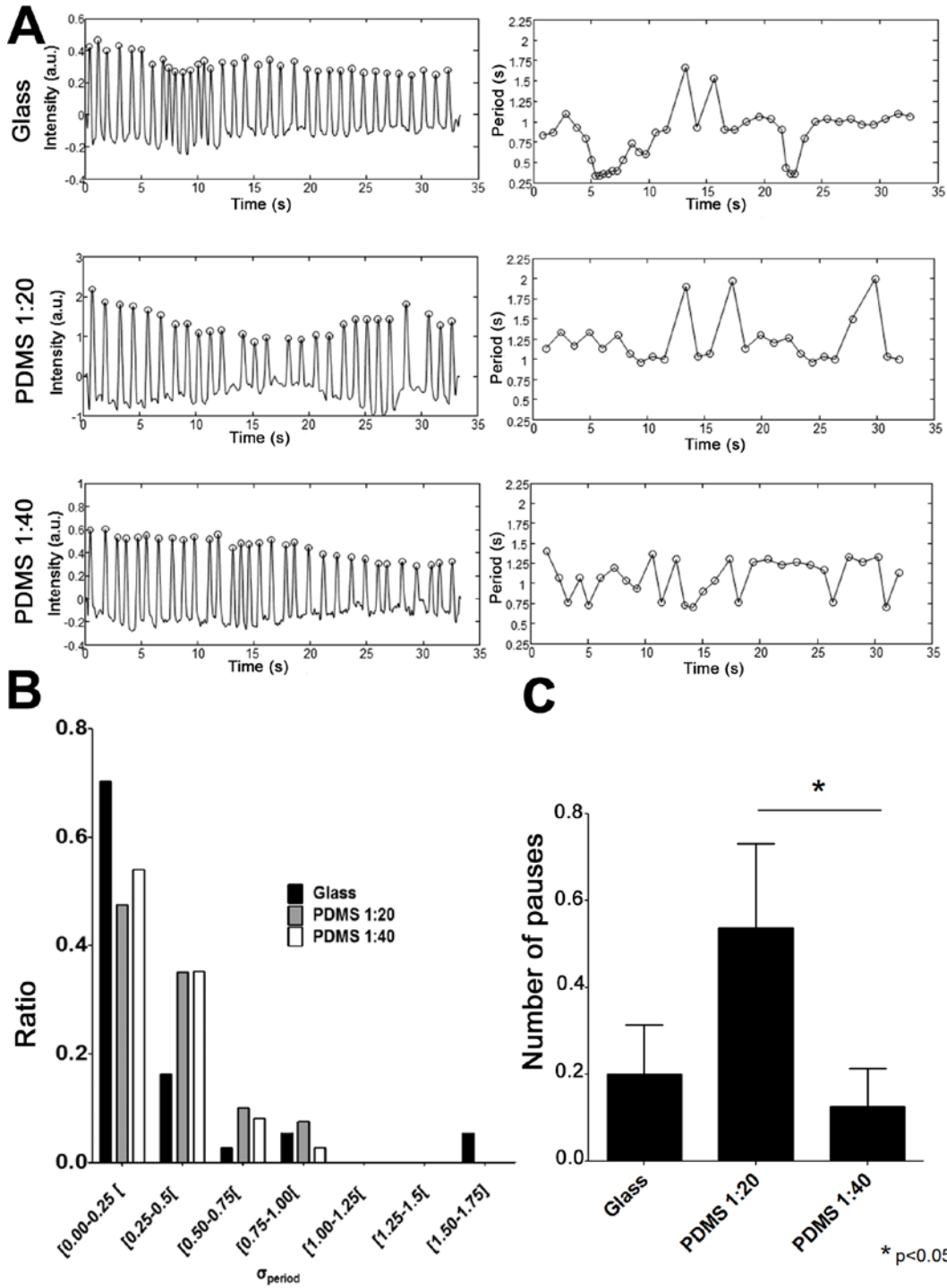


Fig. 2 – Temporal variation in the period of activity

A. Left panel shows a sample signal of spontaneous activity obtained by videomicroscopy and right panel shows the calculated interbeat period. The standard deviation of the temporal distribution of activation period (σ_{period}) was calculated as an estimate of temporal variability.

B. Histogram of σ_{period} obtained for the glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40 groups. The median of the σ_{period} calculated for each group is: 0.19 second (glass), 0.29 second (PDMS 1:20), and 0.23 second (PDMS 1:40); $n=44$ (number of samples), $N=11$ (number of litters).

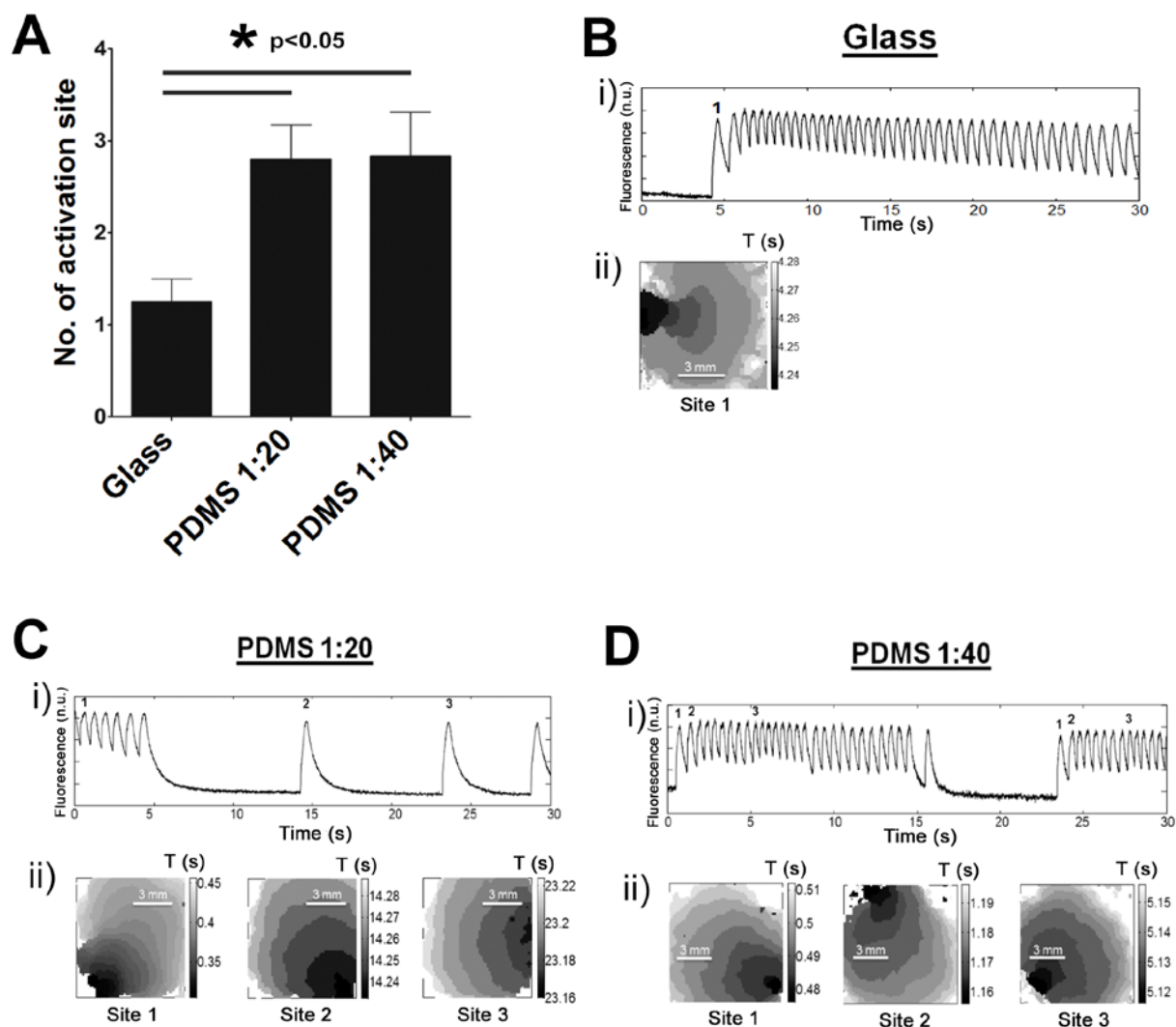


Fig. 3 – Increased number of initiation sites on PDMS substrate

The mean number of activation sites for cardiomyocyte monolayers cultivated on glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40 were 1.3 ± 0.3 , 2.8 ± 0.4 , and 2.8 ± 0.5 sites, respectively (A). The mean number of activation sites is significantly higher on PDMS compared to glass ($p < 0.05$; $N = 11$). Examples of activation patterns on different substrates. i) A trace of calcium transients of the spontaneous activity is shown with ii) activation maps of the first beat for each different activation site for glass (B), PDMS 1:20 (C), and PDMS 1:40 substrates (D). Sites are labeled

with a number on top of the calcium transient. The corresponding site number is indicated at the time it starts to drive the monolayer (calcium transients without corresponding numbers originated from the same initiation site as the previous one). In these examples, 1 initiation site was observed on glass compared to 3 sites for both PDMS substrates.

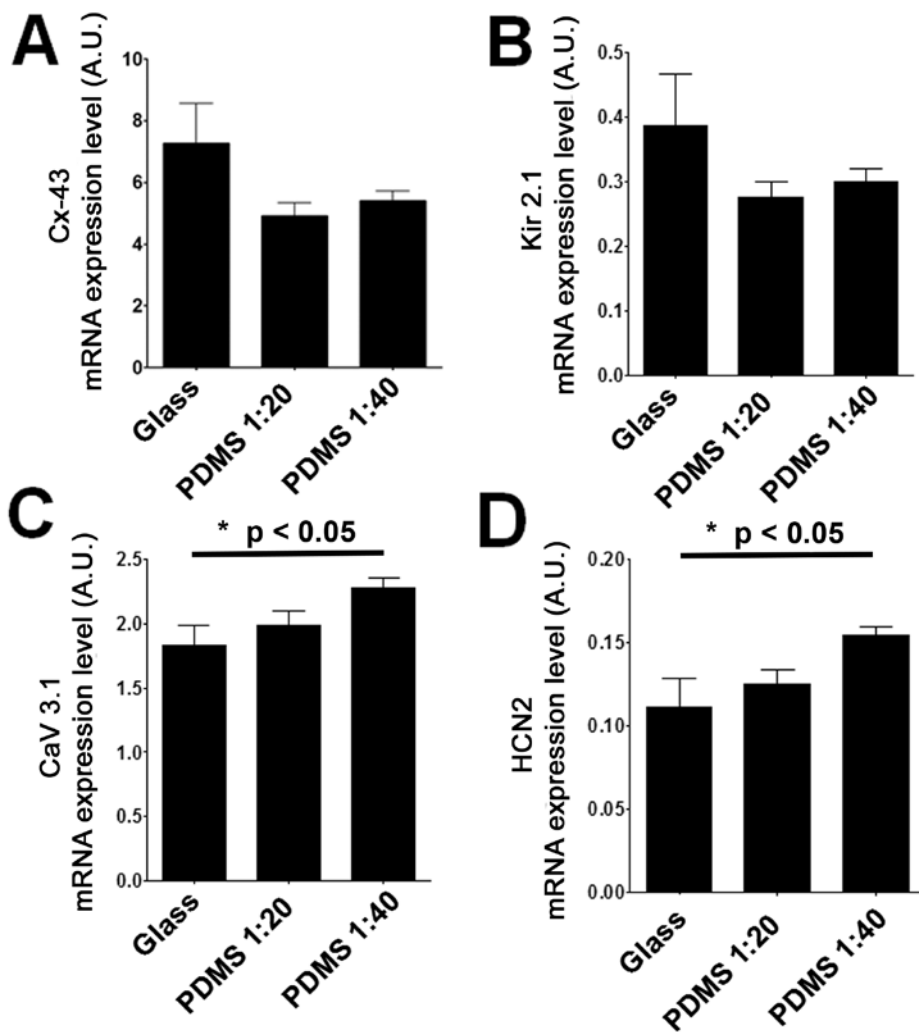


Fig. 4 – Role of the proteins expression on spontaneous activity

A. Cx43 mRNA expression was 6.24 ± 0.89 , 4.55 ± 0.27 and 5.70 ± 0.12 . According to our results, Cx43 mRNA expression has a tendency to be lower on PDMS substrates compared to glass, however, significant differences was detected between PDMS 1:20 and PDMS 1:40.

B-D. mRNA expression of targeted proteins playing a role on automaticity through the voltage clock could explain the small changes observed in rhythm. Kir2.1 (**B**) mRNA expression tends

to be lowered when cardiomyocytes are cultivated on PDMS compared to glass. There is a tendency towards increased expression of CaV3.1 (C) and HCN2 (D) on PDMS compared to glass ($p < 0.05$, between glass and PDMS 1:40).

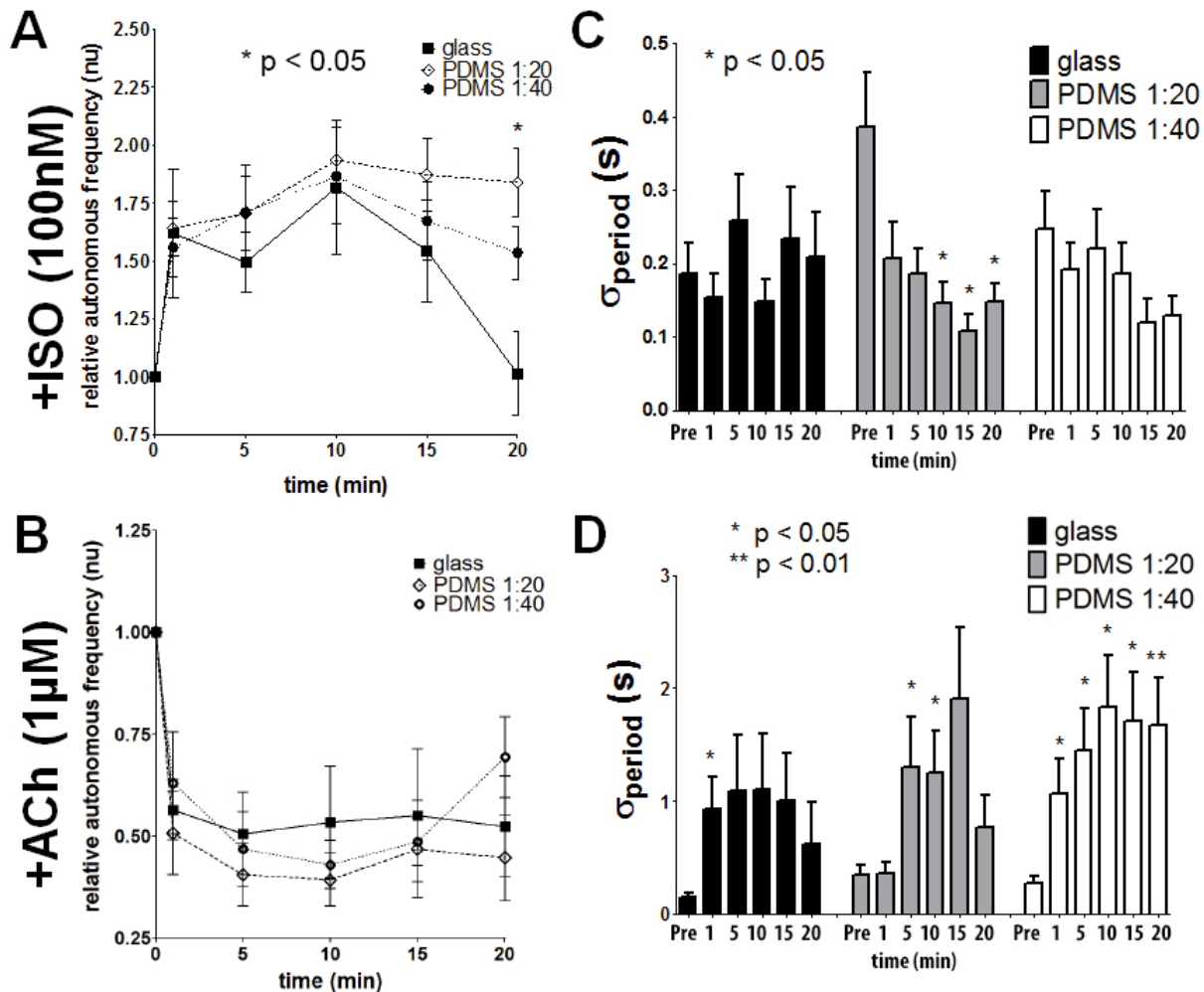


Fig. 5 – Effects of parasympathetic and sympathetic stimulation on the rate of spontaneous activity

Relative spontaneous frequency was obtained by videomicroscopy and calculated by taking spontaneous frequency recorded at t=1, 5, 10, 15, and 20 minute(s) and by dividing that value by the spontaneous frequency prior to the addition of the drug (pre-drug at t=0). **A.** Sympathetic stimulation by addition of 100 nM of ISO. The rates of contraction at t=1 minute after the addition of ISO were 1.62±0.28 Hz (glass), 1.64±0.12 Hz (PDMS 1:20), and 1.56±0.13 Hz (PDMS 1:40); consequently, no significant differences were observed at t=1 minute between the groups ($p=0.53$). However, the rates of contraction at t=20 minutes after

the addition of ISO were 1.14 ± 0.15 Hz (glass), 1.84 ± 0.15 Hz (PDMS 1:20), and 1.54 ± 0.11 Hz (PDMS 1:40). Statistical analysis showed significant differences at $t=20$ minutes between the groups ($p < 0.01$). **B.** Effects of parasympathetic stimulation by addition of $1 \mu\text{M}$ of ACh. The rates of contraction at $t=1$ minute after the addition of ACh were 0.56 ± 0.07 Hz (glass), 0.51 ± 0.10 Hz (PDMS 1:20), and 0.63 ± 0.12 Hz (PDMS 1:40); consequently, no significant differences were observed at $t=1$ minute between the groups ($p=0.700$). The rates of contraction at $t=20$ minutes after the addition of ACh were 0.52 ± 0.12 Hz (glass), 0.45 ± 0.11 Hz (PDMS 1:20), and 0.69 ± 0.10 Hz (PDMS 1:40); no significant differences were observed at $t=20$ minutes between the groups ($p=0.33$). **C.** No changes in σ_{period} were observed with time for cardiomyocytes cultivated on glass after the addition of ISO. The σ_{period} for cardiomyocytes cultivated on PDMS 1:20 was decreased significantly 10, 15, and 20 minutes after the addition of ISO ($p < 0.05$, Mann-Whitney comparison test). There was a tendency towards a decreased σ_{period} for cardiomyocytes cultivated on PDMS 1:40 in the presence of ISO. **D.** A significant increase in σ_{period} at $t=1$ minute ($p < 0.05$, Mann-Whitney comparison test) was observed for cardiomyocytes cultivated on glass after the addition of ACh. No significant change was observed for the remaining measurements ($t=5, 10, 15,$ and 20 minutes). The σ_{period} for cardiomyocytes cultivated on PDMS 1:20 only increased significantly at $t=10$ and 15 minutes after the addition of ISO ($p < 0.05$, Mann-Whitney comparison test). A significant increase in σ_{period} was observed for PDMS 1:40 at $t=1, 5, 10, 15,$ and 20 minutes ($p < 0.05$, Mann-Whitney comparison test).

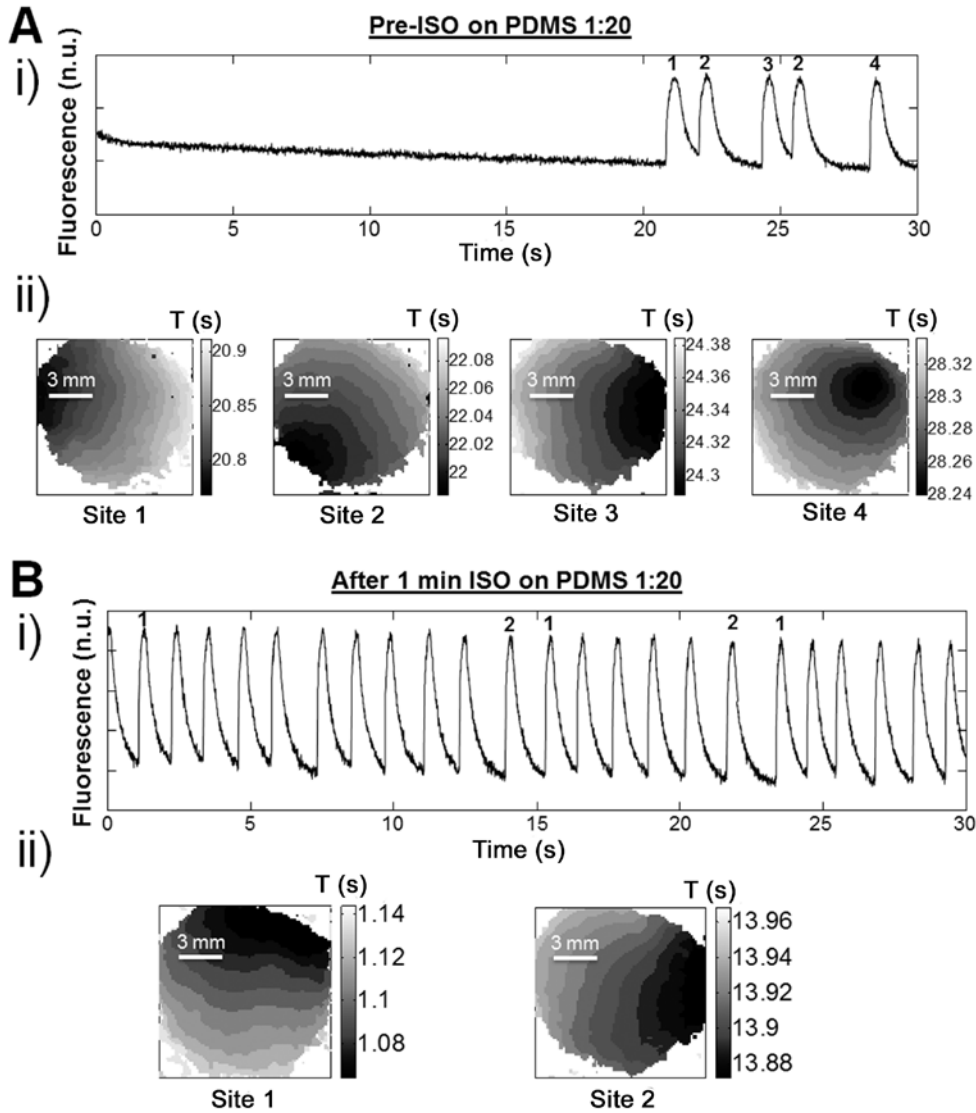


Fig. 6 – ISO decreases σ_{period} for cardiomyocytes cultivated on PDMS 1:20 and tends to stabilize the rate of contraction

Examples of cardiomyocyte activity stabilization by the addition of isoproterenol. i) A trace of the contractile activity is shown with ii) activation maps of the first beat for each different activation site. **A.** Conditions before the addition of isoproterenol (Pre-ISO) on PDMS 1:20. **B.** One minute after adding ISO (100 nM) on PDMS 1:20 substrates. Pharmacological sympathetic stimulation appears to decrease the number of activation sites (from 4 sites pre-ISO to 2 sites after ISO).

Supporting information legends

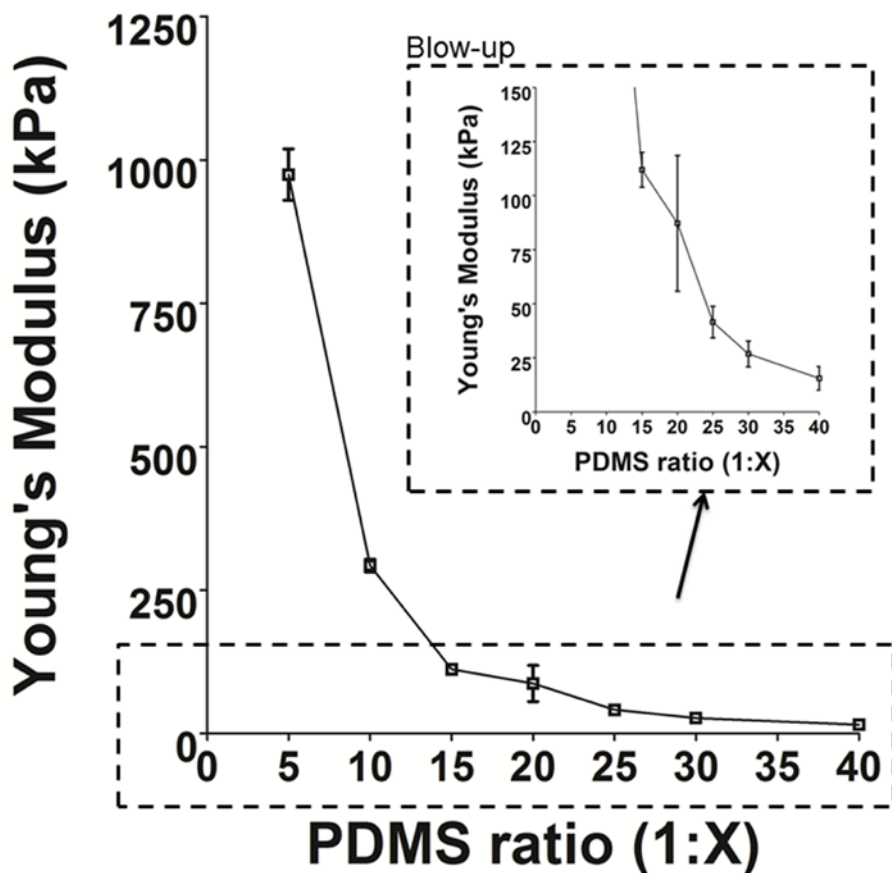


Fig. S1. Stiffness of PDMS with different ratios of curing:base agents

To determine Young's modulus, the PDMS substrate was molded in a cylindrical mold with defined width and length. Molds were cured at 37 °C for 48 hours. Young's modulus was calculated as the slope of the stress/strain curve that was created using a set of weights ranging from 10 to 150 g (except for PDMS 1:40 where the maximum weight was 30 g). Attempts were made to remain within the limits of linear elasticity. PDMS was mixed in ratios of 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, and 1:40 to produce substrates with mean moduli of 974±32 kPa, 293±8 kPa, 112±6 kPa, 87±22 kPa, 42±6 kPa, 27±4 kPa, and 16±4 kPa, respectively. Inset: low modulus values for large-mixed ratios.

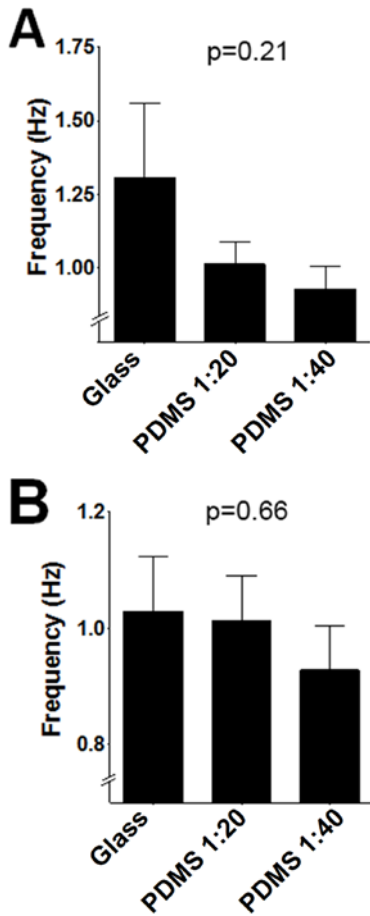


Fig. S2. Rate of spontaneous activity of cardiomyocytes after 48 hours culture

Mean spontaneous activity of cardiomyocytes after 48 hours culture was 1.34 ± 0.25 Hz (glass), 1.0 ± 0.08 Hz (PDMS 1:20), and 0.93 ± 0.08 Hz (PDMS 1:40); $n=11$. The rate of spontaneous activity tends to decrease when cardiomyocytes are cultivated on PDMS with a greater effect on softer substrates ($p=NS$). The large error bar for the mean spontaneous frequency measured on glass can be explained by a group of data with high-frequency rate that match the rate of reentry imaged in the calcium mapping experiments (**Figure A**). After removing the data with frequency greater than 3 Hz assumed to be reentrant activity, mean spontaneous activity measured by videomicroscopy on glass is 1.03 ± 0.09 Hz (glass), 1.01 ± 0.08 Hz (PDMS 1:20) and 0.93 ± 0.08 Hz (PDMS 1:40) (**Figure B**).

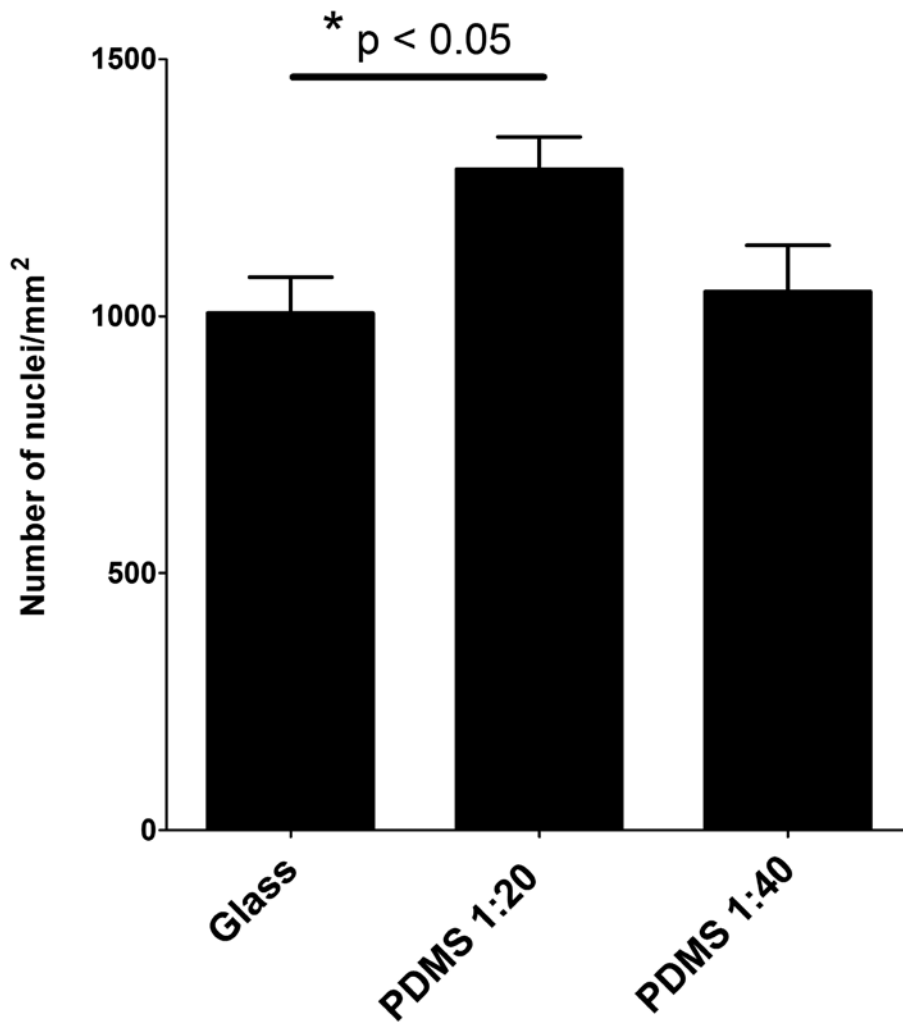


Fig. S3. Number of nuclei

Confocal imaging of neonatal rat cardiomyocytes was performed to determine the number of nuclei in monolayers cultured on different substrates. There was a significant increase in the number of nuclei on the PDMS 1:20 substrate compared to glass and PDMS 1:40 ($p=0.04$).

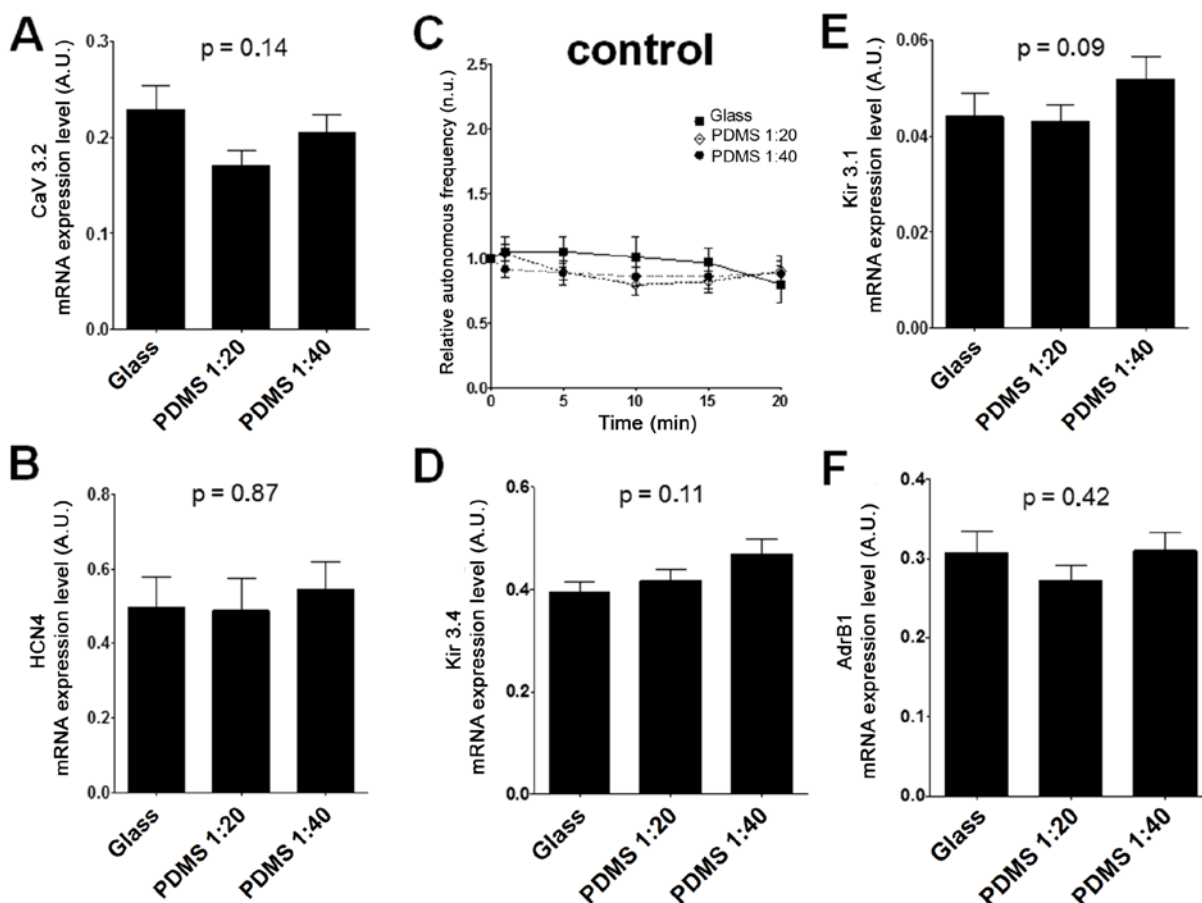


Fig. S4. Role of the proteins expression on spontaneous activity

CaV3.2 mRNA expression appears to be lowered when cardiomyocytes were cultivated on PDMS compared to glass (p=NS) (**Figure A**). No change in HCN4 mRNA expression was observed when cardiomyocytes were cultivated on PDMS compared to glass (p=NS) (**Figure B**). Control data (no drug) of spontaneous rate of contraction showing no appreciable differences over time (**Figure C**). No significant changes were observed in mRNA expression of proteins related to parasympathetic ($I_{K,ACh}$, Kir 3.4 (**Figure D**), and Kir3.1 (**Figure E**)) or to sympathetic (β_1 adrenergic receptors (**Figure F**)) stimulation.

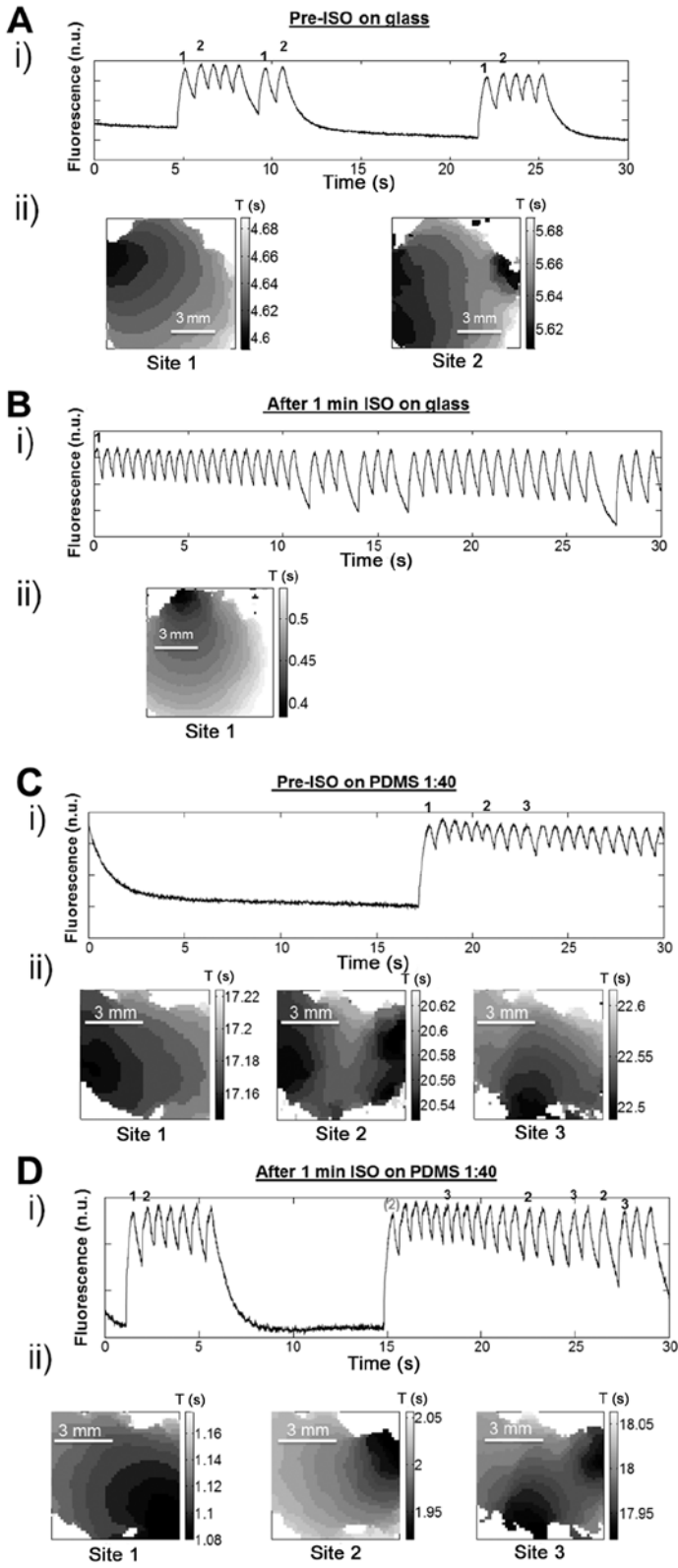


Fig. S5. Effect of ISO on the σ_{period} in monolayer of cardiomyocytes

Conditions before the addition of isoproterenol (Pre-ISO) on glass (**Figure A**). On glass substrates, pharmacological sympathetic stimulation with ISO (100 nM) tends to decrease the number of activation sites after 1 minute (from 2 sites pre-ISO to 1 site after ISO) (**Figure B**). Conditions before the addition of isoproterenol (Pre-ISO) on PDMS 1:40 (**Figure C**). On PDMS 1:40 substrates, pharmacological sympathetic stimulation with ISO (100 nM) did not change the number of activation sites after 1 minute (3 sites for both pre-ISO and post-ISO) (**Figure D**).

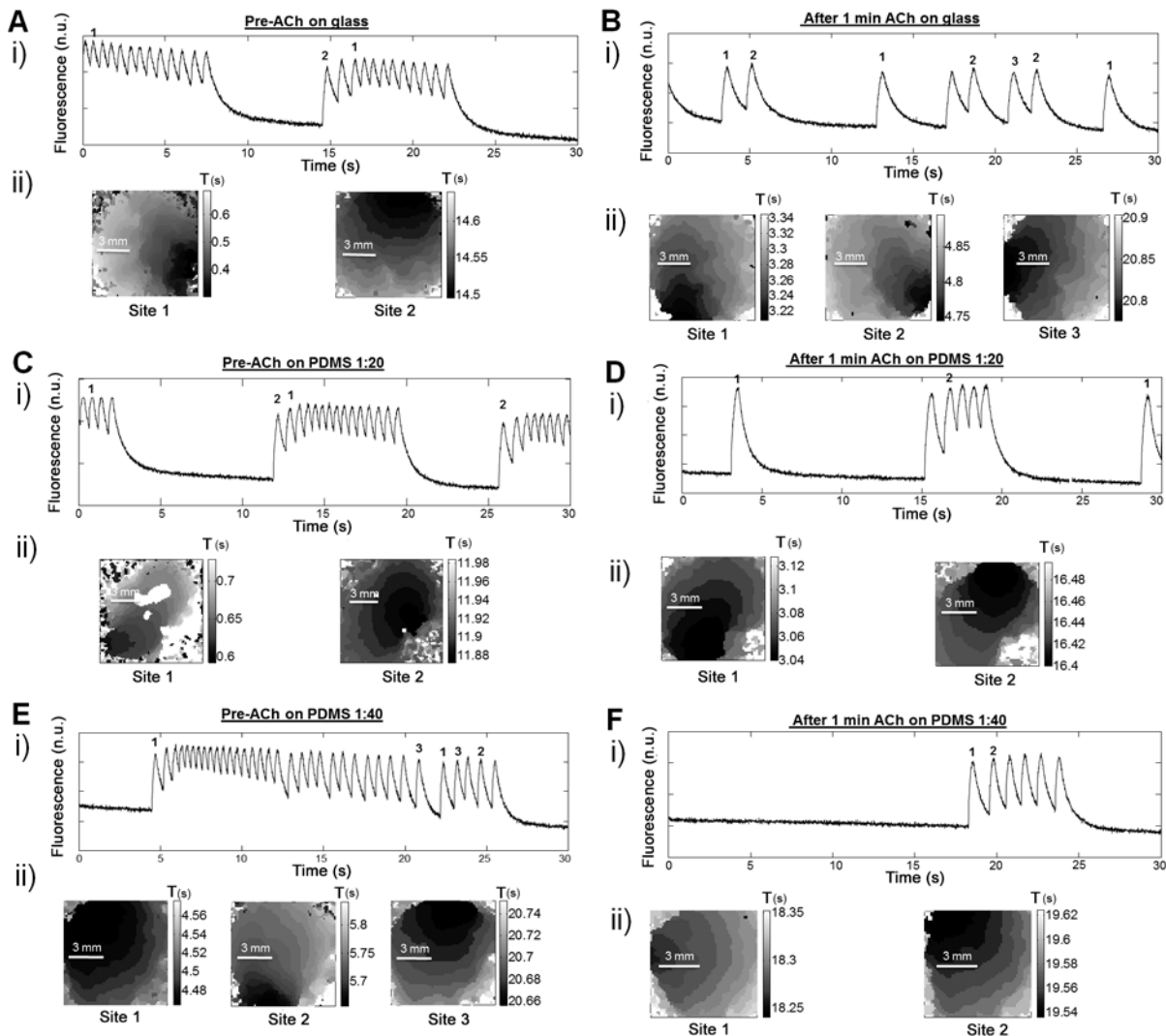


Fig. S6. Effect of ACh on σ_{period} in cardiomyocyte monolayers

Addition of acetylcholine (ACh) to cardiomyocyte monolayers. i) A trace of contractile activity is shown with ii) activation maps of the first beat for each different activation site.

Conditions before the addition of ACh (Pre-ACh) on glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40, respectively (**Figure A, C and E**). On glass substrates, pharmacological parasympathetic stimulation with ACh (1 μ M) tends to increase the number of activation sites after 1 minute (from 2 sites pre-ACh to 3 sites after ACh) (**Figure B**). On PDMS 1:20 substrates, ACh (1 μ M) stabilized the number of activation sites after 1 minute (2 sites for both after ACh and pre-ACh) (**Figure D**). On PDMS 1:40 substrates, ACh (1 μ M) tends to decrease the number of activation sites after 1 minute (from 3 sites pre-ACh to 2 sites after ACh) (**Figure F**).

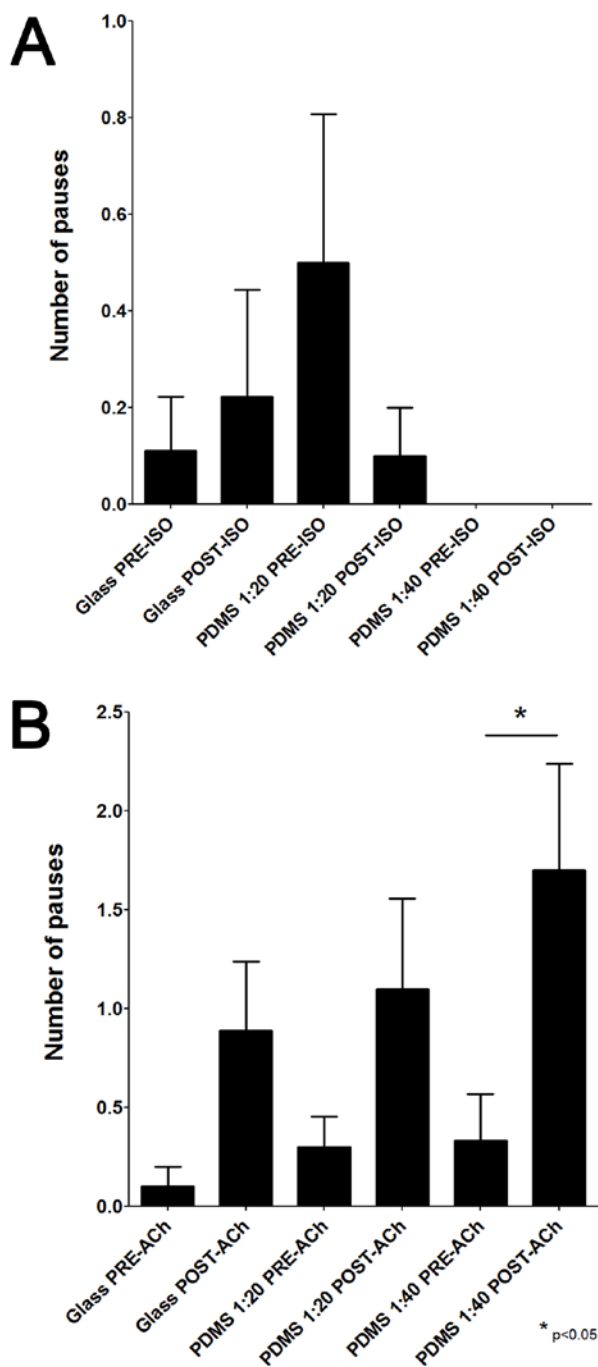


Fig. S7. Number of pauses: influence of the parasympathetic and sympathetic stimulation

The number of pauses over 3 seconds was evaluated. Before and after the addition of ISO (Figure A). Before and after the addition of ACh. Pre-drug and post-drug (at t=1 minute)

differences for each substrate (glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40) were compared with a Wilcoxon matched-pairs test (**Figure B**).

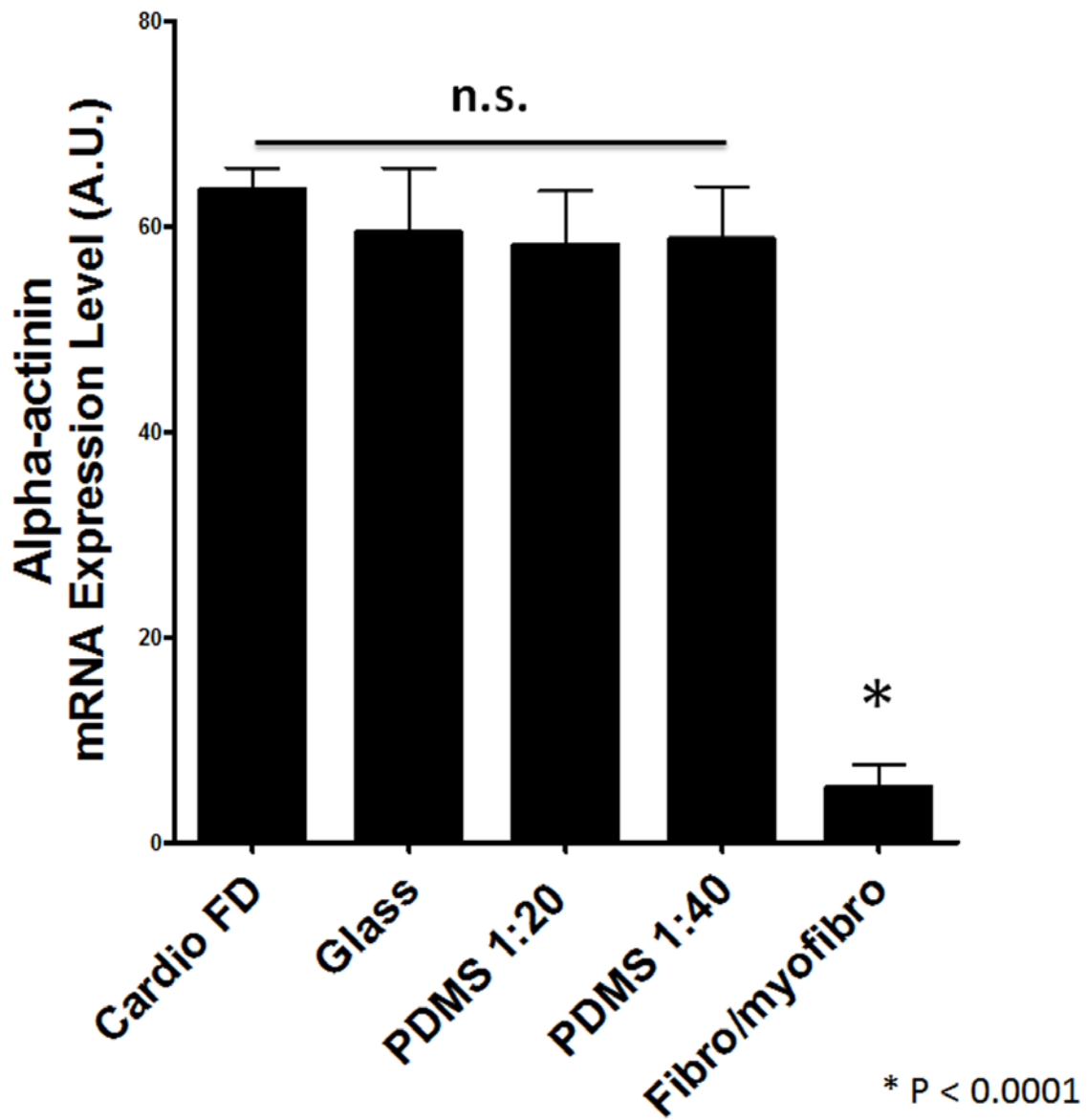


Fig. S8. Comparison of alpha-actinin mRNA expression
n.s. indicates that the difference is non-significant.

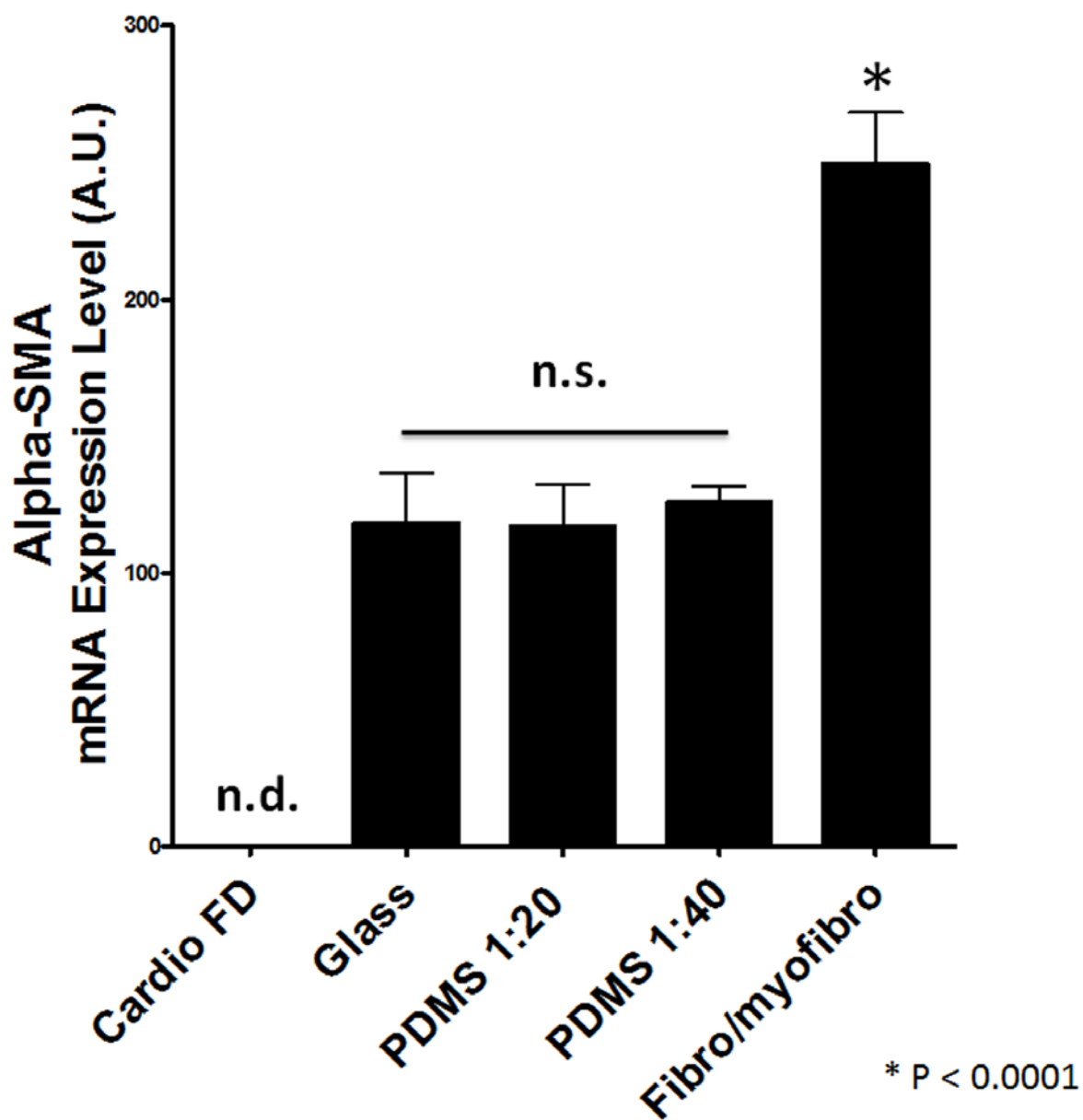


Fig. S9. Comparison of alpha-SMA mRNA expression

n.d. indicates that the sample level was under detection limits and n.s. indicates that the difference is non-significant.

Cardio FD : portion enrichie de cardiomyocytes fraîchement dissociés, Fibro/myofibro : portion enrichie en fibroblastes et myofibroblastes

Appendix S1. Young's modulus equation.

$$E = \frac{\text{tensile stress}}{\text{tensile strain}} = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/A_0}{\Delta L/L_0} = \frac{FL_0}{A_0\Delta L} \quad (\text{B.1})$$

Where:

E is Young's modulus (modulus of elasticity);

F is the force exerted on an object under tension;

A_0 is the original cross-sectional area through which the force is applied;

ΔL is the amount by which the length of the object changes;

L_0 is the original length of the object.

Appendix S2. Additional methodology for myofibroblast population evaluation.

qPCR was performed as described in the Materials and Methods section with slight modification as the use of a new qPCR system for analysis (StepOnePlus Real-Time PCR System, *Life Technologies*). The geometric mean of the expressions of HPRT was used for normalization. New data were also analyzed with StepOne software v2.3.

Alpha-actinin gene expression was used as a positive control for the cardiomyocyte population (primer sequences: Forward GAGACGGCAGCTAACAGGAT and Reverse CTTGCATGGTCTTCTCCGGT). To evaluate the presence and possible impact of fibroblast/myofibroblast in primary culture experiments, expression levels of alpha smooth muscle actin (alpha-SMA) were evaluated by qPCR (primer sequences: Forward AGCATCCGACCTTGCTAACG and Reverse CACGAAGGAATAGCCACGCT).

A total of 5 groups were tested, which includes the 3 substrates (glass, PDMS 1:20, and PDMS 1:40), and conditions are described in the Materials and Methods section. Freshly dissociated cardiomyocytes (Cardio FD group) that have not been cultured ($t=0$, after isolation procedures) were added. Cells maintained in culture for 5 days were also isolated, with 1 passage at day 2 to remove the majority of cardiomyocytes and retain an enriched fibroblast/myofibroblast population (Fibro/Myofibro group).

Table S1. Primer sequences.

rAdrb1 Forward
GATCTGGTCATGGGACTGCT
rAdrb1 Reverse
CGTCTACCGAAGTCCAGAGC

rHCN4 Forward
GCTTCACGAAGATCCTCAGC
rHCN4 Reverse
ATGCCAATGAGGTTACGAT

rKir2.1 Forward
ACCGCTACAGCATCGTCTCT
rKir2.1 Reverse
GCGAGGCAGAAGATTACCAG

rKir3.1 Forward
AGTTCGAGGTGGTCGTCATC
rKir3.1 Reverse
AAAAACGATGACCCCAAAGA

rKir3.4 Forward
GAAGTTAGCCCAAGGGTTC
rKir3.4 Reverse
AGCCTGTTTGGGGATCTTCT

rCx43 Forward
CCTTTGACTTCAGCCTCCAA
rCx43 Reverse
CTTGGACCTTGTCCAGAAGC

rHCN2 1 Forward
CAATGGGAGGAGATTTTCCA
rHCN2 1 Reverse
AGTCGCTGGGGAAGTCTTG

rCav1.2 1 Forward
TCTGCTCTGCCTGACTCTGA
rCav1.2 1 Reverse
CACACAATTGGCAAAAATCG

rCav3.1 Forward
GACCTGCAGAACGTCAGCTT
rCav3.1 Reverse
AGCATAGGCAAGGTGTCCAG

Development of a bioreactor for optimized cardiac cell culture integrating flexible mechanical and electrical stimulations

J'ai participé à l'élaboration du plan de l'étude, le développement de la méthodologie et du système (bioréacteur), la conception numérique des composantes en 3D et l'usinage et l'assemblage des composantes du bioréacteur, la réalisation des expériences de culture cellulaire, la capture des données expérimentales, l'analyse et le traitement des résultats et finalement, la rédaction de l'article.

La participation des co-auteurs :

James Elber Duverger : Doctorant ayant participé à la conception des composantes du bioréacteur, au design expérimental, à l'analyse des résultats et à la révision de l'article.

Estelle Petitjean : Stagiaire d'été ayant participé à l'acquisition des données de vidéomicroscopie et à l'analyse des résultats de cette portion des résultats.

Ange Maguy : Collègue à l'ICM ayant participé à la conception et l'optimisation des études, à l'analyse des résultats et à la révision de l'article.

Louis Villeneuve : Employé de l'ICM ayant participé à l'acquisition des données par microscopie confocale.

Jonathan Ledoux : Collègue à l'ICM ayant participé à la conception et l'optimisation des études, à l'analyse des résultats et à la révision de l'article.

Philippe Comtois : Directeur de recherche ayant supervisé le projet et qui m'a grandement guidé à travers les différentes étapes du projet. En outre, par sa participation au niveau de la conception de l'étude, de la conception des outils et algorithmes d'analyse (codes Matlab) pour l'analyse des résultats et de sa critique des travaux et finalement pour sa participation à la rédaction de l'article.

Development of a bioreactor for optimized cardiac cell culture integrating flexible mechanical and electrical stimulations

Jonathan Béland^{1,2}, James-Elber Duverger^{1,3}, Estelle Petit-Jean¹, Ange Maguy¹, Jonathan Ledoux^{1,2}, Philippe Comtois^{1,2,3}(*)

¹ Research Centre , Montreal Heart Institute , Montreal, H1T 1C8, Canada

² Department of Molecular and Integrative Physiology, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, Canada

³ Institute of Biomedical Engineering, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, Canada

*** Corresponding author:**

Philippe Comtois, PhD

Research Centre, Montreal Heart Institute

There is no potential conflict of interest to disclose.

This work was supported by the Montreal Heart Institute foundation, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and by the Réseau ThéCell du Fonds de recherche du Québec –Santé (FRQS).

Résumé

Dû à une population de plus en plus vieillissante et un manque de donneurs d'organes, il y a un énorme besoin pour la création de tissu de remplacement sur demande. Un nouveau bioréacteur capable d'appliquer une stimulation électrique simultanément avec un étirement statique ou cyclique est présenté. L'étirement est appliqué à des cellules via une membrane en élastomère spécialement conçu avec une région centrale d'ensemencement. L'intérêt principal de notre approche est le contrôle précis des caractéristiques des simulations en ce qui concerne le rythme (timing) et l'amplitude dans une conception simple basée sur des parties imprimables ou des composants commerciales faciles à trouver et abordables. Nous avons développé un moule pour fabriquer nos membranes pour la culture cellulaire. Nous utilisons des moteurs à pas linéaire pour induire un étirement mécanique uniaxial et des électrodes de carbone positionnées parallèlement au champ d'étirement. Notre système a été validé par des expériences mesurant la capture du signal électrique par les cardiomyocytes de rats néonataux et par la vidéomicroscopie qui a permis de mesurer l'étirement cellulaire. Finalement, notre approche permet l'optimisation d'un feuillet de cardiomyocytes grâce au contrôle précis des composants de son environnement et ouvre la voie à des protocoles plus complexes pour des stimulations électriques et mécaniques qui sont connues pour être des régulateurs importants du phénotype cardiaque. Notre système propose une approche qui permet des études toxicologiques ou de développement de médicaments beaucoup plus efficaces, en plus d'être moins onéreuses et en fournissant un modèle plus représentatif des conditions *in vivo*.

Abstract

With the growing of aging population and the lack of available organ donors, there is a need for engineered tissues that would need to be cultured on demand. A new bioreactor capable of applying electrical field stimulation in conjunction with static or cyclic stretch is presented. Stretch is applied to cells by a specially-designed elastomeric membrane with a central seeding region. The main interest of our approach is the fine control of the characteristics of the stimulations in regards to timing and amplitude in a simple design based on affordable, easy to find components and 3D printable parts. We have developed a mold to create our

flexible substrate for cell culture. We use linear motors to induce a mechanical uniaxial stretch and carbon electrodes positioned parallel to the stretching field to induce electrical stimulation. Our system was validated by experiments measuring the capture of the electrical pulse by the neonatal rat cardiomyocytes and with videomicroscopy that allowed measuring the cellular stretch. As is, our approach optimize cardiomyocytes patches in culture by controlling the component of the environment and opens the way to more complex protocols for electrical and/or mechanical stimulations which are known important regulators of cardiac phenotypes. Our system offers an approach to toxicological studies or the development of more effective drugs, in addition to being less expensive and providing a more representative model of the *in vivo* conditions.

Introduction

Even after huge improvement in prevention and therapies which lead to mortality rates decline significantly since 1980 [259], cardiovascular disease remains the leading cause of death with a large part of these deaths due to ischemic heart disease. Although great developments have been done, there is a need for novel and individualized therapeutic strategies, e.g. disease-specific or patient-specific drugs, and cardiac tissues for regenerative medicine. To be able to produce an optimal cardiac replacement tissue, we need to understand the link between the engineered tissue physiology and the environment in which it is created. From a physiological point of view, the heart is an organ that pumps the blood and allows its circulation throughout the entire vascular system of the body. These functions are assured by a precise combination of electrical and mechanical activation of the cardiac cells. These cells are under the constant influence of diverse stimuli necessitating permanent adaptation to the constraints of their environment. Recent advances in the fields of stem cell biology [260, 261] and cardiac tissue engineering [115, 262] have led to engineered human cardiac tissues getting closer to non-engineered real tissue. These tissues have shown potentials to be used as physiological study tools and drug testing platforms [263]. However, to enable adequate usage of these tissues for discovery, cardiac tissues developed *in vitro* need to be of the desired normal/disease phenotypes.

There is strong evidence in the literature that cardiac cells *in vitro* need to grow in a controlled environment incorporating a combination of coordinated electrical [140, 154, 264] and mechanical [265, 266] stimulations for optimized physiological functions of contractile engineered tissue.

Different types of materials have been used as electrodes for electrical stimulation: silver-silver chloride [137, 138], titanium [139, 140], titanium-nitride [140], stainless steel [138], hydrogel [138], platinum [141-143], platinum-iridium [144], but carbon electrodes [140, 145-147] seem to be a better because they maximise the synchronism of the activity and seems a more popular choice recently [140, 145, 148]. Carbon electrodes offer a much greater resistance than metal [138], exhibit the best charge transfer characteristics and the lowest percentage of injected charge unrecovered and by that constitute an excellent material for a bioreactor [140]. In general, electrical stimulations can be applied in two ways (local or field stimulation) although other approaches including optogenetics are being evaluated [267]. Local stimulation aims to inject a current to a precise location of the extra- or intracellular environment with the use of electrodes (unipolar or bipolar) that will activate local cells; the localized activation (with a minimum of depolarized cells) then propagate to all connected cells [268]. Field stimulation aims to depolarize all the cells by the application of an electric field issues from the voltage between two parallel electrodes. Field stimulation is preferable for cell culture stimulation protocols since both isolated cells (or cell islands) and connected syncytium can be stimulated. It is important to note that electrode length should be more than 2 times longer than the space between those 2 electrodes and that generally, stimuli of 5 V/cm should be used (maximum safe stimulation amplitude of 8 V/cm was also established) [140]. Field stimulation tends to improve the alignment of the cells because charges in the cytosol will react as dipole and align in the direction of the field [149].

In culture, cells are affected by the presence or absence of electrical stimulation. The presence of the electrical stimulation will improve geometry, alignment of the sarcomeres and distribution of connexin-43 (Cx-43, cell to cell junction) and of the mitochondria (energy) [147, 150, 269]. Two types of pulses can be used to apply the electrical stimulation:

monophasic or biphasic pulses. Both types of pulses induce an increase in Cx-43, but biphasic pulses are more effective [269]. Biphasic pulses also induce a clear upregulation of cardiac transcription factors such as MEF2D, GATA-4 and Nkx2.5 as well as the expression of sarcomeric proteins, troponin T, alpha-actinin and SERCA 2a in human progenitor cells [269]. Oppositely, the absence of electrical stimulation will tend to favor the formation of round shaped cells as well as the apparition of a remodelling of the actin and troponin-I which leads to the loss of the contractile properties [151]. From a functional point of view, cardiomyocytes under the influence of electrical stimulation will show improved synchronized contractions, higher training frequency [150] and less hypertrophy [152]. Electrical stimulation helps the formation of regular activity (contractions) and by that; it optimizes intracellular calcium handling [153], density and function of L-type calcium channels.

The mechanical environment plays an important role in the function of cardiac cells and this has a huge impact on the physiological development of the heart as well as on the development of pathologies [156]. Cardiomyocytes are subject to extreme dynamic changes in terms of stress and strain [270] and by that, they constitute really interesting targets to study stretch related conditions. In a cardiomyocyte, the electrical activity is directly linked with the mechanical activity by the excitation-contraction coupling principle. Mechanical-electrical feedback is emerging as a key modulator of cellular and tissue electrophysiological properties [157]. By example, acute stretch activated channels can affect cardiac automaticity by causing the opening of channels responsible for the depolarization of the cardiac cells (entry of calcium and sodium). The entry of calcium enhance the entry of sodium by the sodium-calcium exchanger and can lead to the formation of the action potential [172]. Chronic stretch can also modulate the electrical propagation by increasing Cx-43 expression leading to an increase in conduction velocity [53].

To mimic the mechanical environment of the cardiac cells, it is needed to use pressure or motors to apply a deformation to the substrate.

We aim to develop a bioreactor (BioR) to optimize *in vitro* development of cardiac replacement tissue. Electrical field stimulation, mechanical stimulation or a combination of

both will be studied on neonatal rat cardiomyocytes. The impact of these stimulations on the contractile activity, differentiation and protein remodelling will be evaluated.

Method

Characterization of electrical and mechanical subsystems

Data for evaluation of the electrical stimulation sub-system were acquired with a NI USB-6221 DAQ (National Instruments inc, USA) and with a homemade Python program using the PyDAQmx library. Recordings were sampled at 10 kHz for testing the period of stimulation and 100 kHz for evaluating the bipolar stimulation duration.

Data for evaluation of the mechanical stimulation sub-system were done using a large field USB camera (Dino-lite, Taiwan). Images at different displacement of the motors were acquired for estimation of the seeding template deformation. Video recordings at a frame rate of 15 fps were acquired and analyzed using Matlab to validate the temporal period of cyclic stretch.

Cardiomyocyte isolation procedure

All animal-handling procedures were concordant with the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the institutional Animal Research Ethics Committee. Isolation was performed according to the protocol of the neonatal cardiomyocyte isolation kit from Worthington. In summary, one to three days old rats (Sprague-Dawley, Charles River) were sacrificed by decapitation. Beating heart were removed from the rats and immediately put in cold Ca^{2+} and Mg^{2+} -free Hank's Balanced Salt Solution. Ventricular muscle was selected by excision and tissue was minced on ice into 1-3 mm³ pieces. The mixture was subjected to purified enzymatic digestion (trypsin and collagenase). Isolated cells (enriched cardiomyocytes) were counted and seeded at a density of 6.5×10^5 cells/cm² in the seeding area of the membrane pre-coated with 0.2 % porcine-derived gelatin (G1890, Sigma) and 0.00125% fibronectin solution (F1141, Sigma). Cells were grown for 48 hours in DMEM (319-050-CL, Wisent) with 10% fetal bovine serum (SH30396.03, Fisher Scientific Co. Ltee), 1 % penicillin/streptomycin (450-201-EL, Wisent). A concentration of 100 µg/mL of

Normocin (ANT-NR-1, InvivoGen) was used in a subset of experiments. After this period of 48 hours in complete media, fetal bovine serum was reduced to 5 % in DMEM to limit the impact of hypertrophy on the cells with 1 % penicillin/streptomycin.

Hek239t cell culture

Hek293t were used to test adhesion of the cultured cells during deformation of the flexible culture template with the BioR. Briefly, amplification of the HEK293t into a 100 mm² cell culture dish until approximately 90 % confluence is obtained by changing the complete DMEM media (10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin/streptomycin) every 3 days. Then, cells are detached from the petri dish using a mixture of trypsin/EDTA 1x (5 minutes at 37 °C). Cells are then seeded on the membrane template (5×10^5 cells/mL) in the BioR. Wait 24-48 hours before doing experiments to be sure cells are well attached and that the desired density is obtained.

Fluorescence of calcium dynamics

Calcium transients were recorded using optical mapping to validate the accuracy of our electrical stimulation sub-system. After 5 days of culture, the cardiomyocytes were washed once with fresh media and incubated with 10 μ M of fluo-4 AM (*F-14201*, Life technologies, Burlington, Ontario, Canada) and 0.2 % Pluronic acid F-127 (P-3000MP, Life Technologies) for 30 minutes at 37 °C. Fluo-4-loaded cardiomyocytes were then washed 4 times with fresh media, followed by a 15 minutes resting period to allow de-esterification of the dye before starting calcium transient mapping experiments performed in DMEM at 37 °C. Fluorescence was recorded for 30 seconds at 125 Hz with a CardioCCD camera (RedShirt Imaging, Decatur, GA, USA). The dye was excited with a quartz tungsten halogen lamp (Oriol Instruments Inc., Stratford, CT). The filters used for excitation and emission were $\lambda_{\text{excitation}} \approx 480 \pm 20$ nm (Chroma Technology Corp, Bellows Falls, VT) and $\lambda_{\text{emission}} \approx 535 \pm 25$ nm (Semrock Inc., Rochester, NY), respectively. Signals were filtered and analyzed using a program developed in-house using Matlab software (R2008, MathWorks Inc., Natick, MA).

Results

Physical design of the bioreactor

The 3D layout of the BioR is presented in fig. 1. The mechanical stimulation is applied to the cells that are attached to a homemade polydimethylsiloxane (PDMS) membrane through elongation. Stretch of the membrane is done by a controlled displacement of two motor shafts. The movement is constrained along the lengthiest dimension of the enclosure following two parallel 17-4 PH stainless steel rods (diameter = 2.38 mm, length = 101.6 mm, *McMaster-Carr inc.*). The rods are held in place by a 3D printed acrylonitrile butadiene styrene (ABS) frame (bottom left inset of fig. 1) which also serves to stabilize the carbon electrodes (dimension : 3.175 mm x 6.35 mm x 96.164mm, SK-05 ISO *Graphite Plates, Industrial Graphite Sales LLC*) for electrical stimulation. The membrane holders have Teflon cylindrical inserts through which the stainless steel rods pass through. Teflon was used to decrease friction (resistance to movement). The bioreactor has a transparent cover to allow direct imaging techniques. The bioR is designed around a “safe for food” crystal clear polystyrene disposable and recyclable enclosure (4 1/4” x 1 1/2” unhinged container, *Gary Plastic Packaging Corp. New York*) which sits on a custom-made Lexan support on which two linear stepper motor (Haydon 28000 Series size 11 ID 7, *Haydon Kerk Motion Solutions, Inc.*) are sitting. These motors have a step size of 3.175 μm at full step. Each motor is physically connected to a 3D printed ABS membrane support that transfer the shaft translation in an elongation of the PDMS membrane on which adherent cells are cultured. The bioR is placed in a cell culture incubator (95 % humidity, 5 % CO₂). All electronic components except the motors and the carbon electrodes are found in a box outside the incubator.

PDMS membrane and culture seeding area

PDMS-based cell culture membrane is widely used to study cell–substrate interactions because it is resistant to mechanical deformations and biocompatible [271]. Moreover, mechanical properties (stiffness of the substrate) are easily tuned in physiologically relevant ranges [194]. Cells are cultured on an elastomeric PDMS (SYLGARD 184, *Dow Corning*) membrane that was designed with T-shaped ends to be held by the membrane supports and a center depressed region for cells (see fig. 2 for details on dimensions). An aluminum mold was

designed using Solidworks (*Dassault Systems Corp.*), where part A and B were designed and machined (left insets of fig. 2) with an open top to let air bubbles escape from the mold. Degassing is performed before injecting the PDMS into the mold with a vacuum pump (Platinum DV-85N, *JB Industries*). The degassed binary compound (mix of base and curing agent) is injected through a Luer-Lok tip hole. A ratio of compounds (curing agent:base) of 1:20 was used to create our membrane as this ratio has a stiffness close to the stiffness of the heart normal tissue while still being easy to handle (offers resistance to mechanical handling) [272].

Electronic system for electrical and mechanical stimulation

The prototype was built with a central microcontroller that adjusts the timing of both the electrical and mechanical stimulation sub-systems as shown in fig. 3. An Arduino Mega 2560 (Arduino.cc) has been chosen because it offers a higher number of digital outputs compared to the UNO or smaller boards. These additional digital outputs are needed to drive both the electrical and mechanical sub-systems. The microcontroller at the base of the Arduino is an ATmega2560 with 256 KB of flash memory (of which 8 KB is used for the bootloader), 8 KB of SRAM and 4 KB of EEPROM.

Characteristics of the electrical stimulation subsystem

The timing and waveform of the electrical stimulation is done by the microcontroller which changes the digital output of pins 46-53 to modulate the output of the 8-bit digital-to-analog converter (TLC7226CDW, Texas Instruments) as shown in fig. 3. A power operational amplifier (LM675T, Texas Instruments) is used with 5 watts resistors R1 and R2 to create a non-inverting amplifier configuration. The gain ($\times 3.33$) of the amplification increases the output from the level selected by the user using a scaling factor in the code. The electric field is applied to the cells via a pair of parallel carbon plate electrodes (depicted in fig. 4A). The system allows voltage amplitudes of up to ± 16 V. The current is limited to 250 mA by the resistance R3 (in series with the cell culture setup resistance as seen fig. 3).

Electrical stimulation protocol

The electrical stimulation is based on field stimulation with a voltage difference applied to the cells via carbon electrodes (schematically shown in fig. 4A). A biphasic stimulation waveform, with sequential positive/negative polarities per pulse, was chosen to decrease accumulation of charges at the electrodes with high precision (of the order of the microseconds). Examples of output measured at R3 are shown in fig. 4B for a combined t_{stim} ms up and t_{stim} ms down square pulses (set of t_{stim} shown in the legend). However, these stimulation characteristics can be modified as long as the up+down voltage total duration is less or equal to the pacing cycle length defined by the user. The interest of the proposed design is that a variety of stimulation protocols can be implemented. For example, unipolar (with positive or negative polarity) or alternating output (a different bipolar stimulation with alternation between positive and negative outputs) could be programmed. The timing of the voltage changes is done by modifying the 8-bit digital output of the Arduino based on an intrinsic timer of the controller using the TimerOne library using interrupt functions (<http://github.com/PaulStoffregen/TimerOne>). The timer is configured to repetitively measure a period of time, in microseconds. At the end of each period, an interrupt function runs modifying the 8-bit digital output of the Arduino controlling the DAC state and output voltage. Output to the amplification circuit can be set to ground via an analog switch for security purposes. An example of bipolar stimulation of cardiomyocytes is depicted in fig. 4C where cells were grown on the substrate for 5 days before initiating the electrical stimulation protocol that consisted of pulses of 4.5 V/cm with duration of 2 ms at 1 Hz. A comparison between the programmed stimulation period (T) and the average measured period of stimulation ($\langle T_{measured} \rangle$) is shown in fig. 5 and clearly shows a stable 1:1 response with very narrow standard deviation.

Characteristics of the mechanical stimulation sub-system

This part of the system is based on the stepper motor shield (DFRobot, inc.) which can drive both linear stepper motors of the BioR and induce deformation of the elastic template (fig. 6A) using only two digital outputs per motor of the Arduino (as depicted in fig. 3). Simultaneous retraction of the motors stretches the membrane while forward movement returns the stretch

level to the initial state. An example of stretched cells cultured on the PDMS template is shown in fig. 6C for a ~14 % stretch level.

Power to the shield and motors is controlled using a relay board (model 3051, Phidgets inc.) which is digitally controlled through the Arduino pin 22. The shield is based on the Polulu A4988 chips (one per motor). Digital outputs for each motor determined the direction and the timing of steps. Usually, pin 4 (direction) and pin 5 (stepping) control the motion of the first motor. However, one of the timer used for time-dependent action of the Arduino is also dependent on pin 5, thus the shield has been modified to control the stepping of motor 1 with pin 23. Motor 2 is controlled by pin 7 (direction) and pin 6 (stepping). Here in this version of the prototype, step size was set to full step to maximize velocity of movement. Note that the shield limits the digital control to steps and direction only while the Polulu drivers digital stepping options are set through dipswitch on the board. A trade-off exists between the resolution and velocity of movement. While microstepping down to 1/16 of the fullstep (~ 200 nm) is available with the Polulu drivers, the step size was set to the fullstep to maximize velocity as minimum polarization of the coil is needed for movement of the motors.

Different protocols can be applied as depicted in fig. 6B: linear (stretch increase with time), static (stretch to a specific value for a specific period of time) and cyclic (stretch of a specific value back and forward during a specific period of time). Although a sinusoidal variation (red curves, bottom panel) could be programmed, only the triangular cyclic displacement has been implemented (blue line, bottom panel).

Validation of the mechanical subsystem

Deformation of the membrane induced by displacement of the motor was studied based on the deformation of the seeding area borders. The results are presented in fig. 7A where the width (W) and length (L) of the membrane seeding area (measures were taken as highlighted in panel B) are shown for stretch and return phases (note that values for the return phase is shown with the inverse sign for clarity). There is linear relation between the displacement of the motors using the control center (Arduino-based system) and the actual deformation applied to the membrane (fig. 7A). As such, a displacement of 6 mm transduced to a strain of 31.04 % of the membrane seeding area in the direction of the displacement (example shown in panel

B). However, a small decrease (-6.7 %) of the membrane width (perpendicular direction of the displacement) was observed. This contraction in the width of the membrane can be explained by the Poisson effect. The calculated Poisson ratio for a 6 mm stretch was 0.22. Return from the stretched to the initial state shows also a linear relation between motor displacement and stretch level. However comparison of the absolute value of the regression slope highlight a slight but negligible difference (5.4 %/mm for stretching phase vs. 5.7 %/mm for the return phase). Preliminary evaluations suggest that mechanical construction needs to have a lower tolerance than what was tested for this prototype.

Cyclic stretch is an important modulator of cardiomyocyte electrophysiological and contractile characteristics. As such, our proposed design offers the possibility of various mechanical stimulation types including a cyclic stretch protocol. Evaluation of the BioR mechanical subsystem has been done. Cyclic modulation of the length (L) and width (W) of the cell seeding template has been studied (see definition in fig. 8A). An example of cyclic variation in the top and bottom boundary of the template is shown in panel Bi while cyclic contraction due to the Poisson effect is found along the axis orthogonal to the stretch (panel Bii). The measured period of the cycle ($\langle T_{\text{measured}} \rangle$) has been tested over a range of imposed period (T) and the results are shown in fig. 8C. As expected, a 1:1 relation with very low variability is found highlighting the stability and quality of the approach.

Procedural steps in culturing cardiomyocytes with electrical and mechanical stimulations

The BioR is an assembly of several parts making the cleaning procedures and sterile conditions more difficult than simple culture in petri dishes. All the individual parts need to be cleaned with dishwashing soap or a specialized soap like the Decon 90 (Decon Laboratories Limited, England) to remove dust and residue from previous culture activity and to decontaminate the components. All parts are then put in 1 % Javel-deionized water for a period of 24 h to make sure all the porous material is carefully cleaned (including carbon electrodes). The next step is to immerse the parts for washout in deionized water for 24 h with water changes every 6 hours (at least 3 times over the 24h period). The settings are then

sterilized using an ethylene oxide sterilisation which is compatible with ABS components of the system. The parts can be re-assembled and connected to the motors under a sterile hood. Coating (to improve adhesion of the cells) is added on the PDMS membrane. We found that either a combined gelatin/fibronectin [272] or fibronectin alone [273] helps the formation of an homogeneous monolayer. The assembled system is then put under the hood UV light for 15 min. The sterilized system can then be put in the incubator until seeding of the cells.

Using neonatal rat cardiomyocytes, we observed that a relatively high density of cells is needed to obtain a good syncytium on the PDMS template within 24-48 hours. A density of 450 000 cells/cm² usually results in a monolayer with synchronized activity (without neither mechanical nor electrical stimulations). A key step follows the seeding where it is highly important to wait at least 3 hours before adding cell culture media or move the system. This step is key to minimize cell lost and maximize homogeneous dispersion of cells within the membrane template.

Discussion and conclusion

We have designed and built a bioreactor prototype that incorporates both mechanical and electrical stimulations. The main interest of our approach is the fine control of the characteristics of the stimulations as regards to timing and amplitude in a “simple” design based on easy to find, affordable components and 3D printable parts. As is, our approach opens the way to more complex protocols for electrical and/or mechanical stimulations.

Electrical stimulation can either be applied by localized bipolar stimulation [274] or by field stimulation [275]. We opted for the field stimulation approach to favour synchronized excitation of cells since localized stimulation (either unipolar or bipolar) directly stimulate a limited number of cells surrounding the electrodes and that overall cell activation will be dependent on confluence level and electrical coupling between cells. Time-dependent electrical stimulation with different pacing periods can be done. This is an important feature since progressive frequency increase induces electrophysiological changes consistent with cell

maturation [115]. Of interest is the possibility, in the future, to program irregular timing of stimulation which is known to contribute significantly to ventricular excitation–contraction coupling by altering the expression and activity of key calcium-handling proteins [276].

One novelty is also our culture membrane with a specialized region for seeding which could be modified (using different molds) to satisfy different needs and optimize optical mapping studies. Mechanical stimulation is known to modulate the functional characteristics of cardiomyocytes and is also believed to be a key factor in acquiring an optimized phenotype of derived-cardiomyocytes [115]. Although pulsatile linear stretch *in vitro* causes marked upregulation of proteins that form electrical and mechanical junctions [188] and acute linear stretch has been shown to affect action potential duration [165] inducing hypertrophy in myocytes [277], the exact effects of the different types of stretch on intracellular pathways and cellular phenotype is still in investigation. More complicated stretching patterns have even been proposed to mimic tissue contraction *in vivo* [278]. Many approaches exist to apply a mechanical stimulation to a cell: axial stretch using carbon fibers [279], unidirectional stretch using an elastic substrate [277], and biaxial stretch of elastic substrate [280, 281]. However, biaxial stretch is the most physiologically relevant deformation while uniaxial stretch, as implemented in our prototype, with its Poisson contraction can be limited.

The specific time when electrical and mechanical stimulations are initiated is important as highlighted above. As shown by Wang and collaborators, it is important to synchronize the electrical and mechanical stimulation so they have a synergic effect and more powerful impact [24]. It has also been demonstrated that mechanical stimulation results in long-term modifications within the cell while electrical stimulation effects that will stop when you remove the electrical pulses [282]. The attachment state of the cell is crucial to the approach because it's the strain applied to the elastic membrane that is transferred to the cells. A pre-culture time of 3 to 5 days after seeding the neonatal rat cardiomyocytes is optimal before beginning electrical stimulation. The medium should be changed every day to reduce the potential negative effects of accumulated charge and wastes in the culture [140] although continuous medium change would certainly help control accumulating factors including autocrine modulators.

Our future aim will be to use this system with induced pluripotent stem cells to help differentiation and conservation of the cardiac phenotype which would need precise electrical and mechanical stimulations. Such a system could serve to study and optimize tissue engineered cardiac patches including better contractility, controlled spontaneous rate of activity (as in the biopacemaker concept [283, 284]), modulated responses to cholinergic (modulation of spontaneous activity) and adrenergic stimulation (modulation of spontaneous activity and contractility), or decrease automaticity to limit arrhythmia.

Figure and figure captions

BioR design

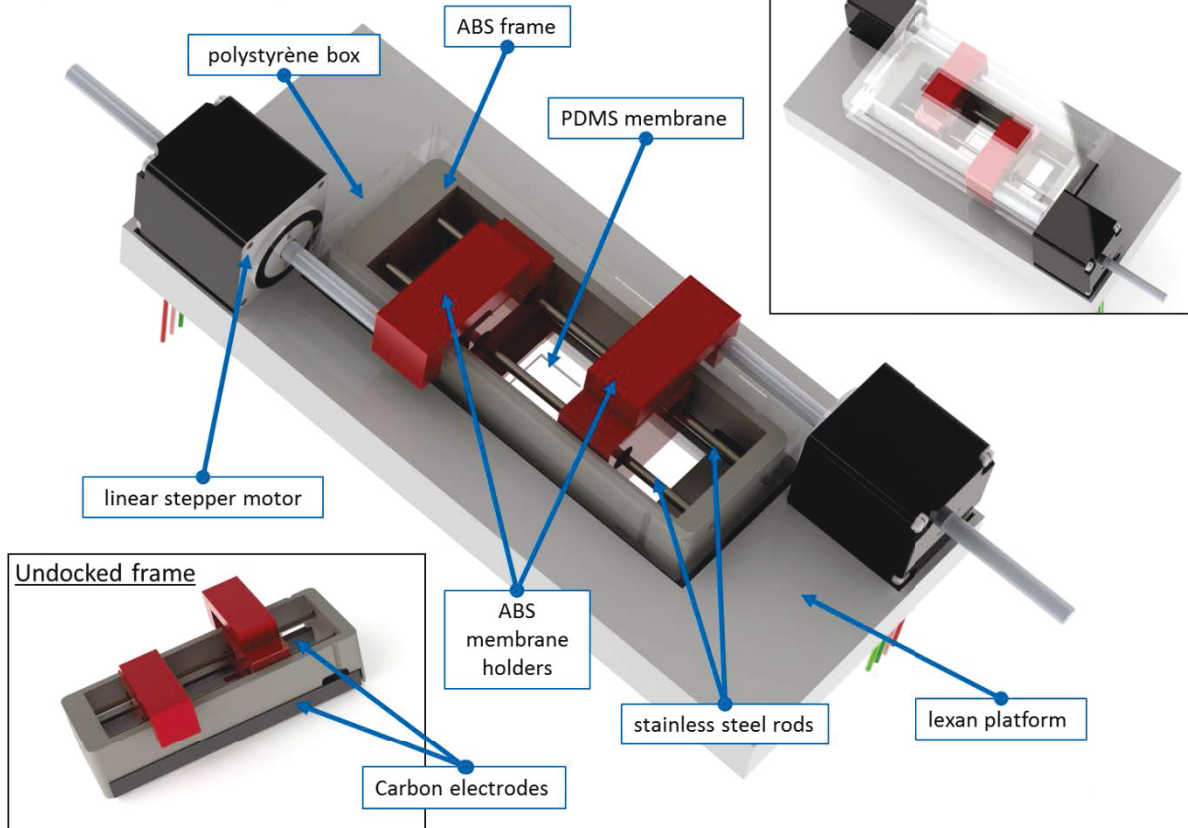


Figure 1: Overall design of the bioreactor showing the mechanical and electrical stimulation sub-systems

Bottom left inset: Schematic of the frame showing the carbon electrode positions and membrane holders. The membrane holders have Teflon cylindrical inserts through which stainless steel rods pass through for decreased resistance to movement. Upper right inset: The bioreactor is shown with the transparent cover to allow direct imaging techniques.

ABS : acrylonitrile butadiene styrene,

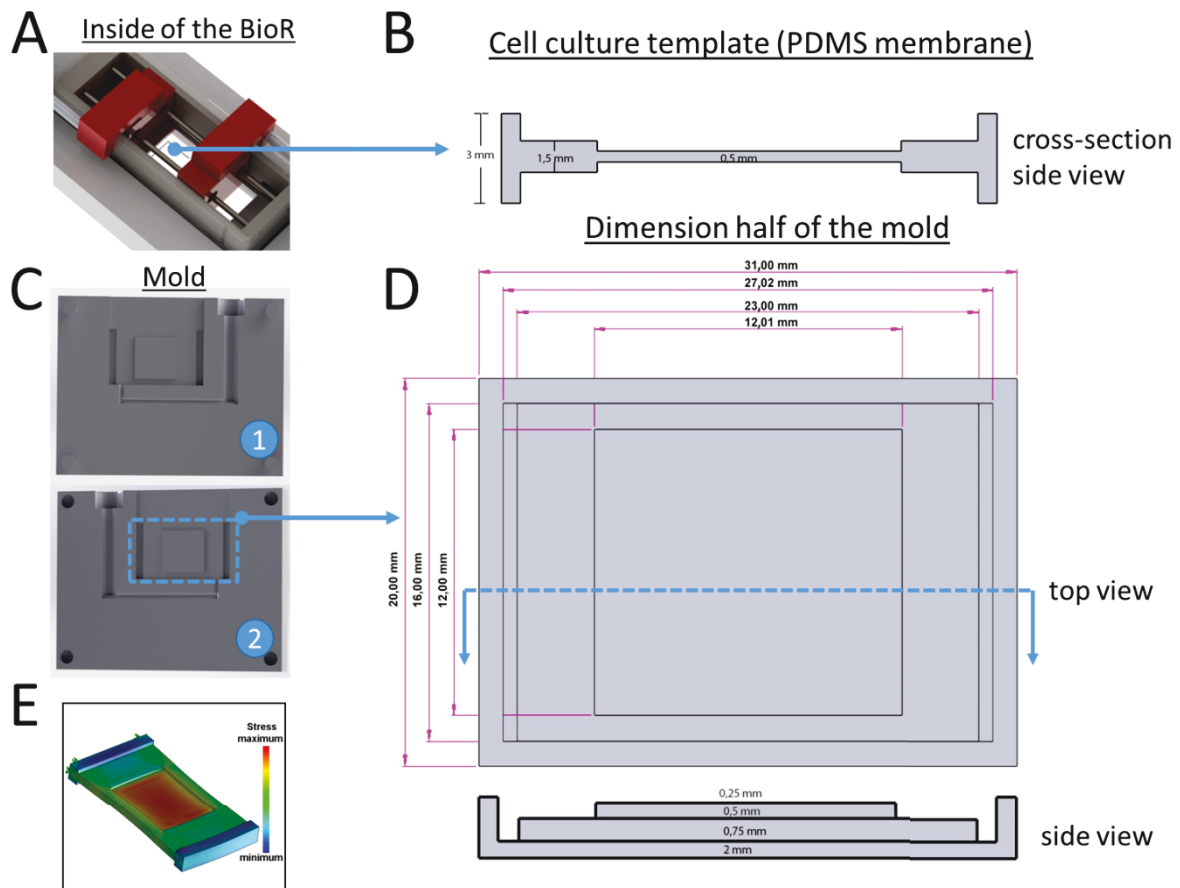


Figure 2: Characteristics of the homemade PDMS cell culture template (all dimensions are in mm)

A) Close-up of the membrane in the bioreactor where the cells are cultured. B) Cross-section of the PDMS membrane showing the side T morphology for anchoring to the membrane holder. The thinner section in the middle corresponds to the area where cells are seeded. C) The membrane is created by the molding technique with a symmetric two-part mold (part 1 and 2). D) Dimensions of one part of the mold. E) Simulated spatial dispersion of the stress when elongation is applied along the length of the membrane showing that the maximum stress is found within the seeding region (red regions of the membrane).

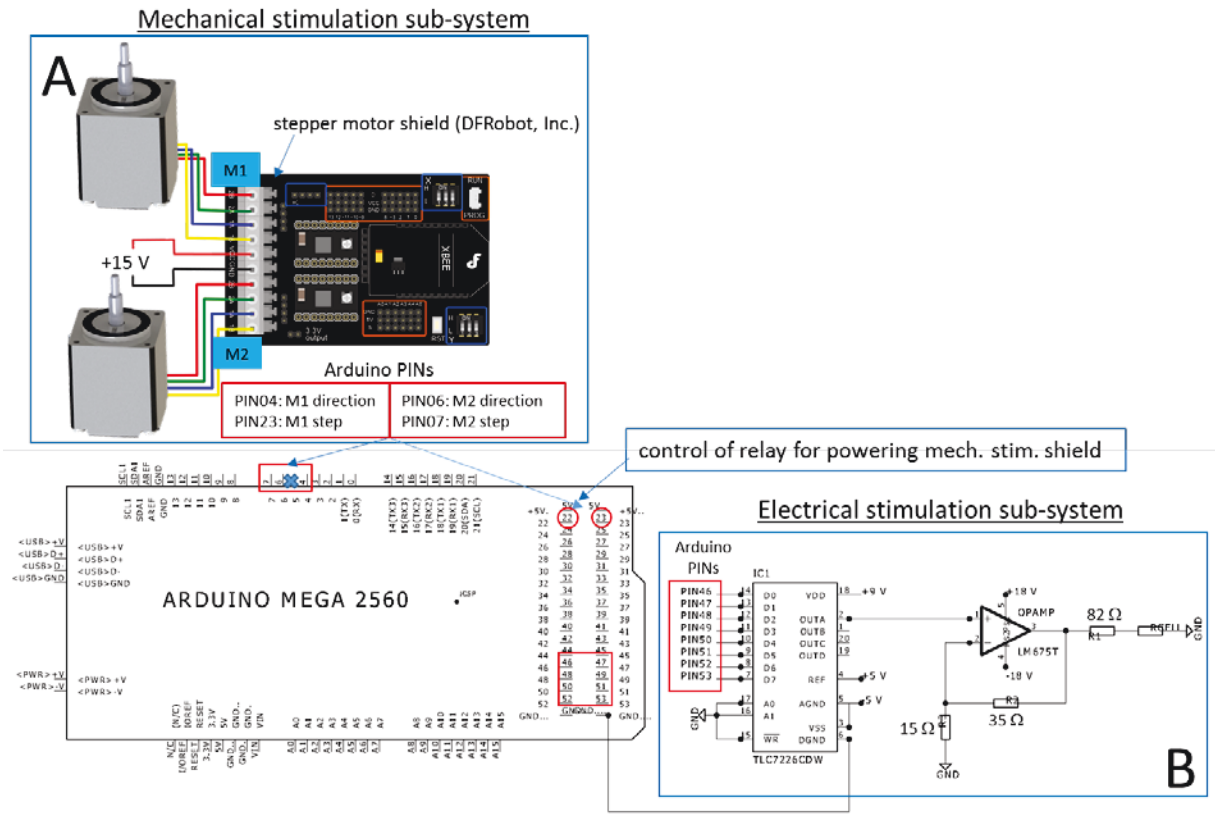


Figure 3: Details of the bioreactor electronic components for the mechanical and electrical sub-systems that are both controlled by the Arduino MEGA board.

A) Schematic of the shield and connection that controls the linear stepper motor movement. B) Electrical stimulation sub-system showing the digital-to-analog converter with output from port A feeding the non-inverting amplifier circuit.

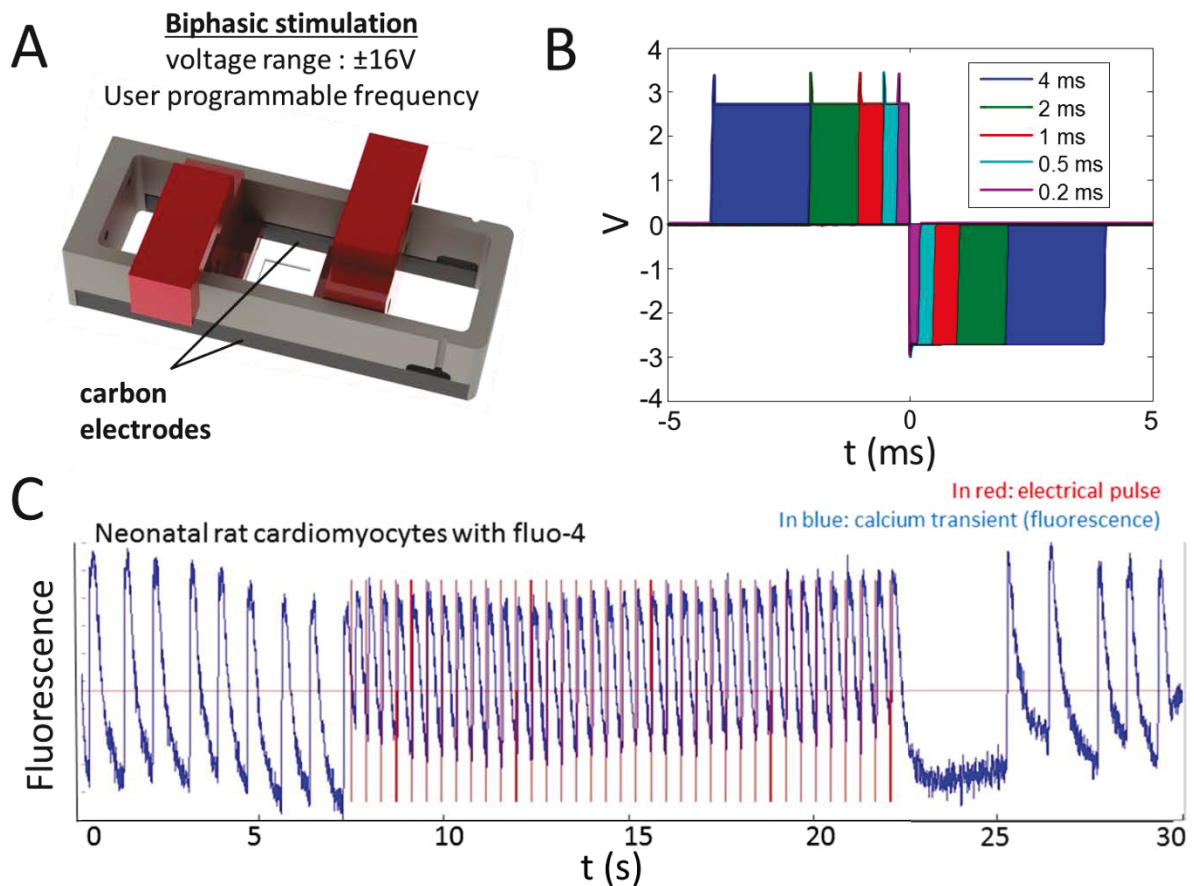


Figure 4: Electrical stimulation

A) The electrical stimulation in the bioreactor is applied by field stimulation with maximum voltage amplitude of 16 V in both polarities. The voltage difference is applied to the cells cultured between the two carbon electrodes. B) Typical outputs measured at the resistor R1 (current limited resistor) showing the bipolar stimulation with positive and negative pulses (stimulation duration per phases shown are 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 ms as presented in the legend). Duration of the pulses can be modified by the user. C) Calcium transients of cardiomyocytes (Fluo-4 fluorescence shown in blue) before, during and after pacing (pacing voltage shown in red). A clear entrainment of the cells is shown at a pacing frequency of 2.5 Hz (stimulation characteristics of 2 ms per polarity and amplitude of 10 V/cm).

V: voltage, t : time.

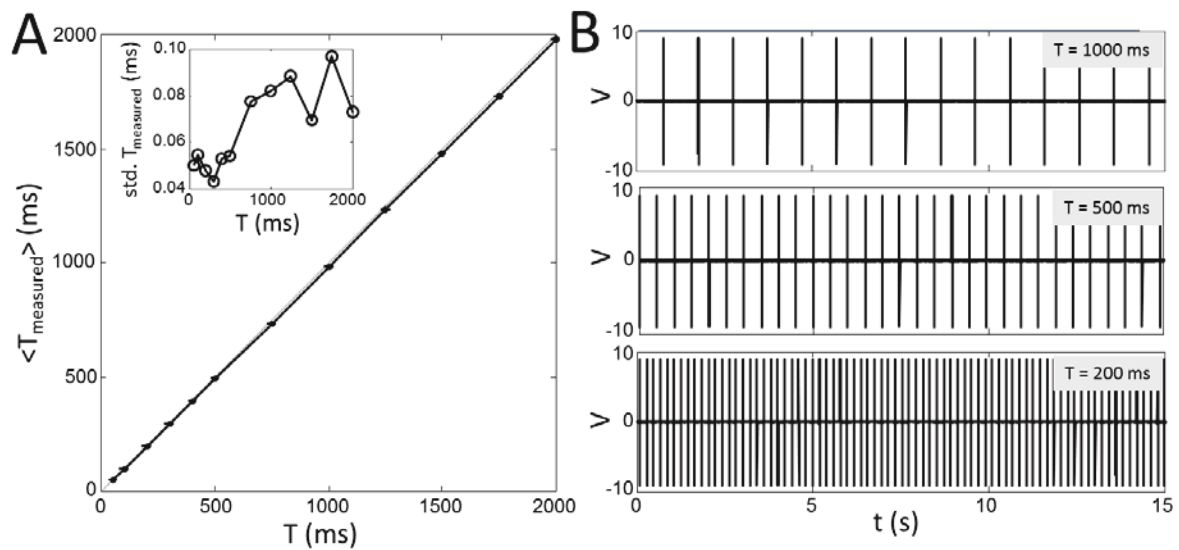


Figure 5: Comparison between the programmed stimulation period (T) and the average measured period of stimulation

$\langle T_{\text{measured}} \rangle$ shows a clear and stable 1:1 response with very narrow standard deviation error bars corresponding to the values shown in the inset. Test pulses had 2 ms positive and negative bipolar duration. B) Three examples of signals obtained for $T = 1 \text{ s}$ (top), $T = 0.5 \text{ s}$ (middle), and $T = 0.2 \text{ s}$ (bottom) stimulation period.

$\langle T_{\text{measured}} \rangle$: mean period mesurée, T : imposed period, V : voltage, t : time.

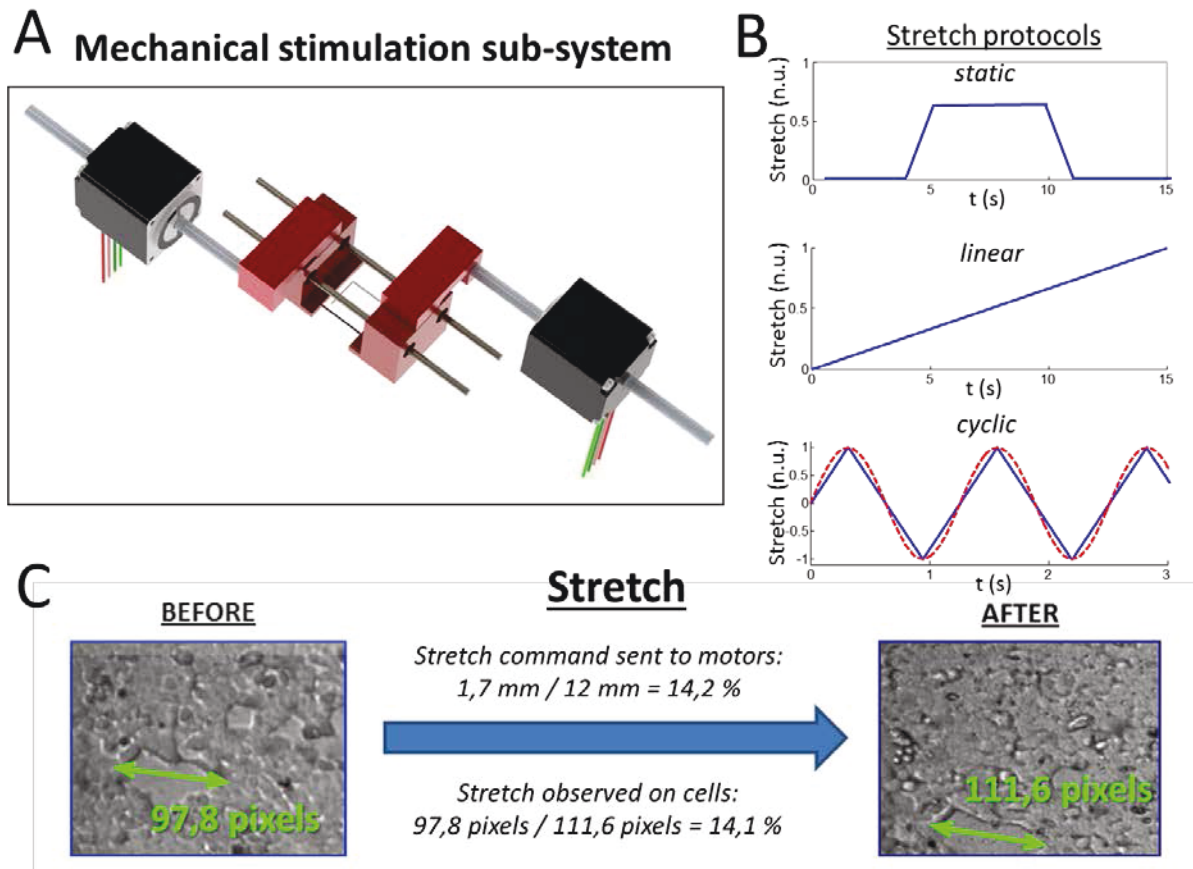


Figure 6: Mechanical stimulation sub-system characteristics

A) Schematic of the sub-system setup based on two linear stepper motors that move two membrane holders to which the PDMS membrane is attached. Two stainless steel rods serve as guiding rail for displacement along the longer axis of the membrane. B) Sketch of the different mechanical protocols that can be used with our design including, static (top), linear (middle), and cyclic (bottom). Combinations of these different protocols could easily be integrated for complex culture protocols. C) Example of applied deformation of attached Hek293t cells on displacement of the motors by 1.7 mm resulting to a 14.2 % stretch increase.

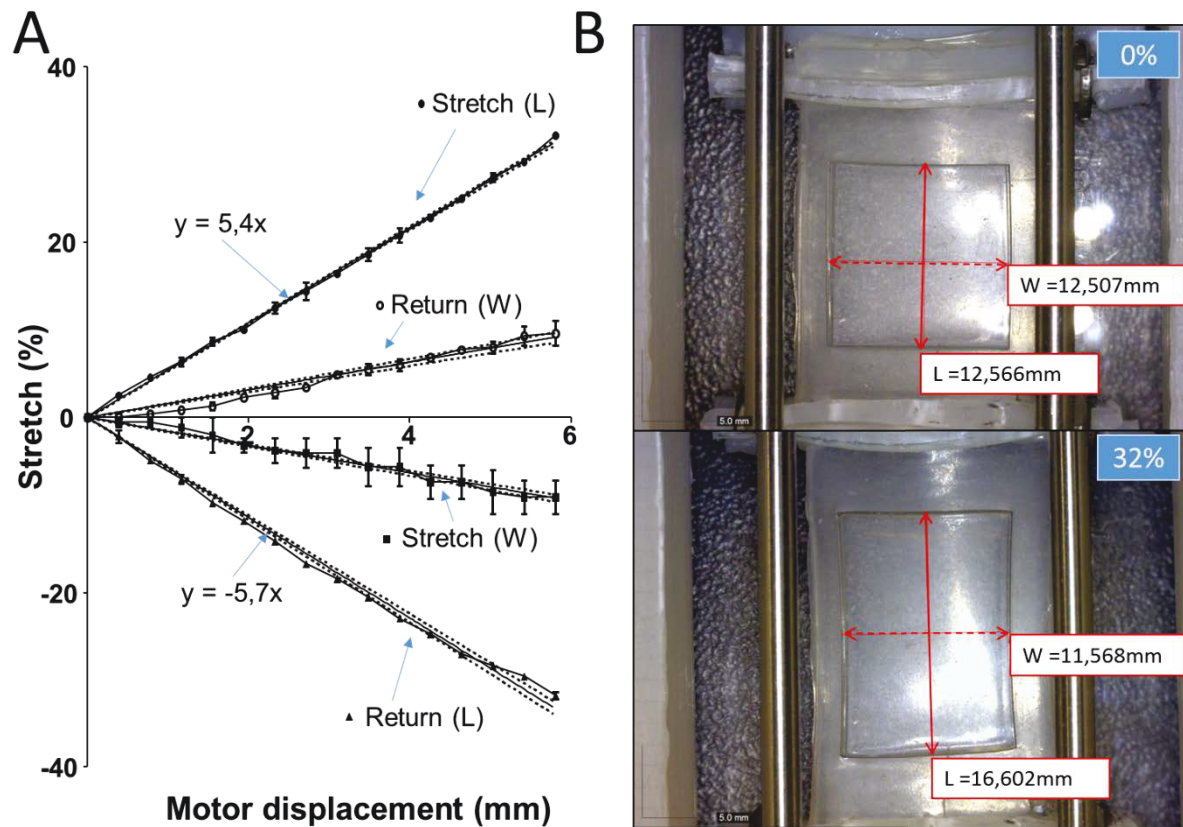


Figure 7: Study of the link between motor displacement and cell seeding region

A) A linear relation exists between the motor shaft displacement (for values between 0 and 6 mm) for both the stretching and return phases (from the stretched state to the un-stretched state). The second set of lines corresponds to the transverse change in of the template where contraction is seen while stretching the membrane. B) Example of the data obtained and analyzed to obtain the results presented in panel A where a displacement of 6 mm resulted in 32 % stretch and 8 % contraction in the transverse axis.

L : length, W: wide.

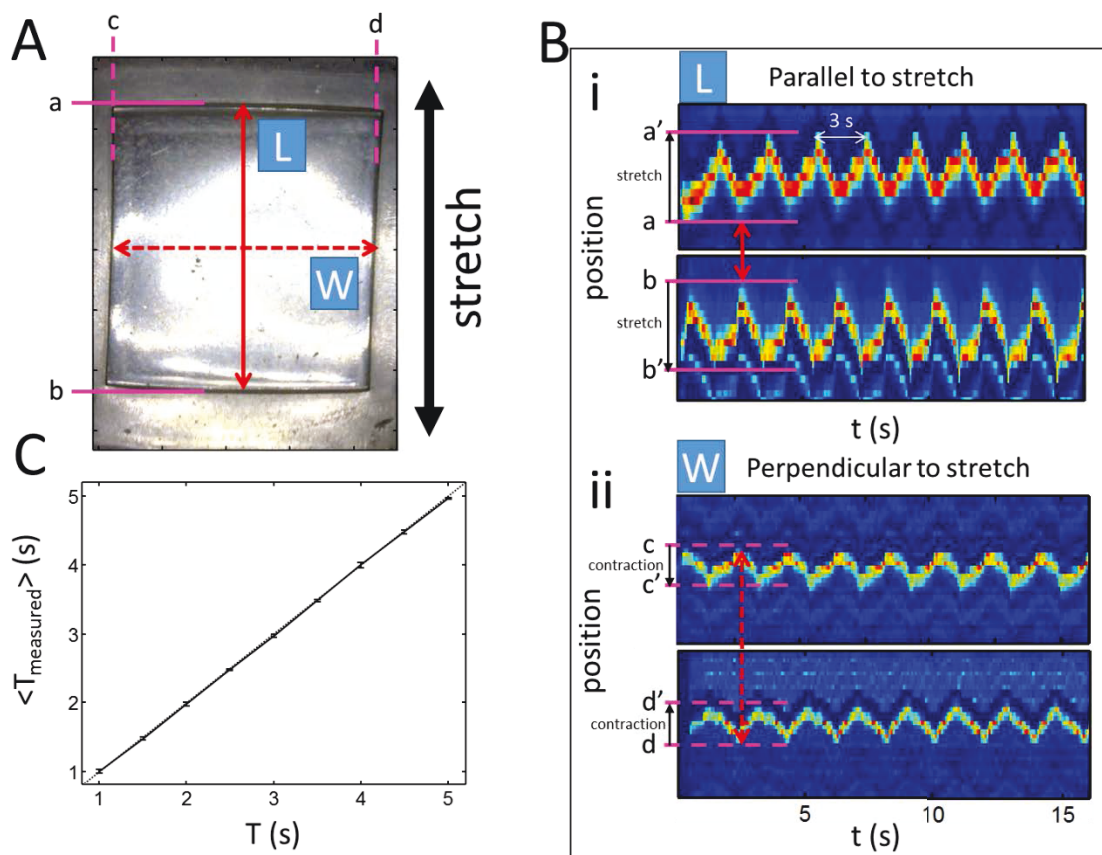


Figure 8: Evaluation of the bioR cyclic stretch

A) Image of the cell seeding region with definition of the length (L , along the direction of stretch) and width (W , transverse to the stretch). The boundary (for the cell seeding region) are labeled as a and b (magenta continuous lines) which are displaced in the direction of stretch and c and d (magenta dashed lines) which are displaced perpendicular to the stretch (contraction displacement). B) Example of cyclic stretch with period of $T = 3$ s and $\sim 8\%$ stretch shown as a colorscale (boundaries are detected as a gradient of light intensity) is shown in colors (from cyan to red) over time. i) Stretch of the boundary a (top, pre-stretch position a and stretched position a') of L and boundary b (bottom, pre-stretch position b and stretched position b'). ii) Contraction of the boundary c (top, pre-stretch position c and stretched position c') and boundary d (bottom, pre-stretch position d and stretched position d') along W . C) Comparison between the average measured periods ($\langle T_{\text{measured}} \rangle$) versus the imposed periods of cyclic stretch showing a clear match with very limited timing error (error bars represent the standard deviation) over a 30 s recording.

Novel videomicroscopy analysis method: analysing the mechanical beating behaviour of cardiac cells

J'ai participé à l'élaboration du plan d'étude, le développement de la méthodologie, la réalisation des expériences de culture cellulaire, la capture des données expérimentales, l'analyse et le traitement des résultats et à la rédaction de l'article.

La participation des co-auteurs :

James Elber Duverger : Doctorant ayant participé au design expérimental de l'étude, à l'analyse des résultats et à la révision de l'article.

Philippe Comtois : Directeur de recherche ayant supervisé le projet et qui m'a grandement guidé à travers les différentes étapes du projet. En outre, par sa participation au niveau de la conception de l'étude, de la conception des outils et algorithmes d'analyse (codes Matlab) pour l'analyse des résultats et de sa critique des travaux et finalement pour sa participation à la rédaction de l'article.

Novel videomicroscopy analysis method: analysing the mechanical beating behaviour of cardiac cells

Jonathan Béland^{1,2}, James Elber Duverger^{1,3}, Philippe Comtois^{1,2,3}(*)

¹ Research Centre , Montreal Heart Institute , Montreal, Canada

² Department of Molecular and Integrative Physiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

³ Institute of Biomedical Engineering, Université de Montréal, Montreal, Canada

Corresponding author:

Philippe Comtois, PhD

Montreal Heart Institute – Research Center

There is no potential conflict of interest to disclose.

This work was supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by the Réseau ThéCell du Fonds de recherche du Québec –Santé (FRQS).

Résumé

La culture cellulaire de tissu cardiaque de remplacement est de plus en plus intéressante pour la médecine régénérative (génie tissulaire) et est largement utilisée pour plusieurs études de cardiotoxicité. Elle constitue une approche rentable pour les compagnies pharmaceutiques qui souhaitent se défaire rapidement de nouveaux composés avec un risque de toxicité élevé, l'évaluation de la cardiotoxicité est d'abord effectuée *in vitro* nécessitant des cellules/tissus avec des caractéristiques physiologiques/pathologiques (proche des propriétés *in vivo*). L'étude des propriétés électrophysiologiques et contractiles de plusieurs types cellulaires est nécessaire pour évaluer les effets cardiotoxiques des médicaments et les techniques favorisant l'automatisation de ces processus pourrait aider à simplifier le dépistage de nouveaux candidats. Beaucoup d'efforts ont été mis pour améliorer les modèles *in vitro*, y compris la création de plusieurs systèmes *in vitro* de culture de cardiomyocytes de rats néonataux. Une des premières données souvent observée est le comportement contractile des cardiomyocytes. Nous avons observé que les données de vidéomicroscopie peuvent être filtrées en augmentant le délai (τ) entre deux images analysées (ΔS). Deux nouvelles variables (Δ_{R-C} : temps entre le pic de relaxation et celui de contraction et $\text{Ratio}_{C/R}$: ratio entre l'amplitude du pic de contraction et celui de relaxation) qui sont liées à la dynamique de la contraction et qui dépendent du rythme d'activité sont proposées. En utilisant un modèle ionique de cardiomyocytes néonataux découplés, nous avons montré qu'une faible $[\text{Ca}^{2+}]$ conduisait à une diminution de Δ_{R-C} et une augmentation $\text{Ratio}_{C/R}$. La stimulation avec un agoniste β -adrénergique comme l'isoprotérénol induit une diminution du $\text{Ratio}_{C/R}$ par rapport au groupe témoin. Nos résultats expérimentaux montrent une augmentation de Δ_{R-C} et $\text{Ratio}_{C/R}$ lorsque la fréquence de contraction est plus lente. Dans cette étude, nous présentons de nouvelles approches utilisant les données obtenues par vidéomicroscopie de l'activité de monocouches de cardiomyocytes pour étudier les propriétés contractiles des cellules en culture. Deux nouvelles variables sont proposées qui sont liées à la dynamique de la contraction et dépendent de la fréquence des contractions. Des méthodes d'évaluation du synchronisme local dans le champ de vision de l'image ont été développées et peuvent rapidement déterminer les régions ayant une activité anormale ou de l'hétérogénéité dans la dynamique de contraction.

Abstract

Engineered cardiac tissue is becoming increasingly interesting for regenerative medicine (cell therapy and tissue engineering) and is widely used for high throughput cardiotoxicity. As a cost-effective approach to rapidly discard new compounds with high toxicity risks, cardiotoxicity evaluation is firstly done *in vitro* requiring cells/tissue with physiological/pathological characteristics (close to *in vivo* properties). Studying multicellular electrophysiological and contractile properties is needed to assess drug effects and techniques favouring process automation which could help in simplifying screening drug candidates. A lot of efforts have been made to ameliorate *in vitro* models including several *in vitro* platforms for engineering neonatal rat cardiac tissues. However, most of the initial evaluation is done by studying the beating frequency. In this study, we present new approaches that use the videomicroscopy data of monolayer activity to study contractile properties of beating cells in culture. We observed that videomicroscopy data can be filtered by increasing the delay (τ) between two analyzed images (ΔS). Two new variables (Δ_{R-C} : the time between the contraction and relaxation peaks and $\text{Ratio}_{C/R}$: amplitude ratio between the contraction and relaxation peaks) are proposed which are linked to the contraction dynamics and are dependent on the rhythm of activity. Using an uncoupled neonatal cardiomyocyte ionic model, we've shown that a lower $[\text{Ca}^{2+}]$ leads to a decreased Δ_{R-C} and an increased $\text{Ratio}_{C/R}$. Stimulation with β -adrenergic agonist like isoproterenol results in a decreased $\text{Ratio}_{C/R}$ compared to control group. Our experimental data show an increased Δ_{R-C} and $\text{Ratio}_{C/R}$ when the contraction frequency is slower. Methods for evaluation of regional synchronicity within the image field of view are also presented; it can rapidly determine regions with abnormal activity or heterogeneity in contraction dynamics.

Introduction

Engineered cardiac tissue is becoming increasingly interesting for regenerative medicine (conditioning of pre-injected stem cell-derived cardiomyocytes [109, 110] and tissue engineering [111-115]) and widely used for high throughput cardiotoxicity evaluation [116, 117]. Cardiotoxicity is a leading cause of market withdrawal for drugs [285, 286] because of its inducing cardiac dysfunction effect. Many drugs demonstrate cardiotoxicity due to chronic exposure to anthracyclines such as doxorubicin [287] which are cytotoxic cancer drugs [288, 289]. Chronic cardiotoxicity is usually evaluated in animal models including adult rodents [290, 291] or dogs [292], over periods of months of exposition. As a cost reduction approach to rapidly discard new compounds with high toxicity, cardiotoxicity evaluation is done *in vitro* with neonatal rat ventricular myocyte cultures and ultimately with human stem cell-derived cardiomyocyte. *In vitro*, contractions can be sustained for a small period of days when cardiomyocytes are grown on hard surfaces (glass or polystyrene) but myofibrils integrity rapidly deteriorate if the environment requirements aren't fully optimized, consequently contractions are eventually lost [130]. As such, studies typically do not extend beyond ten days [293, 294], limiting their relevance as models for chronic exposure. It has been suggested that biologically softer material could favor more rhythmic activity [109] although it may be material dependent [272]. Traditional *in vitro* systems also do not replicate the native tissue architecture or extracellular microenvironment of the heart, both of which are known to regulate myocyte phenotype [295, 296]. Furthermore, studies with animals and animal-derived cells are not always relevant to humans due to species-dependent differences [297], indicating a need to develop *in vitro* systems that are compatible with human-derived cardiac myocytes [260]. A lot of effort has been made to ameliorate *in vitro* models including several *in vitro* platforms for engineering neonatal rat cardiac tissues with simultaneous quantification of contractile function in response to variables such as tissue architecture [295, 298], mechanical stretch [299], electrical stimulation [300] or gelatin hydrogels developed as muscular thin film substrates [301].

Studying multicellular electrophysiological and contractile properties and techniques that can favor the automaticity of the process is needed to assess drug effects; helping in simplifying

the screening process. Techniques for imaging contractile activity has been developed for decades including approaches to measure spontaneous rhythms in culture [302] to study the frequency and stability of the contractile activity [272]. Less costly and more easily distributed imaging chip-scale lensless wide-field-of-view microscopy imaging techniques have been proposed which can render microscopy images of growing or confluent cell cultures [303]. Long-term culture of engineered animal and human cardiac tissues coupled to less invasive data recording on activity and contractility to better predict adverse or functional effects of drugs on the heart is highly desirable.

The aim of this project is to find a way to automate the detection of abnormalities during the development and optimization of the engineered patches. We think that by using an automated process, we can detect and react faster if the conditions are changing in the cultured cells. This way we make that the graft tissue in production is well monitored and developed according to the required specifications. In this study, we present new approaches that use the videomicroscopy video to study contractile properties of beating cells in culture. Two new variables are proposed which are linked to the contraction dynamics and are dependent on the frequency. Methods for evaluation of regional synchronicity within the imagined field of view are also presented that can swiftly determine regions with abnormal activity or heterogeneity in contraction dynamics.

Methods

Cardiomyocyte isolation procedure

All animal-handling procedures were concordant with the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the institutional Animal Research Ethics Committee. Isolation was performed according to the protocol of the neonatal cardiomyocyte isolation kit from Worthington. In summary, one to three days old rats (Sprague-Dawley, Charles River) were sacrificed by decapitation. Beating hearts were removed from the rats and immediately put in cold Ca^{2+} and Mg^{2+} -free Hank's Balanced Salt Solution. Ventricular muscle was selected by excision and tissue was minced on ice into 1-3 mm³ pieces. The mixture was subjected to purified enzymatic digestion (trypsin and collagenase). Isolated cells (enriched cardiomyocytes) were counted and seeded at a density of 10^6 cells/mL in the seeding area of the membrane pre-coated with 0.2 % porcine-derived gelatin (G1890, Sigma) and 0.00125 % fibronectin solution (F1141, Sigma). Cells were grown for 24 hours in DMEM (319-050-CL, Wisent) with 5 % fetal bovine serum (FBS, SH30396.03, Fisher Scientific Co. Ltd) and 1 % penicillin/streptomycin (450-201-EL, Wisent). Cardiomyocytes were then FBS starved with 1 % penicillin/streptomycin in DMEM 24 h prior to the experiments.

β -adrenergic stimulation

Acute effects of the β -adrenergic agonist, isoproterenol (ISO, I6504, Sigma-Aldrich) was studied by videomicroscopy with final concentration of 100 nM at 1 minute after injection.

Videomicroscopy recording

Phase contrast videos of neonatal cardiomyocytes were acquired after 48 hours post seeding *in vitro* with a Dalsa HM640 camera ($N_y = 640 \times N_x = 480$ pixels) at rates of 30, 50, or 100 fps coupled to an inverted Nikon optical microscope (10X magnification). The field of view (FOV) covered by the camera was 0.44 mm by 0.33 mm.

Mathematical models of rat neonatal cardiomyocyte electrophysiology and contraction

A neonatal rat ventricular myocyte (NVRM) mathematical ionic model [304] has been modified. The original spatial discretization implemented to study the effect of hypertrophy on calcium handling has been replaced by the common-pool calcium handling of the mouse neonatal cardiomyocyte model [305].

The pacemaker current (I_f) activation and time constant dynamics have been fitted based on published data [306]. Detailed changes can be found in table S1. The maximum conductance of I_f has also been changed from 0.021 mS/ μ F to 0.06 mS/ μ F [306]. The potassium transient outward current (I_{to}) activation and inactivation have been modified to fit the data published by Wickenden *et al* [307]. The modified rat neonatal ventricular cardiomyocyte ionic model has been coupled to the Rice *et al* [308] cardiac myofilament model for contraction simulation.

The complete model was numerically integrated in Matlab (R2008, MathWorks Inc., Natick, MA) using a simple Euler integration scheme with a constant 20 μ s time step.

Statistical analysis

All statistical analyses have been done in R (version 3.1.3). Linear regression was used to test for variable dependency on period of activity. The analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare group and covariate effects. Means were compared with Students t-test.

Analysis approach and results

Studying the global contraction characteristics

The proposed initial approach is using the raw video signal and calculating for each pixel the difference between frames separated by a delay corresponding to a defined frame interval.

Let $M(t)$ be the global camera frame recorded at time t . The composite signal ΔS is calculated using the following equation:

$$\Delta S(t) = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} \left| \frac{M_{i,j}(t) - M_{i,j}(t-\tau)}{\tau} \right|, \quad (1.1)$$

where τ is a discrete delay (or interval between frames), N_y and N_x are respectively the number of horizontal and vertical pixels. An example of the composite signal ΔS is shown in fig. 1 for different delay ($\tau = 1, 4$, and 8). The shortest delay $\tau = 1$ corresponding to a frame by frame difference shows the highest noise level (panel A) while increasing τ to 8 decreased the amplitude difference between the high (contraction) and low (relaxation) amplitude peaks (panel C).

Link between videomicroscopy signal and cellular contraction

In silico data and analysis reveal that the composite signal ΔS calculated from eq. (1.1) can be interpreted as follow. The absolute derivative of the time-dependent cell length calculated from simulated sarcomere length (SL) obtained from the simulation is given by

$$dSL_{abs}(t) = \left| \frac{dSL}{dt} \right| \quad (1.2)$$

where SL is the sarcomere length obtained by simulating the Rice *et al* model [308]. The change in SL calculated with the contraction model only is presented in fig. 2A. The time derivative of this contraction signal is depicted in panel B which shows the initial fast contraction (negative derivative) followed by the slower positive relaxation signal. As shown in fig. 2C, there is a clear similarity between the rectified derivative given by eq. (1.2) and the videomicroscopy signal obtained with eq. (1.1) as shown in fig. 1A and 3A (highlighted in the inset of panel A).

Two specific measures are proposed that are presented in fig. 2D which corresponds to the amplitude ratio between the contraction and relaxation peaks ($\text{Ratio}_{C/R}$) and the time between the contraction and relaxation peaks (Δ_{R-C}). The effects of the calcium transient amplitude on

contraction signal and specific measures is shown in fig. 2D which highlights the sensitivity of the measures on calcium transient changes. Two different calcium concentration amplitudes were simulated corresponding to 1.0 and 1.45 $\mu\text{mol/l}$ resulting to respectively the lowest and highest signal. A decrease in maximum $[\text{Ca}^{2+}]$ from 1.45 to 1.0 $\mu\text{mol/l}$ yielded an increase of 7% in $\text{Ratio}_{\text{C/R}}$ but a decrease of 54% in $\Delta_{\text{R-C}}$.

Automatic discrimination between contraction and relaxation peaks is important in the perspective of user-friendliness and for the approach to have a clear potential in a high throughput screening/testing system. Three conditions are being used to detect and validate classification of the peaks: 1- there is alternance between contraction and relaxation peaks, 2- clusters are usually separated in the variable space given by the time difference between peaks ($\Delta t_{\text{markers}}$) and amplitude of the peaks (ΔS_{peaks}) as depicted in fig 3B, 3- sharpest peaks are found for contraction and widest peaks for relaxation resulting in greater amplitude loss around the maximum ΔS peak amplitude. The last condition can be easily evaluated by taking the amplitude for 1 sample and 2 samples around the maximum amplitude of the peak divided by the peak amplitude ($\text{Ratio}_{\text{drop}}$). The obtained data are presented in panel C where a lower average $\text{Ratio}_{\text{drop}}$ is found for the contraction peaks (left circles; 0.77 ± 0.03 n.u. and 0.40 ± 0.06 n.u.) compared to the relaxation peaks (right dots; 0.92 ± 0.02 n.u. and 0.78 ± 0.04 n.u.).

Changes in contraction measures as a function of spontaneous activity period

An example of an analyzed acquisition is presented in fig. 4. The signal ΔS is shown in panel A with detected peaks (red circles) and resulting classification highlighted for contraction (red dotted lines) and relaxation peaks (red dashed lines). The resulting series of activity shows a constant period T (panel B: 0.64 ± 0.01 s) and almost no variation in $\Delta_{\text{R-C}}$ (panel C: 0.22 ± 0.01 s). However, $\text{Ratio}_{\text{C/R}}$ shows greater variability between samples (panel C: 1.89 ± 0.06 n.u.) mainly due to variations in the maximum amplitude of the contraction peaks as seen on the signal in panel A.

A set of samples ($n = 29$) has been analyzed. For each video of 30 s duration, the average values $\langle T \rangle$, $\langle \Delta_{R-C} \rangle$, and $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$ were calculated as the average of the temporal values obtained from the signal analysis of individual acquisitions. A clear monotone increase in $\langle \Delta_{R-C} \rangle$ with increasing $\langle T \rangle$ is depicted in fig. 5A with $\sim 40\%$ change between the minimum and maximum values. The linear regression ($p < 0.001$) has a slope of 0.072 s/s (represented as a red line) and intercept of 0.166 s. As expected, the variability is greater for $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$ but a trend towards an increasing ratio as $\langle T \rangle$ augments is revealed. However, the variation with the period is less with $\sim 23\%$ changes between the minimum and maximum values in the dataset (see fig. 5B). The fitted regression line ($p < 0.005$, red line on the panel) has a slope of 0.276 s^{-1} and an intercept of 1.93.

Comparison with simulation data

Steady-state simulations of the combined neonatal rat cardiomyocyte ionic model coupled to the contraction model (fig. 6) have been done for comparison purposes with the experimental data from fig. 5. Similar to the experimental data, $\langle \Delta_{R-C} \rangle$ augments with $\langle T \rangle$ increasing (fig. 6A). However, the range of variation is slightly lower than in the experiments. The $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$ has an inverse behaviour compared to experimental data shown in fig. 5B with decreasing ratio for increasing $\langle T \rangle$ and over a wider range (fig. 6B). The causes of this difference remain to be elucidated but we think that a decreasing $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$ indicates that the relaxation is more efficient and the contraction-relaxation tends to a nearer 1:1 ratio while the contractile frequency slows down. Consequently, factors that will impact the flexibility of the cell, like stiffness of the substrate, will also affect its ability to get to a fully relaxed state while a mathematical model wouldn't have this limitation.

Influence of β -adrenergic stimulation on $\langle \Delta_{R-C} \rangle$ and $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$

The variation in the contraction measures that can be evaluated by our videomicroscopy approach has been tested with isoproterenol (ISO), a β -adrenergic agonist. Results are presented in fig. 7. As expected, the period of activity is significantly decreased by ISO

compared to CTL (0.9±0.6 s vs. 1.9±2.4 s in CTL, p<0.05). Similar variation of $\langle\Delta_{R-C}\rangle$ is revealed between the CTL and ISO groups as a function of $\langle T\rangle$ although $\langle T\rangle$ is in average smaller with ISO as expected (panel A). Interestingly the $\langle\text{Ratio}_{C/R}\rangle$ showed statistically significant $\langle T\rangle$ and group effects with p<0.001. The slope of the linear regression being larger for the ISO group compared to CTL (0.146 for CTL vs. 0.490 for ISO).

From global to regional analysis

All the previous analyses presented in this study are based on a global composite signal calculated using the entire FOV. The same approach can be used for sub-regions of the FOV by calculating a composite signal for each section. We present here two additional approaches aiming to study spatial-temporal differences in videomicroscopy signals.

Finding areas with non-correlating activity

The first approach is based on determining how local signals correlate with the global composite signal. The local composite signals are calculated over sub-regions of $N_{sub,x}$ and $N_{sub,y}$ pixels from the total FOV with eq. (1.3) (similar to eq. (1.1)).

$$\Delta S_{x',y'}(t) = \frac{1}{N_{sub,y}N_{sub,x}} \sum_{u=1}^{N_{sub,y}} \sum_{v=1}^{N_{sub,x}} \left| \frac{M_{u+N_{sub,y}(y'-1),v+N_{sub,x}(x'-1)}(t) - M_{u+N_{sub,y}(y'-1),v+N_{sub,x}(x'-1)}(t-\tau)}{\tau} \right| \quad (1.3)$$

where $N_{sub,y}=N_{sub,x}=10$, $M(t)$ is the movie frame at time t , u and v are the local coordinate within a sub-region of the FOV and x' and y' are the new position within the segmented FOV (such that $x'=1$, $y'=1$ is the first pixel of the new video calculated from on the individual signals of the pixels $y=1$ to 10 and $x=1$ to 10 from the original video).

The energy (E) of the local composite signals are calculated using :

$$E_{x',y'} = \frac{1}{N_t - \tau} \sum_{t=\tau}^{N_t} \left(\frac{d\Delta S_{x',y'}(t)}{dt} \right)^2 \quad (1.4)$$

where N_t is the number of frames of the original video. An example of the spatial distribution of $\log(E_{x',y'})$ is displayed in fig. 8A and the corresponding graphic curve can be found in panel B. High energy regions of the FOV are selected using a thresholding approach.

The correlation coefficient (CC) and lag between the global signal $\Delta S(t)$ and local composite signals $\Delta S_{x',y'}(t)$ are calculated. An example of the resulting map of coefficients and lag are respectively depicted in fig. 8C and D after keeping pixels with $\log(E) > 6$. Signals are less important when E is small because it indicates that there is not much movement in this area. This can be explained by a cell density slightly under 100 % and the presence of fibroblast (which doesn't contract) in our cell cultures. In this example, most of the relevant section of the FOV have a correlation coefficient greater than 0.8 and a lag of 0 sec which indicates that the local activity is highly similar between these regions and the global activity. However, some regions show lower correlation including regions with a correlation value of less than 0.4 (regions labelled sub 1 and 2 in panel C). Interestingly, these regions have also non-zero lags. Using a thresholding approach on the correlation coefficient map, two corresponding clusters of low correlation with high energy can be detected and the average signal from these clusters are shown in panel E. The signals in both sub 1 and 2 regions (red line) have strong peaks usually not occurring simultaneously with the global composite signal (blue dotted line). Please note that lower amplitude peaks are also found in this signals that correlate with the global activity.

Digging deeper in acquisitions with complex global signal

Conditions that alter the development and function of cultured monolayers can affect their spatio-temporal activity. Confluent monolayers usually show consistent and relatively stationary signals with common contraction/relaxation peaks as shown in fig. 3A. However,

more complex global composite signals can be found such as multiple peak complexes as seen in fig. 9A.

In order to investigate the causes of these complex patterns, a thresholding on the energy was done as previously illustrated (map of $\log(E)$ is shown in panel Bi after thresholding with $\log(E)>4$). Calculation of the correlation coefficient with the global composite signals does not highlight important regions with low correlation coefficient (panel Bii). However, calculating the correlation coefficient and lag between cluster signals (from the average $\Delta S_{x,y}(t)$ of each cluster) results in the matrix plot shown in panel C (correlation coefficient) and D (lag). Both panels highlight a clear difference in correlation and lag between cluster 5 and the others (labelling of the clusters can be found on the map showing the correlation coefficient between cluster 5 and others in panel Biii).

The causes of the correlation differences can be investigated by further studying the differences in the cluster $\Delta S_{x,y}(t)$ signals represented by a grayscale in panel E. A closer look at the maps shows that synchronisation between cluster 5 and the others varies over time with almost simultaneous activity within the orange dashed rectangle (which has a corresponding normal double peak feature in the global signal shown by the blue line). However, the complex multi-peaks section encompassed within the red dashed rectangle corresponds to an earlier contraction in cluster 5 (with delays between cluster 4 and 5 of 100 ms and 160 ms for the 2nd and 3rd beats in the rectangle). The non-stationary aspect of the global signal can thus be understood by a change in timing of cluster 5 activity in respect to other clusters where the abnormal added peaks are found when a long delay between cluster contractions occurs. Depending on signal quality, the contraction/relaxation analysis approach presented in the first part of this article could be done on cluster signals to extract and compare temporal activity variations.

Discussion and conclusion

In this study, we proposed novel approaches to study beating dynamics in cell culture. To our knowledge, the main contractility analysis method described herein is the first to our knowledge to study the contractility characteristics based on monolayer videomicroscopy data. Indeed, previous methods focussed mainly on period/frequency of activity [302, 309]. Based on a simple composite signal calculated as the variation in pixel intensity, two main variables can be determined: the time difference (Δ_{R-C}) and the ratio between the contraction and relaxation peaks $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$. These new variables could be more reliable to determine toxic effects on cardiomyocytes more importantly regarding heart failure risk since it is known that doxorubicin, by example, will have a direct or indirect impact on calcium homeostasis which is related to contraction-relaxation. Doxorubicin alters the expression and activity of calcium regulatory proteins like SERCA2a [310]. Both variables were found to be dependent on the period of activity (as shown in fig. 6). Comparison with simulation results show similarities between simulation and experimental data for the time intervals between peaks ($\langle \Delta_{R-C} \rangle$). Surprisingly, while experimental data show an increasing ratio of amplitude with increasing periods of activity, simulation results had a decreasing ratio with increasing periods. The mathematical modeling assumed an isotonic contraction [308] while a confluent monolayer should probably be a mixed condition between isometric (on a stiff cell culture substrate) and isotonic on the free top side of the cells. The exact link between the contraction waveform and the actual change in contraction measures obtained from the composite signal requires further investigation.

The proposed approaches are interesting with limited impact on the beating cells as proposed previously [309, 311] except for the illumination duration. Light impact on cellular process can be decreased by limiting exposure and careful selection of wavelength bands to favor contrast but it is believed to be minimal [302]. Although extension to lens-free CMOS imaging remains to be tested, our method can be adjusted to cover various scales of field of view. The limited time resolution due to the relatively low fps from a reasonably priced sensor could be a limitation. However, even a slow frame rate of 30 fps (as used for the CTL vs ISO experiments) showed a significant difference in the proposed contraction measures. Recent

development in imaging technology and communication hardware with off-the-shelf USB 3.0 cameras open the way to greater than 50 fps simple sensor. Even the Raspberry Pi camera module can now allow up to 90 fps with VGA resolution (640×480 pixels) opening the way to simple low cost high throughput parallel screening.

The proposed alternative methods described here that aim to study heterogeneity in contraction signals are interesting as they can estimate cell culture characteristics impossible to study directly with classical methods [302, 309]. Here, detection of localized abnormal activity (compared to the global activity) could also be a measure of cell deterioration. Moreover, the change in synchronisation between regions, an important variable that can be linked to intercellular coupling and be a factor favouring arrhythmia, can be evaluated. As such, actual application of these approaches and evaluation of their relevance as appropriate biomarkers of new drug cardiotoxicity could be of interest.

Acknowledgment

We are grateful to Jonathan Ledoux for the helpful discussions.

Figure and figure captions

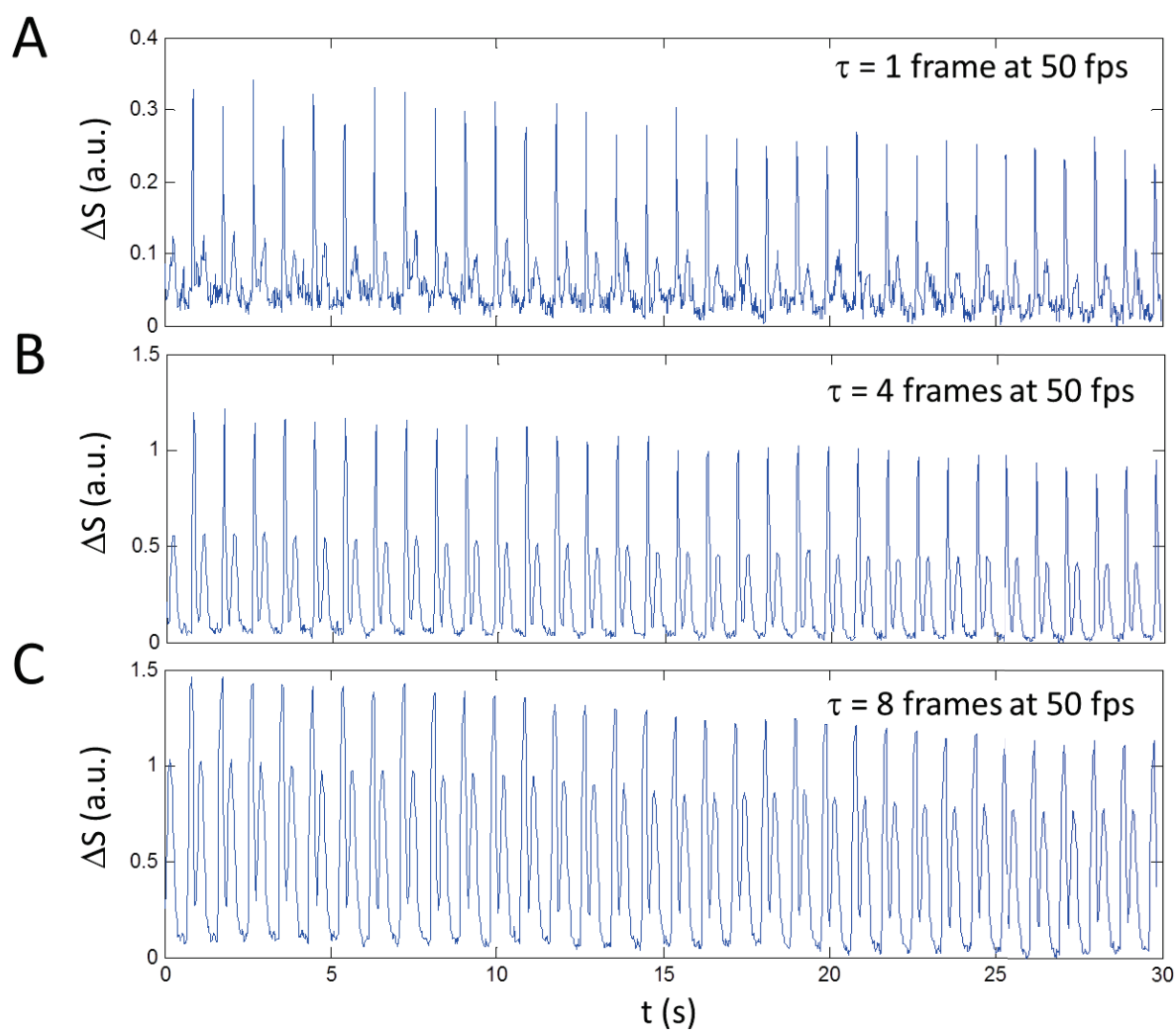


Figure 1: An example of composite signals ΔS obtained with different delay between frames

A) $\tau = 1$ frame, B) $\tau = 4$ frames, and C) $\tau = 8$ frames. The video was recorded at 50 fps.

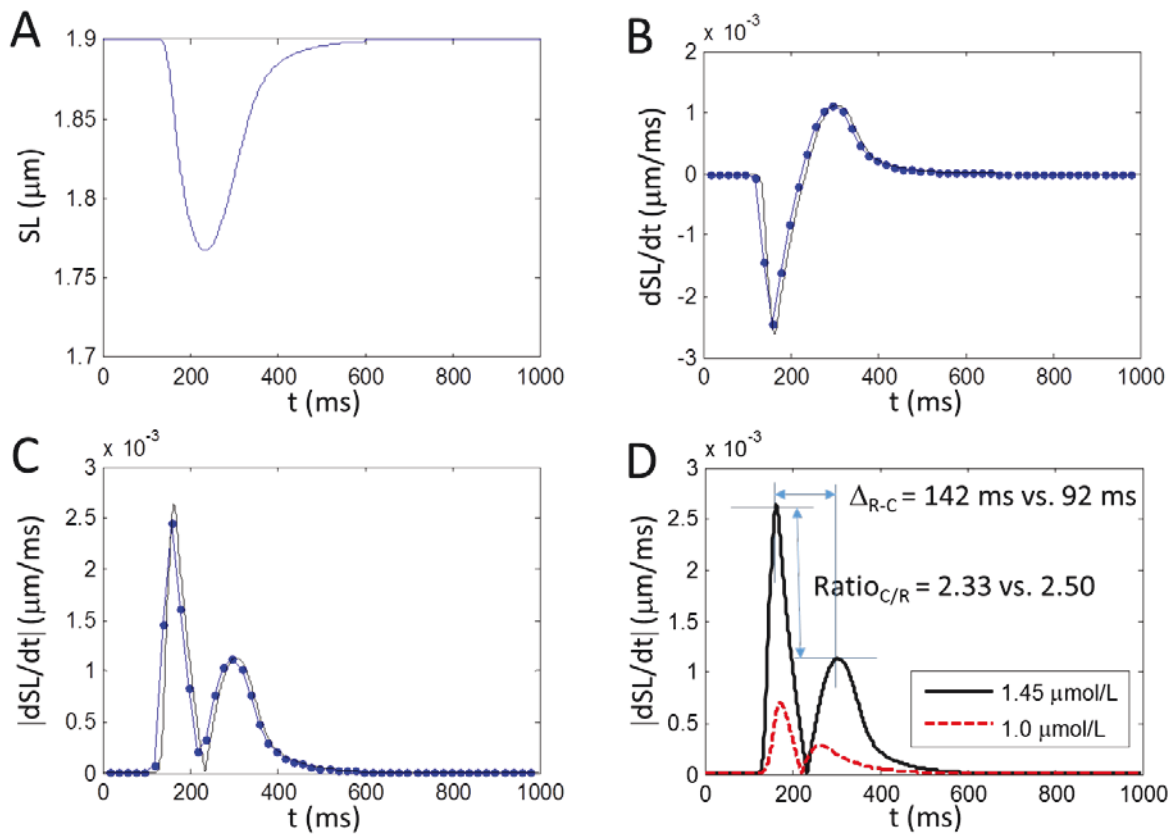


Figure 2: Simulation of contraction and the link to the composite signal ΔS

A) Shortening of the sarcomere length (SL) as a function of time using the contraction model only (uncoupled from the neonatal cardiomyocyte ionic model) using a simulated calcium transient with amplitude of $1.45 \mu\text{mol/L}$. B) The time derivative of SL with a $\Delta t = 0.01 \text{ ms}$. The dots correspond to the derivative calculated with a sub-samples signal corresponding to 50 fps. C) Rectified signal of panel B showing double peaks corresponding to the contraction and relaxation phases. D) Explanation of two specific measures (Δ_{R-C} and $\text{Ratio}_{C/R}$) obtained from two different calcium amplitudes ($1.0 \mu\text{mol/L}$ and $1.45 \mu\text{mol/L}$). A lower $[\text{Ca}^{2+}]$ amplitude leads to a decreased Δ_{R-C} and increased $\text{Ratio}_{C/R}$.

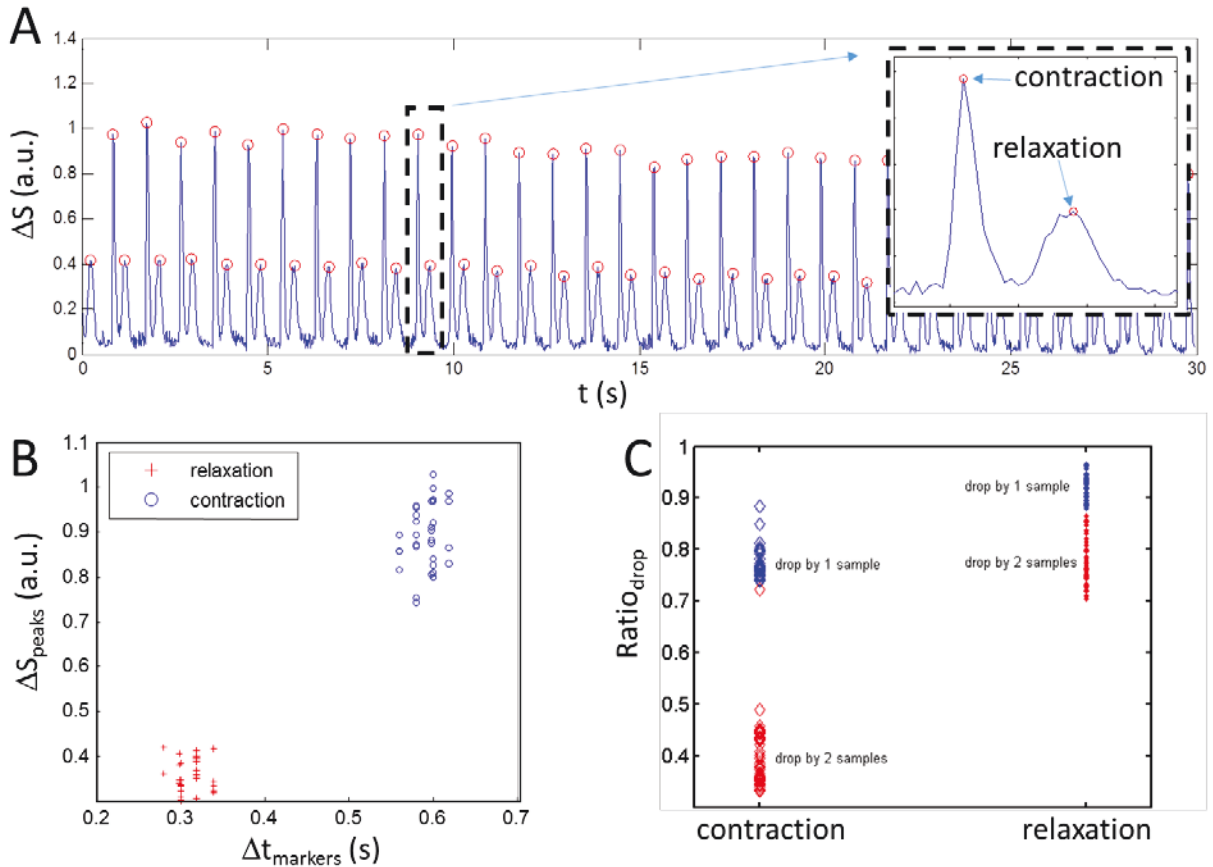


Figure 3: Classification of ΔS peaks

A) An example of composite signal ΔS with detected peaks (red circles) showing alternation between high amplitude and low amplitude peaks. Inset: blow up of the activity within the dashed black rectangle which highlights the high amplitude contraction peaks followed by the lower amplitude relaxation peak similar to the derivative of the simulated contraction model.

B) Contraction and relaxation clusters are relatively well separated when viewed in the space with x-axis being the time between markers and y-axis being the peak amplitude (ΔS_{peaks}).

C) Estimation of the change in ΔS around the peaks given by the $Ratio_{drop}$ (amplitude of 1st and 2nd samples around the peaks divided by the peak amplitude). Lower ratio $Ratio_{drop}$ is linked to faster change in ΔS around the peaks for the contraction peaks compared to the relaxation.

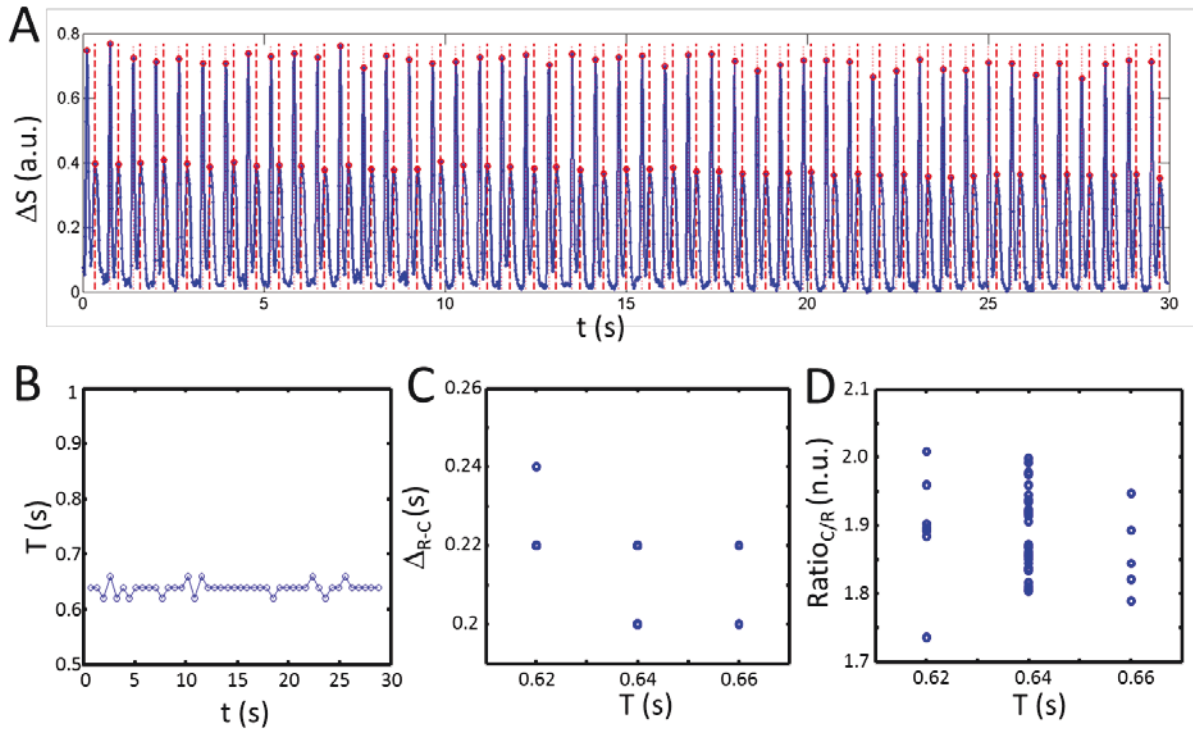


Figure 4: Temporal variation in activity obtained by analysis of ΔS with 50 FPS

A) The composite signal obtained for a representative sample (blue line). Detected peaks are highlighted by red circles. Post classification results are shown by dotted red lines (contraction peaks) and dashed red lines (relaxation peaks). B) The period of activity given the time difference between contraction peaks shows a constant period of activity. C) Calculated Δ_{R-C} as a function of the period of activity (corresponding here to the time spent since the last contraction) is only varying by \pm one sample. D) $\text{Ratio}_{C/R}$ is more varying compared to Δ_{R-C} .

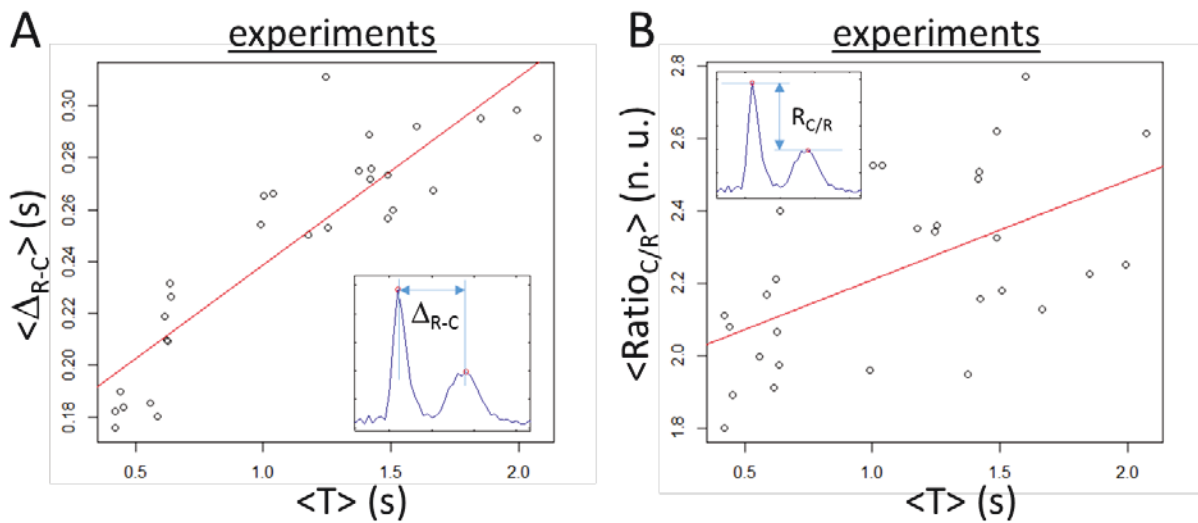


Figure 5: Experimental data obtained for control samples

A) Mean temporal Δ_{R-C} ($\langle \Delta_{R-C} \rangle$) is increasing when the mean T ($\langle T \rangle$) is augmenting. The red line corresponds to the linear regression fit (slope of 0.072, $p < 0.001$, corr. = 0.89). B) Mean $\text{Ratio}_{C/R}$ ($\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$) as a function of $\langle T \rangle$ showing a slight augmentation with increasing $\langle T \rangle$. The linear regression line (red line) has a slope of 0.276 ($p < 0.01$, corr = 0.56).

T: period.

Δ_{R-C} : the time between the contraction and relaxation peaks.

$\text{Ratio}_{C/R}$: amplitude ratio between the contraction and relaxation peaks.

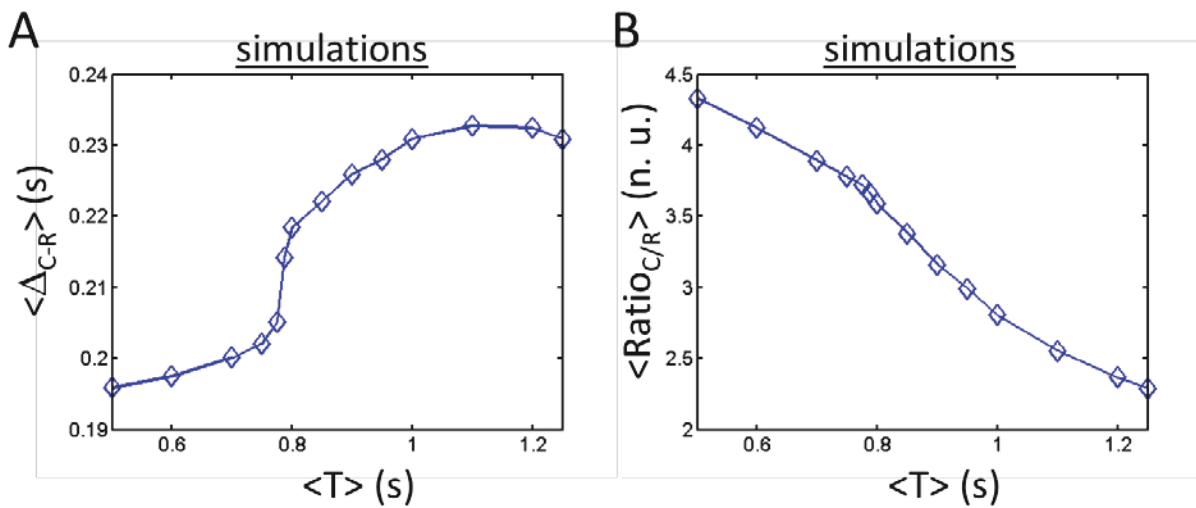


Figure 6: Data obtained with simulation results

A) Increasing $\langle \Delta_{R-C} \rangle$ with augmentation of $\langle T \rangle$. B) Decreasing $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$ with increasing $\langle T \rangle$ which is the inverse of the experimental result.

T: period.

Δ_{R-C} : the time between the contraction and relaxation peaks.

$\text{Ratio}_{C/R}$: amplitude ratio between the contraction and relaxation peaks.

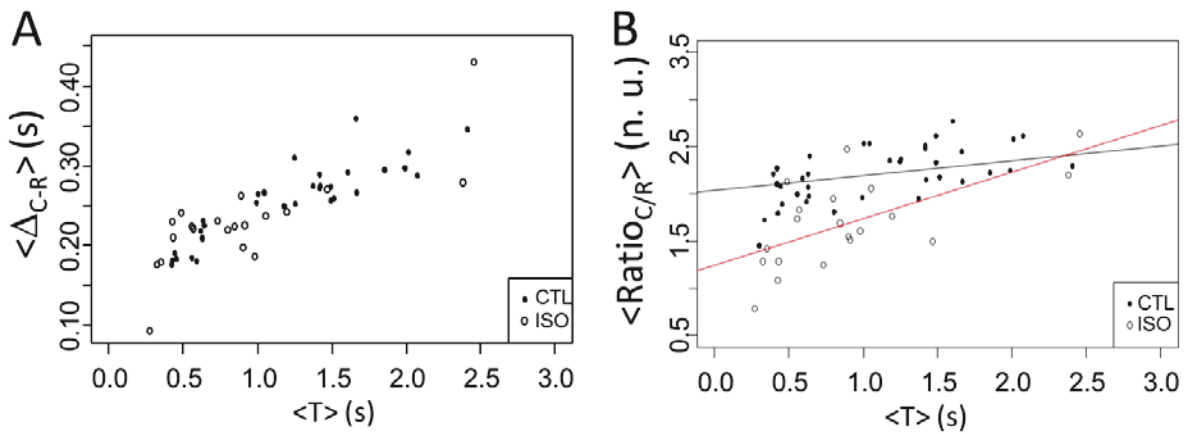


Figure 7: Comparison between CTL (black points) and ISO (white circles) contraction results

A) $\langle \Delta_{R-C} \rangle$ as a function of $\langle T \rangle$ does not show dissimilarity between groups. B) $\langle \text{Ratio}_{C/R} \rangle$ as a function of $\langle T \rangle$ differs between CTL and ISO with both a significant $\langle T \rangle$ and group effects. T: period.

Δ_{R-C} : the time between the contraction and relaxation peaks.

$\text{Ratio}_{C/R}$: amplitude ratio between the contraction and relaxation peaks.

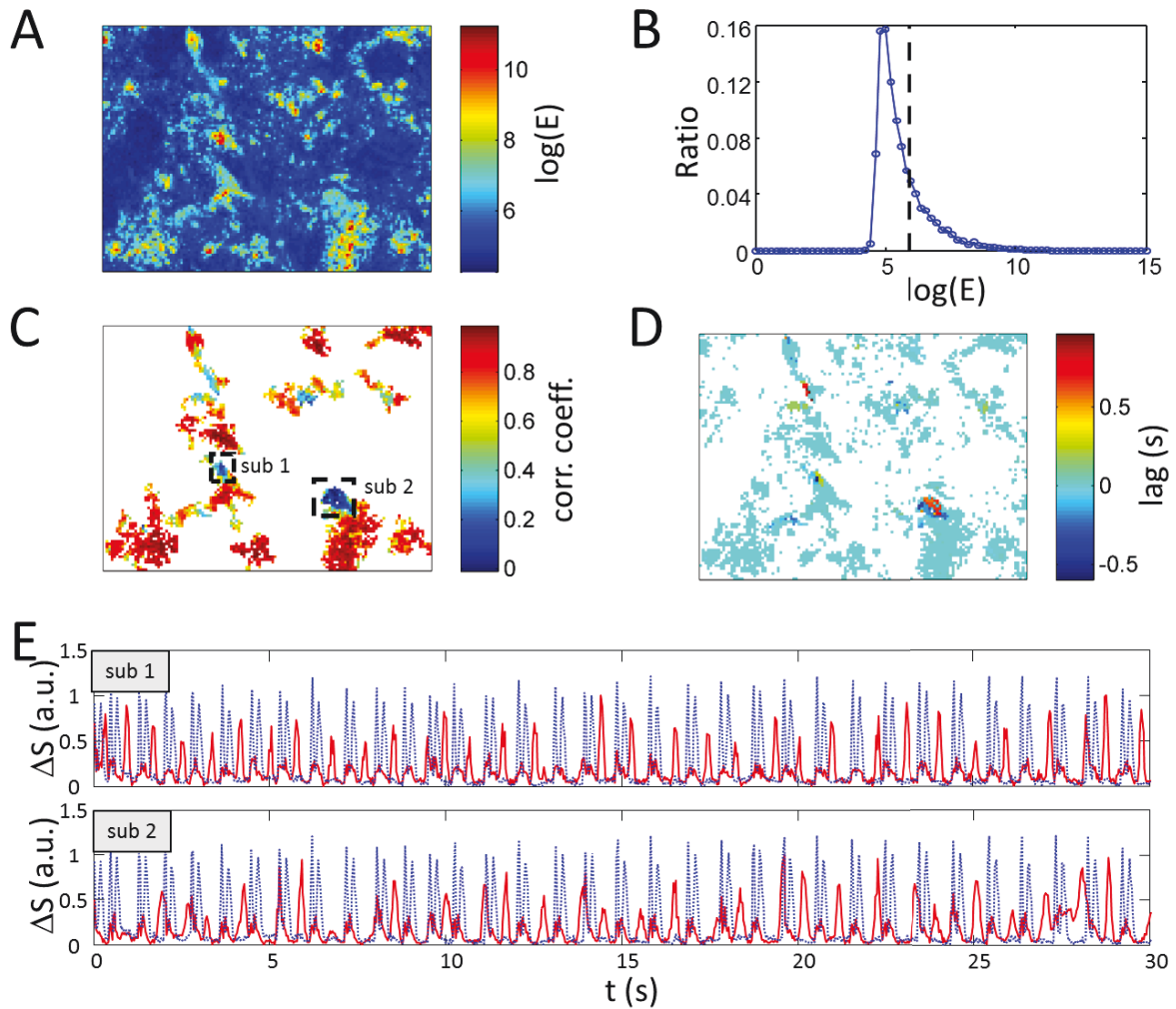


Figure 8: Estimation of heterogeneous contraction rhythms within the FOV

A) Map of $\log(E)$ with the energy E calculated from eq. (1.4) showing area with no contraction signal in blue. B) Graphic curve of $\log(E)$ with the dashed line representing the threshold ($\log(E) > 6$) use to select high energy signal regions. C) Maximum correlation coefficient and D) lag between local $\Delta S_{x',y'}(t)$ and global $\Delta S(t)$ for regions having $\log(E) > 6$. Two low CC regions labeled sub 1 and sub 2 are highlighted. Most of the regions show high CC with 0 s lag. E) Signal from region sub 1 (top axes) and sub 2 (bottom axes) showing the low CC (shown as red lines vs. global ΔS as dotted blue lines) and global ΔS .

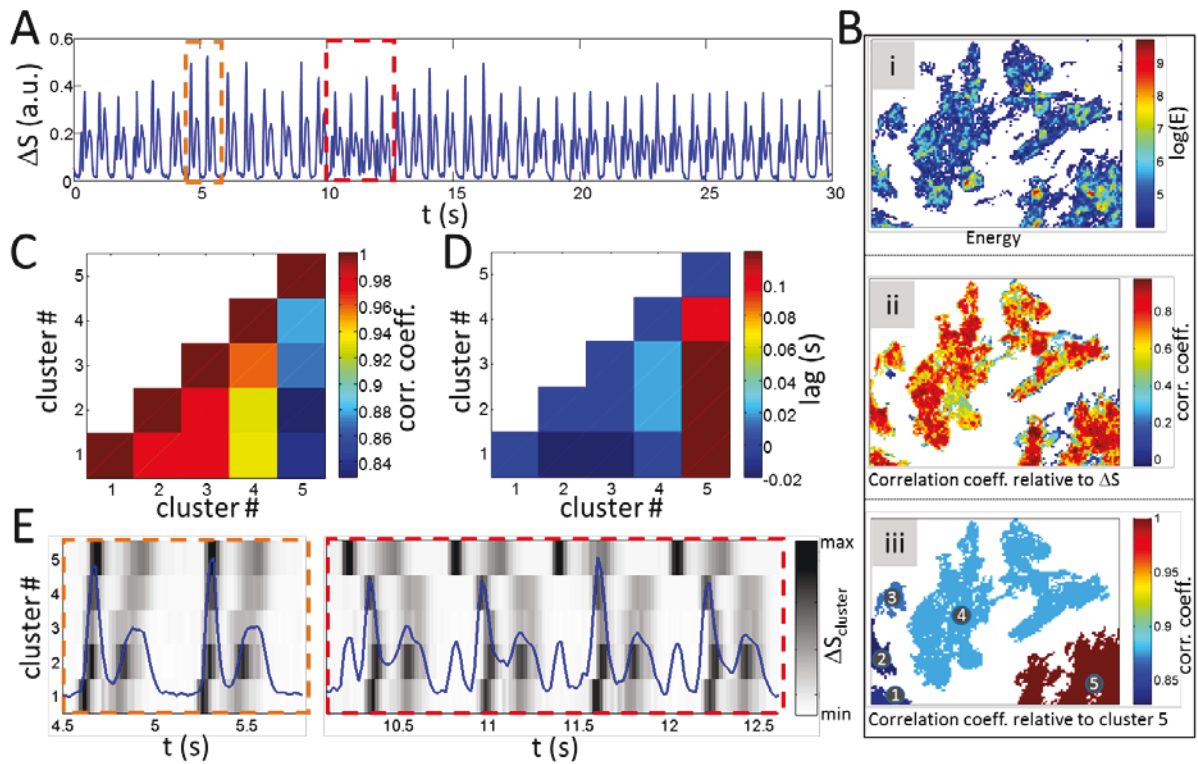


Figure 9: Analysis of a complex global ΔS

A) Example of a non-stationary global signal with time intervals where multiple peaks (different to the contraction/relaxation peaks usually found). Two intervals are highlighted by dashed rectangles with the orange one showing the normal double peak signal and the red rectangle with multiple peaks. Bi) Map of $\log(E)$ after thresholding ($\log(E) > 4$). Bii) CC between individual cluster signals and global ΔS . Biii) Labeled separated clusters with colorscale representing the CC between cluster 5 and other clusters. C) Matrix of CC between clusters (1-5) with diagonal equal to 1 and D) lag for maximum CC. Minimum CC and maximum lag is found between cluster 5 and all 4 other clusters. E) Cluster ΔS signals for the 5 within the two time intervals highlighted by rectangles in panel A is shown by a grayscale (peaks are darker and lower values whiter). The global ΔS is plotted in blue on top for comparison.

Table S1. Ion current-related modifications to the neonatal ventricular myocyte mathematical model

Current	Formula Description	Formula	Korhonen et al	Modified Korhonen
Pacemaker current (I_f) [306]	Activation	$y_{inf} = 1/(1+\exp((V+a)/b))$	a = 78.65 b = 6.33	a = 79.8 b = 8.666
	Time constant	$\tau_{uy} = 1/a1*\exp((V+b1)/c1) + a2*\exp((V+b2)/c2)$	a1 = 0.11885 b1 = 75 c1 = 28.37 a2 = 0.56236 b2 = 75 c2 = -14.19	a1 = 0.6155 b1 = 99.55 c1 = 28.36 a2 = 0.03397 b2 = 32.55 c2 = -14.2
Transient outward current (I_{to}) [307]	Activation	$r_{inf} = 1/(1+\exp((V-a)/b))$	a = 3.557 b = -14.613	a = 13.13 b = 13.88
	Inactivation	$s_{inf} = 1/(1+\exp((V+a)/b))$	a = 31.972 b = 4.643	a = 33.25 b = 5.936
	Slow inactivation	$sslow_{inf} = 1/(1+\exp((V+a)/b))$	a = 31.972 b = 4.643	a = 43.84 b = 3.684

Discussion

L'objectif global de mon projet de recherche était d'étudier l'impact fonctionnel des différents stimuli de l'environnement cardiaque afin de définir des conditions optimisées pour la fabrication de tissu de remplacement par génie tissulaire. J'ai donc présenté les étapes de la création et du développement d'un bioréacteur permettant la culture optimisée de cellules cardiaques par l'utilisation d'un substrat de culture d'une rigidité similaire aux conditions retrouvées *in vivo*, de l'insertion de diverses stimulations (électrique et mécanique) et finalement par l'élaboration d'algorithmes afin de suivre l'évolution et de déceler de potentielles anomalies dans l'activité contractile du feuillet cellulaire en cours de production et d'optimisation.

6.1. Choix du substrat : importance d'opter pour un composé biomimétique

Pour débiter, nous avons mentionné l'importance de bien choisir le support de culture à utiliser et l'impact que ce choix a sur la physiologie de cellules de rats néonatales en culture. En effet, les résultats de l'étude d'Engler et collaborateurs ont révélé, comme les résultats de notre étude l'ont fait, qu'il existerait un intervalle de rigidité qui favoriserait la dégradation des sarcomères et des costamères qui sont toutes deux cruciales à la structure du cardiomyocytes [130]. Nous avons obtenu une augmentation de l'instabilité temporelle et spatiale lorsque les cellules étaient cultivées sur un support plus mou. Il a été démontré que l'akinase 1 activée par p21 (PAK1) est impliquée dans la détection de l'orientation par rapport à la rigidité du substrat cellulaire et modifie le degré d'extension des cellules [312]. De plus, PAK1 est requis pour maintenir l'homéostasie calcique et la stabilité électrophysiologique [313]. Cela suggère donc que PAK1 aurait un rôle à jouer et pourrait expliquer nos résultats sur l'instabilité spatiotemporelle mesurée sur des supports de différente rigidité".

Nous avons également observé une augmentation de l'incidence des activités de type réentrées pour les cardiomyocytes de rats néonataux en culture sur un support en verre (très rigide) par rapport aux cardiomyocytes en culture sur support de PDMS (rigidité faible). Cette augmentation des cas de réentrées peut possiblement s'expliquer par le fait que comme le support est rigide, ce sont les protéines d'adhésion voir la membrane cellulaire qui vont se déformer. L'étirement des protéines d'adhésion mène à l'exposition de certains sites qui déclenchent des cascades d'activité et qui, par combinaison d'un ensemble de facteurs réunis, pourrait augmenter la sensibilité de la cellule à être activée précocement et ainsi expliquer la plus grande incidence de réentrées sur le support très rigide. De plus, il est important de mentionner qu'en déformant la membrane, nous exerçons un effet sur les canaux sensibles à l'étirement et que lorsque ces derniers sont activés, il est connu qu'ils peuvent induire de l'activité électrique et donc devenir une source potentielle d'activation précoce causant les réentrées observés. De plus, lorsque les conditions du microenvironnement changent, cela induit une perturbation des dynamiques calciques pouvant conduire à des arythmies tel que démontré par Nemeč et collaborateurs qui ont associé le relargage anormal du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et l'arythmie [314].

Nous avons également observé, lors d'expériences de vidéomicroscopie mesurant l'activité autonome contractile des cardiomyocytes en culture, un nombre de pauses plus élevé pour le support constitué de PDMS 1:20. La différence est même significative avec le support en PDMS 1:40. Notre compréhension de ce résultat serait que lorsque les conditions de culture se rapprochent de l'environnement biomécanique physiologique *in vivo*, cela stabilise leur activité autonome contractile et donc conséquemment, diminue le nombre de pauses observées. Ceci est également supporté dans une étude de Jacot et collaborateurs qui montre que les transitoires calciques, les réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique et l'expression de l'ATPase2a dans le réticulum sarcoplasmique et endoplasmique étaient plus importantes lorsque les cardiomyocytes de rats néonataux étaient mis en culture sur un substrat de rigidité se rapprochant des conditions physiologiques (environ 10 kPa) [161].

De plus, cette instabilité temporelle et spatiale corrélait avec une diminution quoique non-significative de l'expression de Cx-43. Cela resterait à confirmer, mais en ayant moins de jonctions communicantes entre les cellules, il s'ensuit une moins bonne connectivité du tissu et nous voyons ainsi apparaître une plus grande instabilité dans l'activité autonome. Ceci est supporté par une étude de Fromaget et collaborateurs qui montrent que la Cx-43 est importante dans le propagation du signal entre les cellules [315]. Nous avons également observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de HCN2. Une augmentation de HCN2 peut exprimer une plus grande différenciation en cellules de type « *pacemakers* » tel que supporté par plusieurs équipes de chercheurs [316, 317]. Les cellules « *pacemakers* » possèdent la propriété de s'activer et de contracter de manière spontanée. Et donc, il est également possible que s'il y a plusieurs cellules « *pacemakers* » qu'une compétition pour le « *pacemaker* » le plus rapide s'installe; ce qui engendre une instabilité dans l'activité autonome observée. Ceci allant encore une fois avec les résultats que nous avons obtenus dans le premier article présenté. Nous avons également montré une augmentation significative du nombre de site d'activation par cartographie optique en fluorescence qui est probablement une conséquence du changement des cardiomyocytes en culture en un phénotype plus « *pacemakers* ». Dans un avenir plus lointain, nous pouvons donc penser qu'il sera possible d'optimiser les cardiomyocytes selon les besoins du patient. Ainsi, cette méthode de production de tissu de remplacement pourra s'insérer dans les programmes de médecine personnalisée, car nous pensons qu'il sera possible d'adapter le feuillet cellulaire simplement en modifiant les conditions de l'environnement de production du tissu de remplacement. Par exemple, en insérant le gène HCN2 à l'intérieur des cellules souches utilisées, il serait possible de favoriser le phénotype « *pacemaker* » et donc de créer un tissu de remplacement avec une activité contractile spontanée optimisée. D'ailleurs, cette approche a été effectuée dans des cellules de branche gauche des faisceaux de His de chien et de l'activité spontanée a été conséquemment mesurée suite à cette transformation [317].

Lorsque nous analysons les résultats de fréquence autonome observée sur les différents supports de culture, nous constatons que la fréquence de contraction spontanée tend à diminuer plus le substrat est mou. Cela pourrait entre autre expliquer qu'un cœur qui a subi

plusieurs lésions et dont la structure se rigidifie pourrait tendre vers un état de perte de performance (efficacité de la contraction et diminution de la fraction d'éjection) menant à l'insuffisance cardiaque. Bien entendu, souvent cette perte de fonction contractile est plutôt attribuée à la perte de cardiomyocytes fonctionnels. Cependant, notre étude tend à montrer qu'il y aurait également un impact de la rigidité structurelle du cœur sur sa fonction. Comme le suggère Tallawi et collaborateurs [128], l'utilisation d'un substrat de rigidité modérée (similaire aux conditions *in vivo*) est souhaitable pour conserver une bonne intégrité structurelle des cardiomyocytes. Les cardiomyocytes qui sont sur un substrat trop mou n'exercent pas un travail suffisant alors que ceux sur une surface trop rigide n'arrivent pas à se contracter (travail trop difficile), ainsi, dans les deux situations, l'organisation des sarcomères sera affectée dû à un environnement non favorable à la conservation et au développement des caractéristiques contractiles. De plus, nos résultats sont en accord avec une étude réalisée par Myers et Jacot en 2012 qui a montré que le voltage nécessaire pour obtenir le courant calcique maximum ainsi que le temps d'inactivation diminuait plus la rigidité du substrat augmentait [318]. Effectivement, dans les deux cas ci-dessus, cela mène à une augmentation de l'influx de calcium sur surface plus rigide et donc une augmentation conséquente de la fréquence de contraction.

Au niveau de la thérapie cellulaire, la rigidité a son importance également. En effet, des cellules injectées dans un tissu fibrotique (rigidité plus importante) pourraient se différencier dans un phénotype cellulaire moins intéressant pour améliorer la contractilité du cœur; ceci est supporté par une étude de Young et collaborateurs en 2014 [319] dont les résultats montrent que la maturation des cardiomyocytes dépend de la rigidité. Dans le même ordre d'idée, Li et collaborateurs a également montré le très faible taux de différenciation des MSC injectés dans une portion infarctée du myocarde à cause de la rigidité du tissu cicatriciel [320].

Bien qu'après nos analyses, au niveau de l'activité contractile spontanée, nous n'ayons pas pu conclure de manière significative qu'il y avait présence d'un effet direct de la rigidité, nous avons toutefois observé une grande variabilité dans les résultats mesurés entre les expériences.

Nous croyons qu'il est possible que le fait d'utiliser des rat néonataux de 1 à 3 jours peut grandement contribuer à ce phénomène. Effectivement, à ce stade, plusieurs modifications cellulaires se produisent très rapidement et une différence de 24 à 48 heures peut avoir un impact énorme sur la physiologie des cellules observées par la suite durant la culture. Il serait recommandable d'utiliser rigoureusement des cellules ayant le même âge et d'essayer autant que possible que ces dernières soient le plus près possible de la naissance; c'est-à-dire, de favoriser l'utilisation des cellules de 1 jour plutôt que de 3 jours. En effet, Ehler et collaborateurs ont démontré en 2013 les avantages d'utiliser des cardiomyocytes de rats néonataux d'un jour [321].

L'environnement biomécanique affecte la sensibilité à certains agents pharmacologiques. Dans notre étude, nous avons montré une plus grande sensibilité des cellules à la stimulation sympathique (ISO) et parasympathique (Ach) lorsque ces cellules sont en culture sur un support moins rigide. La protéine « *bridging integrator 1* » (BIN1) joue un rôle dans le développement du muscle cardiaque en activant des processus apoptotiques indépendant de la caspase [322]. D'autre part, Fu et collaborateurs ont montré que lors d'une stimulation des récepteurs β -adrénergiques avec l'ISO, la présence de BIN1 améliore l'organisation des tubules T et facilite le transport de CaV1.2 [323]. Ils ont également montré que l'expression de la protéine BIN1 est réduite en situation d'insuffisance cardiaque, limite la contractilité et cause une augmentation de l'incidence des cas d'arythmies [323]. Ainsi, je pense que l'effet de l'ISO sur des cardiomyocytes en culture sur une surface d'une rigidité différente pourrait être affectée par ce phénomène. Sur une surface très rigide, la stimulation avec l'ISO serait moins efficace pour mener à l'organisation de BIN1 dans les tubules T et ceci aurait pour impact d'avoir une moins bonne contractilité et de plus, ceci expliquerait les cas de réentrées plus fréquemment observées dans nos échantillons en culture sur une surface plus rigide (verre). Cet aspect est intéressant dans une approche de tests d'efficacité pharmacologiques pour des patients avec pathologies ciblées. Par exemple, si un médicament en développement est destiné à un groupe de patients touchés par de la fibrose et de l'insuffisance cardiaque, donc que la structure cardiaque est probablement plus rigide due à leur condition pathologique, ne serait-il pas intéressant de tester le ou les composés sur un modèle cellulaire représentant

mieux l'état physiopathologique des patients cibles; cela pourrait se traduire par des économies de temps et d'investissement importantes pour les compagnies de développement de médicaments.

La stimulation β -adrénergique (avec ISO) montrent une augmentation significative de la fréquence de contractions spontanées pour le support PDMS 1:20, alors que les changements dans la période ne sont pas significatifs pour les supports en verre et en PDMS 1:40. Nous aurions pu croire que ceci pouvait corrélérer avec une augmentation de l'expression des récepteurs β 1-adrénergiques sur le support de PDMS 1:20, mais nos résultats ne montrent pas de changements significatifs au niveau de l'expression de l'ARNm pour les récepteurs β 1-adrénergiques. Alors il serait possible de penser que ce changement pourrait être dû à un cycle de recyclage plus rapide sur le PDMS 1:20 ou à une augmentation de la synthèse des récepteurs β 1. Il a été démontré qu'une stimulation avec de l'ISO affectait le recyclage et la synthèse des récepteurs β 1 [324]. Dans la même suite d'idées, une étude de Volovyk et collaborateurs a montré qu'un cytosquelette d'actine intact et fonctionnel était requis afin d'assurer une internalisation normale des récepteurs β -adrénergiques [325]. Comme nous avons observé que la rigidité du support affectait l'organisation structurale de la cellule, nous pouvons fort possiblement penser que l'internalisation serait en cause, ici, dans le résultat montrant une augmentation de la sensibilité à l'ISO sur support PDMS 1:20.

L'utilisation de substrats synthétiques pour la création de tissus de remplacement est encore aujourd'hui confrontée à certaines problématiques comme la réponse inflammatoire provoquée par l'introduction d'un matériel étranger dans l'organisme, la difficulté du matériel à s'adapter aux changements (ex. : croissance) et le contrôle de son taux de dégradation, comme le mentionnent Dunn et collaborateurs [76]. L'utilisation de matrices provenant d'organes ayant été décellularisés est une avenue en développement qui présente certains avantages intéressants par rapport à l'utilisation de supports synthétiques. Il faudra certainement se tourner vers des matériaux de plus en plus mimétiques des conditions retrouvées dans la nature comme le présente Dunn et collaborateurs; soit un matériel qui

puisse posséder les propriétés structurelles, mécaniques du tissu *in vivo*, libérer des composés bioactifs, posséder certains site de liaisons spécifiques et se dégrader en fonction de la sécrétion de certaines enzymes [76].

6.2 Système d'optimisation de la culture cellulaire : le bioréacteur!

Nous avons également élaboré un système de culture (bioréacteur cellulaire, article 2) pour contrôler les conditions de culture et automatiser l'ajout de différents stimuli. L'automatisation permet une grande reproductibilité de la technologie développée et le contrôle permet de favoriser certaines conditions pour optimiser l'expression et la différenciation des cellules en un tissu (mince feuillet) du type cellulaire désiré. Ceci est d'autant plus important comme nous savons que présentement, l'efficacité estimée de la reprogrammation des cellules en cardiomyocytes contractiles est de moins de 1 %, lorsqu'on base nos conclusions sur l'observation de contractions spontanées [326]. De plus, ces cardiomyocytes reprogrammés quittent rapidement le cycle cellulaire et il est alors difficile de les amplifier à cet état [327]. Des études présentement en cours, comme celle de Tallawi et collaborateurs [128], nous permettent de penser que nous arriverons prochainement à trouver le bon protocole pour garder les cellules souches dans un état pluripotent afin de les amplifier suffisamment avant de les différencier. Il est crucial pour cette approche d'en optimiser le processus pour s'assurer une efficacité optimale et un potentiel intéressant dans un éventuel but thérapeutique.

Cette thèse a permis de définir les grandes lignes d'un système de culture optimisé pour la culture de cellules cardiaques dans le but d'améliorer l'efficacité de la production de tissu de remplacement. Suite au premier article sur l'effet des propriétés biomécaniques (rigidité), nous pouvons énoncer qu'un support de culture possédant une rigidité le plus près possible de la rigidité cellulaire retrouvée *in vivo* est un atout considérable pour tenter d'établir un modèle cellulaire efficace. Nous avons établi que l'utilisation du PDMS permettait un bon rapport du point de vue des caractéristiques nécessaires à la culture *in vitro*. En effet, le PDMS est un matériel biocompatible, dont la rigidité peut être modifiée, translucide et résistant. Il est vrai que d'autres composés permettent d'obtenir un niveau de rigidité plus faible plus aisément,

comme les gels d'agarose, mais ces derniers sont difficiles à manipuler et très susceptibles aux bris, comme mentionné par Yang et collaborateurs [195]. Ils ne constituent donc pas un bon choix dans le cadre d'un système qui intègre la stimulation mécanique. C'est ce qui fait du PDMS le composé que nous avons choisi comme support de culture pour notre bioréacteur. L'autre avantage du PDMS dans l'élaboration de notre système était que ce composé est facile d'utilisation et nous permettait de créer par nous-même (à l'aide du moule) nos supports de culture avec gabarit pour l'ensemencement.

D'ailleurs l'ensemble des composantes utilisées dans la création du bioréacteur sont facilement disponibles ou reproductibles. Une grande proportion des pièces est carrément imprimable avec une imprimante 3D! Nous voulions garder cet aspect pour que le système soit disponible à tous et qu'il soit facilement modifiable selon les besoins particuliers de l'utilisateur. De plus, les systèmes de stimulation électrique et mécanique ont fait l'objet d'expériences afin de valider leur efficacité. Les caractéristiques présentées dans cette thèse ont un lien avec la culture de cardiomyocytes, mais le principe du bioréacteur peut être appliqué à plusieurs autres types cellulaires. La facilité de personnalisation de notre bioréacteur selon les besoins requis de l'expérience est un atout majeur en faveur de notre système.

Durant les étapes de création du bioréacteur, nous avons fait face à plusieurs embûches et défis qui seront énumérés dans les prochains paragraphes. Partant du premier prototype conçu, certaines modifications ont dues être réalisées pour améliorer sa fonctionnalité au niveau pratique. Le premier défi a été d'assurer la portabilité du système et de faciliter la manœuvrabilité du système à l'intérieur d'une hotte de culture par exemple.

Taille du système, pièces et assemblage

Dans sa première version, le système était volumineux, lourd et il était très difficile de l'utiliser. Nous avons alors tenté de réduire les composantes pour en optimiser la manœuvrabilité. Par exemple, la température était auparavant maintenue à 37 °C par une chambre d'eau entourant la zone de culture (deux chambres complètement séparées). L'eau était chauffée et circulait dans la chambre extérieure via une pompe. Il était donc très difficile de déplacer le système. Nous avons donc retravaillé le design afin qu'il puisse s'insérer dans un incubateur de culture. Par le fait même, en diminuant la taille du système et par conséquent de la chambre interne de culture également, nous économisons l'utilisation de milieu de culture.

La grosseur du système et la complexité des composantes de l'ancienne version le rendait également difficilement stérilisable. En effet, il était impossible de l'envoyer à l'autoclave ou de le passer aux rayons UVs. L'ensemble des composantes ne pouvait résister à la chaleur de l'autoclave et était gros et lourd, donc il y avait un danger élevé de bris dans le transport du système vers l'autoclave. De plus, la complexité des composantes qui étaient placées les unes par rapport aux autres rendait les rayons UVs encore ici inefficace pour aseptiser le bioréacteur convenablement.

En diminuant la taille et en s'assurant que chaque composante reste mobile, nous avons pu remédier à cette difficulté. Chaque composante du bioréacteur pouvant se séparer du système central. Cela est doublement avantageux, car il est simple à stériliser et permet une flexibilité d'utilisation. Par exemple, utiliser les mêmes systèmes pour nos différentes conditions (contrôle, stimulation électrique seulement, stimulation mécanique seulement et pour la stimulation électrique et mécanique combinée). Ceci s'avère un avantage intéressant lorsqu'on veut comparer les différents groupes entre eux et évaluer l'impact d'une composante isolée lors de nos expériences.

Les pièces requises à l'assemblage du bioréacteur ont été soit achetées commercialement (moteurs, aimants et axes) ou imprimées (supports et couvercles et connecteurs) à l'aide d'une imprimante 3D (3D Touch, 3D Systems, Bits from bites, England). Les premières pièces ont été imprimées à l'aide d'un composé bioplastique de type d'acide polyactique (PLA). Ce polymère produit à partir de la fermentation de l'amidon de maïs sous l'effet de bactéries synthétisant l'acide lactique et ensuite polymérisé au cours d'une autre étape de fermentation est un bioplastique entièrement biodégradable utilisé, entre autre, pour la production d'emballages alimentaires. Le PLA constitue une alternative naturelle au polyéthylène jusqu'à maintenant utilisé. Toutefois, nous avons été surpris de constater que les pièces produites à partir du PLA ne supportaient pas une chaleur peu élevée. En fait, nous avons constaté que le point de fusion est d'environ 160 °C, ce qui était largement supérieur à notre utilisation, mais que le PLA a un point de flexion autour de 50 °C. Ainsi, les pièces ne supportaient pas notre procédure de stérilisation à l'oxyde d'éthylène, un puissant agent stérilisant souvent utilisé pour les éléments chirurgicaux ou pour les items ne résistant pas à la chaleur extrême de l'autoclave. En effet, durant les étapes de stérilisation, les items à stériliser entrent dans diverses chambres à diverses températures et une certaine incubation se fait aux alentours de 50 °C. Ainsi, les pièces imprimées avec le PLA revenaient un peu tordues de la stérilisation à l'oxyde d'éthylène, rendant ainsi l'utilisation du système impossible par la suite.

Nous avons donc changé de matériel pour réaliser nos impressions de pièces. Nous avons opté pour un thermoplastique plus résistant, soit l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS). Après certaines étapes d'optimisation, nous sommes arrivés à avoir une bonne qualité d'impression pour produire nos pièces. Parmi ces étapes d'optimisation, nous avons dû jouer principalement sur la température de fusion utilisée (230 °C) pour assurer un bon équilibre entre l'adhésion de la pièce à la plate-forme d'impression et la qualité de fini de la pièce produite. Grâce à l'utilisation de l'ABS, les composantes de notre bioréacteur peuvent être stérilisées par l'oxyde d'éthylène permettant d'obtenir une stérilisation efficace de la chambre de culture.

De plus, grâce à l'utilisation de la technologie d'impression 3D qui devient de plus en plus abordable à tous, l'ensemble de notre système peut être reproduit à un coût très raisonnable. Certaines constructions 3D peuvent même être disponibles sur demande si vous possédez une imprimante et si vous désirez utiliser nos composants. Le fait que notre système soit abordable en combinaison avec le fait qu'il peut induire une stimulation combinée (soit à la fois l'intégration de la stimulation électrique et mécanique) s'avère un réel avantage par rapport à la compétition qui propose des systèmes moins complets et très souvent onéreux.

Le contenant de plastique dans lequel s'insèrent les composants du bioréacteur fut acheté commercialement. Il s'est avéré qu'il ne supportait pas la stérilisation à l'oxyde d'éthylène. En effet, des microfissures de type étoilé sont apparues et entraînaient des fuites du milieu de culture. Toutefois, puisque toutes les composants ont été conçues pour être séparées les unes des autres facilement et que ce contenant de plastique peut être stérilisé simplement et efficacement avec les rayons UVs, nous pouvons facilement stériliser le contenant du reste de l'ensemble et assembler le tout par la suite sous la hotte de culture. Toutefois, pour éviter les risques de contaminations possibles, il serait préférable d'utiliser un autre contenant éventuellement pour que tout le système puisse être stérilisé sans devoir manipuler les différentes composants par la suite. Car, ce risque est contrôlé par l'utilisation d'une hotte de culture et de bonnes pratiques de culture, mais le risque d'une contamination suite à une mauvaise manipulation reste une cause possible avec de lourdes conséquences en temps et en investissement lorsque cela se produit.

Les composants du bioréacteur

Le support de culture flexible

Nous avons tout d'abord utilisé de très minces feuilles de silicone comme support de culture. Toutefois, l'utilisation de ces dernières était souvent assujettie au fait que les cellules glissaient de la membrane et se retrouvaient au fond du pétri ou de la chambre de culture. Afin d'augmenter les chances d'adhésion dans la zone désirée, nous avons fait plusieurs tests avec différentes sortes de revêtement (collagène, poly-L-lysine, laminine, gélatine...). Finalement,

nous avons déterminé qu'un mélange de gélatine-fibronectine était optimal pour favoriser l'adhésion cellulaire à la membrane. Toutefois, on notait que malgré l'augmentation du recouvrement par les cellules de la zone d'intérêt, il y avait encore des cellules qui se retrouvaient au fond de la chambre. Ceci amenait une certaine instabilité au niveau de nos résultats dépendamment de combien de cellules restaient sur la membrane; cela était incontrôlable et inacceptable pour s'assurer d'une rigueur dans nos expérimentations. Ainsi, nous avons élaboré un moule pour fabriquer nos propres membranes qui comporteraient cette fois un puits au centre pour restreindre les cellules à cette zone d'intérêt. Le matériel que nous avons utilisé pour produire nos membranes avec puits d'ensemencement est du polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce matériel répondait à nos critères, soit qu'il était translucide (pour permettre les expérimentations par microscopie par exemple), il était résistant (doit résister à une stimulation mécanique) et devait être neutre au niveau de la toxicité cellulaire. La membrane de PDMS moulée avec le puits d'ensemencement a permis de stabiliser la quantité de cellules retrouvées dans la zone d'intérêt d'une expérience à l'autre. Le moule de membrane a été conçu pour qu'il soit simple à produire les membranes. En effet, un port d'injection de type Luer-lock permet une injection à l'aide d'une simple seringue, l'injection par le bas (en forme de « U ») permet de libérer l'air à l'intérieur du moule lorsque l'on injecte le PDMS et un débullage à l'aide d'une pompe à vide permet de s'assurer qu'il n'y ait pas de bulles d'air qui soient présentes à l'intérieur de nos membranes une fois polymérisées (durcies), car ceci pourrait diminuer la résistance ou les propriétés élastiques de notre support flexible.

Stimulation électrique

Le but était de développer un système de stimulation efficace et abordable pour permettre une utilisation plus large de cette technologie. Des composantes de type Arduino ont été utilisées pour ce système. Le courant électrique est transformé en champ électrique à l'intérieur de notre système en créant une différence de potentiel entre les deux électrodes placées de part et d'autre des cellules (électrodes placées parallèlement l'une par rapport à l'autre). Le champ électrique alors produit permet une stimulation de l'ensemble des cellules

simultanément. Les paramètres tels que le voltage, la fréquence et la période peuvent être facilement modifiés pour personnaliser le système au besoin de l'expérimentateur.

L'utilisation des électrodes de carbone pour induire un champ de stimulation est, selon la littérature [140], le matériel le plus efficace. Toutefois, il faut s'assurer de bien nettoyer les électrodes après chaque utilisation, car les électrodes de carbone sont des matériaux poreux qui absorbent beaucoup le milieu et les différentes substances produites lors de la culture. Après chaque expérience, nous trempions les électrodes dans un mélange d'eau de Javel (1 %) pour une durée de 24 heures. Ensuite, nous trempions les électrodes dans un bocal d'eau distillée pour un autre 24 heures en s'assurant de changer l'eau distillée aux 6 heures (faire 3 changements d'eau au minimum).

Stimulation mécanique

La stimulation mécanique est possible grâce à deux moteurs à pas linéaire placés parallèlement, mais en direction opposée. Le moteur est relié au support qui retient la membrane flexible où l'on dépose les cellules en culture par un système de connecteurs aimantés. Le support qui fait le lien entre le moteur et la membrane est en forme de « U » afin de permettre de faire un lien entre les deux composants sans compromettre la stérilité de la chambre de culture (le support épouse la forme de la paroi du bain de la chambre de culture). Deux axes parallèles passent au travers des supports afin de permettre de conserver un niveau de parallélisme pour diminuer la friction du système et empêcher les moteurs d'osciller. Toujours pour diminuer l'importance du frottement entre les surfaces, des rondelles de téflon et des barres en acier inoxydable ont été utilisées ici. Il est également bon de noter ici qu'un moteur à pas linéaire s'il n'est pas contraint, tournera sur lui-même au lieu de progresser dans une direction. Cela avait donc pour effet que sans les axes parallèles, les moteurs avaient tendance à faire osciller les moteurs, car ils tournaient un peu sur eux-mêmes. Suite à l'intégration des axes parallèles, ce problème a été complètement résolu.

L'utilisation des moteurs à pas linéaire pour induire la stimulation mécanique était quant à elle soumise à la vibration produite par ces derniers. Pour diminuer la vibration au minimum et son impact sur la culture cellulaire, nous avons optimisé l'alignement des différents axes et nous avons disposé le système de pieds anti-vibrations. La vibration a été réduite, mais reste toujours un peu présente et peut constituer une source de stress pour les cellules qui pourrait affecter les résultats obtenus lors des expériences. Il est donc important de garder cette notion en tête.

Toutefois, quant à la stimulation mécanique de cellules embryonnaires humaines, il a été montré que la différenciation était inhibée par l'application d'un étirement cyclique (10 cycles par minute) de 10 % [128]. Durant la stimulation mécanique, les cellules souches étaient maintenues dans un état pluripotent. Ceci confirme également notre hypothèse qu'il est mieux de différencier les cellules avant de les insérer dans notre bioréacteur pour en optimiser les caractéristiques fonctionnelles.

Stimulation combinée électrique et mécanique

Il s'avère avantageux de tenter de rapprocher le plus possible les conditions de culture des conditions physiologiques (*in vivo*) afin de reproduire expérimentalement le mieux possible la réalité. Prenons par exemple l'utilisation de notre bioréacteur pour tester différents composés pharmacologiques. Si nous testons ces composés sur des cellules cardiaques en culture en absence de stimulation électrique et mécanique, l'effet de la drogue sera-t-il le même? En fait, si l'expression de la cible du médicament est affectée par la présence des stimulations, on peut généralement penser que l'effet du médicament sera alors affecté. Cela montre donc toute l'importance et la complexité de tenter de reproduire le plus fidèlement possible les conditions « *in vivo* » lors d'expériences de culture cellulaire. La culture cellulaire reste un moyen efficace et peu coûteux et cette méthode ne pourrait que bénéficier d'un contrôle plus précis de l'environnement de culture.

Les étapes clés d'une bonne expérience

Étapes préparatoires :

Avant de débiter une expérience, il faut s'assurer de bien nettoyer et aseptiser les différentes composantes qui seront utilisées. Tout d'abord, nettoyer le contenant de polystyrène (bain) avec du savon pour éliminer toute source de graisse ou contaminant provenant de l'usine. Faire tremper les composantes qui vont être en contact avec les cellules (supports, électrodes, barres métalliques) dans de l'eau de Javel 1 % pour une durée de 24 heures. Cette étape permet de nettoyer les composantes qui sont plus poreuses et qui ont probablement imbibé des produits toxiques produits par les cellules lors des expériences précédentes. Ensuite, bien rincer à l'eau distillée pour une autre période de 24 heures afin d'enlever les résidus de Javel qui pourraient être toxique pour les cellules. Faire 3 changements d'eau environ aux 6 heures pour s'assurer de bien les rincer. Ensuite, stériliser les composantes stérilisables à l'oxyde d'éthylène et passer les rayons UV sur les composantes non compatibles avec l'oxyde d'éthylène (bain de polystyrène). Assembler avec précautions et minutie le système sous la hotte de culture (en conditions aseptiques). Déposer le revêtement pour optimiser l'adhésion cellulaire (gélatine-fibronectine) et placer le tout dans l'incubateur à cellules au moins 3 heures avant de devoir ensemercer les cardiomyocytes.

De l'isolation cellulaire à la stimulation combinée

Après avoir isolé les cardiomyocytes (provenant de rats néonataux ou de cellules souches progénitrices ou déjà différenciées) selon les protocoles recommandés par les différents manufacturiers, déposer 450 000 cellules/cm² dans le puits d'ensemencement de la membrane de culture flexible. Attendre au moins 3 heures pour permettre l'adhésion des cardiomyocytes à la membrane de PDMS et ensuite, ajouter très délicatement le milieu de culture pour éviter que le puits ne s'assèche durant la période de culture. Un milieu avec sérum bovin est utilisé à cette étape pour permettre la prolifération et la croissance des cardiomyocytes mis en culture. Attendre 24 heures sans bouger le système pour éviter que les cellules ne tombent de la membrane (surface d'intérêt). Le lendemain, il faut changer le milieu

de culture pour un milieu sans sérum pour éviter une hypertrophie cellulaire durant la période de stimulation. Ensuite, il faut amorcer les protocoles de stimulation (mécanique, électrique ou combinée).

Durant la période de culture/période de stimulation

Vérifier les cultures quotidiennement à l'aide du microscope pour s'assurer qu'il n'y a pas de contamination et que les cardiomyocytes sont bien étalés et actifs (présence d'activité autonome par exemple). Un algorithme a également été développé (sous langage python) pour suivre les stimulations et enregistrer les différents signaux des stimulations. Ainsi, il est donc possible de déceler rapidement si un problème survient lors de la période de stimulation et permet de corriger la situation le plus rapidement possible afin d'éviter un impact trop important sur les cellules en culture.

L'utilisation de cellules pluripotentes d'une source non intrusive (comme l'épiderme) provenant d'un même individu (donneur et receveur) dont on induirait la différenciation en lignée cardiaque dotée d'une activité spontanée permettrait d'éviter les troubles de rejet. La compatibilité serait toujours de 100 % puisque les cellules proviendraient du même individu. Ceci constituerait une avenue intéressante pour former un feuillet de cellules optimisées appelé biopacemaker (BPM) [122].

6.3 Étude fonctionnelle et détection d'anomalie automatisée

Finalement, l'article 3 présente une nouvelle approche d'analyse de l'activité autonome par l'utilisation de la vidéomicroscopie. Nous avons montré qu'il était non seulement possible de mesurer l'activité contractile dans nos échantillons par la détection de pics de contraction et de relaxation, mais qu'il était également possible de pousser l'analyse plus loin et de regarder du même coup la stabilité de cette activité. Nous avons donc décortiqué les signaux afin d'observer par exemple la durée entre le pic de contraction et le pic de relaxation (Δ_{R-C}), de

même que nous avons calculé le ratio entre la hauteur du pic de contraction et celui de la relaxation ($R_{C/R}$). Aucune conclusion significative n'a cependant été observée entre la fréquence autonome mesurée et l'intervalle entre le pic de contraction et celui de relaxation (Δ_{R-C}) ni entre la fréquence autonome et le ratio hauteur du pic de contraction et celui de relaxation ($R_{C/R}$). Nous avons finalement montré comment analyser l'homogénéité de l'activité enregistrée par l'utilisation de notre approche analytique. Ceci permettant de voir les sites d'activation (de type pacemakers) directement par des techniques non intrusives et leur ratio de propagation aux autres cellules dans l'ensemble du champ de vision. Cela permet en outre de déduire de la bonne connectivité entre les cellules du feuillet cellulaire produit.

Une des limitations de cette approche est la présence de bruit dans nos données. Un signal qui n'est pas franc, par exemple causé par une faible activité contractile de nos échantillons, va rendre plus difficile la détection des différents paramètres comme la fréquence de contraction ou période. Nous avons dû appliquer des filtres pour adoucir les signaux afin de s'assurer d'analyser des résultats avec fiabilité.

Cet aspect s'avère être un complément intéressant à notre bioréacteur qui permet d'optimiser la culture de cardiomyocytes puisque par cette approche innovatrice, il est possible d'évaluer la présence d'une activité autonome et son homogénéité dans l'ensemble du champ de vision du microscope. Cela permet donc d'évaluer la performance du feuillet cellulaire produit en culture tout en laissant ce dernier à l'intérieur même du bioréacteur. Cette approche a été utilisée afin d'observer les effets de la modification de l'environnement de culture sur l'activité autonome, mais dans un but à plus long terme, elle pourrait être utilisée pour valider l'activité du tissu de remplacement produit. Par exemple, disons que nous désirons obtenir un feuillet ayant une activité autonome à 1 Hz, nous pouvons grâce au bioréacteur, modifier les protocoles de stimulation pour arriver à cette fin et grâce à la méthode d'analyse par vidéomicroscopie, nous pouvons confirmer que l'activité du feuillet est bel et bien uniforme à 1 Hz dans l'ensemble du feuillet. Dans le cas d'un feuillet qui ne respecterait pas les caractéristiques souhaitées, le protocole pourrait être modifié rapidement pour tenter de palier à la situation ou du moins éviter qu'un greffon se rende à l'implantation clinique lorsqu'il n'est pas optimal.

Conclusion

Mes recherches ont permis d'étudier l'impact fonctionnel des différents stimuli de l'environnement cardiaque afin de définir des conditions optimisées pour la fabrication de tissu de remplacement par génie tissulaire. En premier lieu, nous avons mentionné l'importance de déterminer un substrat de culture qui mimera les conditions retrouvées dans la nature pour optimiser la différenciation et la maturation des cardiomyocytes en culture. En second lieu, nous avons élaboré un bioréacteur intégrant le support de culture qui optimisait la production d'un feuillet cellulaire de phénotype «*pacemaker-like*». De plus, nous avons intégré la stimulation électrique et mécanique à ce système, toujours dans le but de mieux reproduire les conditions retrouvées *in vivo*. Finalement, comme le processus de culture de tissu de remplacement implique plusieurs jours de développement et optimisation, nous avons élaboré une approche pour surveiller l'activité contractile spontanée. Les algorithmes développés permettent d'observer la fréquence de contractions ainsi que de détecter des anomalies dans l'homogénéité du signal mesuré afin de déceler rapidement des conditions pro-arythmiques. Une détection hâtive permettrait une intervention possible avant que du dommage soit causé au tissu.

Comme nos recherches ont porté sur les cardiomyocytes de rats néonataux, la suite des choses serait de montrer que le système que nous avons développé est également utilisable avec des cellules souches. Est-ce que la culture des iPSCs dans notre système permet un meilleur taux de différenciation en phénotype cardiaque? Peut-on également pousser plus loin dans la différenciation et produire des cardiomyocytes plus spécifiques; c'est-à-dire, des cardiomyocytes optimisés pour le ventricule gauche, le ventricule droit, les oreillettes et le tissu nœud sinusal. Le système que nous avons développé permet une programmation personnalisée du protocole de stimulation et un suivi rapproché du développement du tissu de remplacement qui, nous le pensons, permettra de mieux différencier les cellules dans le phénotype souhaité et de les optimiser selon le contexte clinique demandé. Ceci ouvre donc la possibilité de produire des feuillets cellulaires de nature diverse dans un avenir rapproché à l'aide de notre approche.

Vers l'optimisation de l'activité électrique autonome des biopacemakers

Évidemment, il reste encore plusieurs étapes avant d'arriver à produire un feuillet *biopacemaker* (BPM) optimisé pour une utilisation en clinique. Un aperçu de l'approche de génie tissulaire privilégiée pour produire un BPM optimisé est présenté à la figure 17. Des cellules pluripotentes, par exemple, des fibroblastes de la peau sont isolés de sujets atteints de troubles de rythme et reprogrammés via des facteurs de transcription dans un état de cellules souches embryonnaires [29]; les cellules sont ensuiteensemencées et différenciées en cellules cardiaques dans un environnement *in vitro* contrôlé par des processus de stimulation automatisés. Les cellules n'ayant pas d'automaticité d'un point de vue électrique devront être transformées avant ou après la greffe par thérapie génique. Par exemple, T-Box factor 3 (TBX3), un facteur de transcription nécessaire au développement de plusieurs tissus, pourrait être utilisé pour reprogrammer les cellules du BPM en cellules pacemakers. Des études *in vitro* ont révélé que TBX3 réduit la conduction intercellulaire, I_{Na} et I_{K1} [47] favorisant l'automaticité. Similairement, T-Box factor 18 (TBX18) a montré ses capacités à transformer des cardiomyocytes dépourvus d'activité autonome en cellules autonomes *in vivo* après 2 jours post injection du facteur TBX18. Des cellules similaires à celles du nœud sinusal ont même été observées post injection de TBX18 [328]. Le BPM est ensuite détaché de son support de fabrication et étendu sur la partie d'intérêt du myocarde pour une période de 10 à 15 minutes afin de permettre l'adhésion de ce dernier et ce, sans suture [48]. Le greffon pourrait ainsi améliorer les fonctions automatiques. Dans ce contexte, grâce au génie tissulaire, les limitations des PM électroniques pourraient être surpassées par l'utilisation des PM biologiques.

Toutefois, beaucoup de facteurs restent encore à déterminer avant d'arriver à produire des organes en trois dimensions (3D). Le génie tissulaire possède lui aussi présentement son lot de limitations qui pourront sûrement être dépassées (je le pense) grâce à une meilleure connaissance des différents joueurs clés dans les différents processus de prolifération, de différenciation, d'angiogenèse et d'innervation. L'utilisation d'un bioréacteur offrant la

possibilité d'intégrer la stimulation électrique et mécanique combinée, conjointement avec l'utilisation d'un cocktail d'agents optimisant offrira des bénéfices sur la qualité du tissu produit et diminuera également le temps d'attente pour les patients dans un scénario futur d'utilisation en clinique. Nous espérons ainsi que nos efforts permettront de contribuer à améliorer la qualité de vie des patients souffrant de pathologies cardiaques et même en sauvera certains que les traitements pharmacologiques actuels ne peuvent aider.

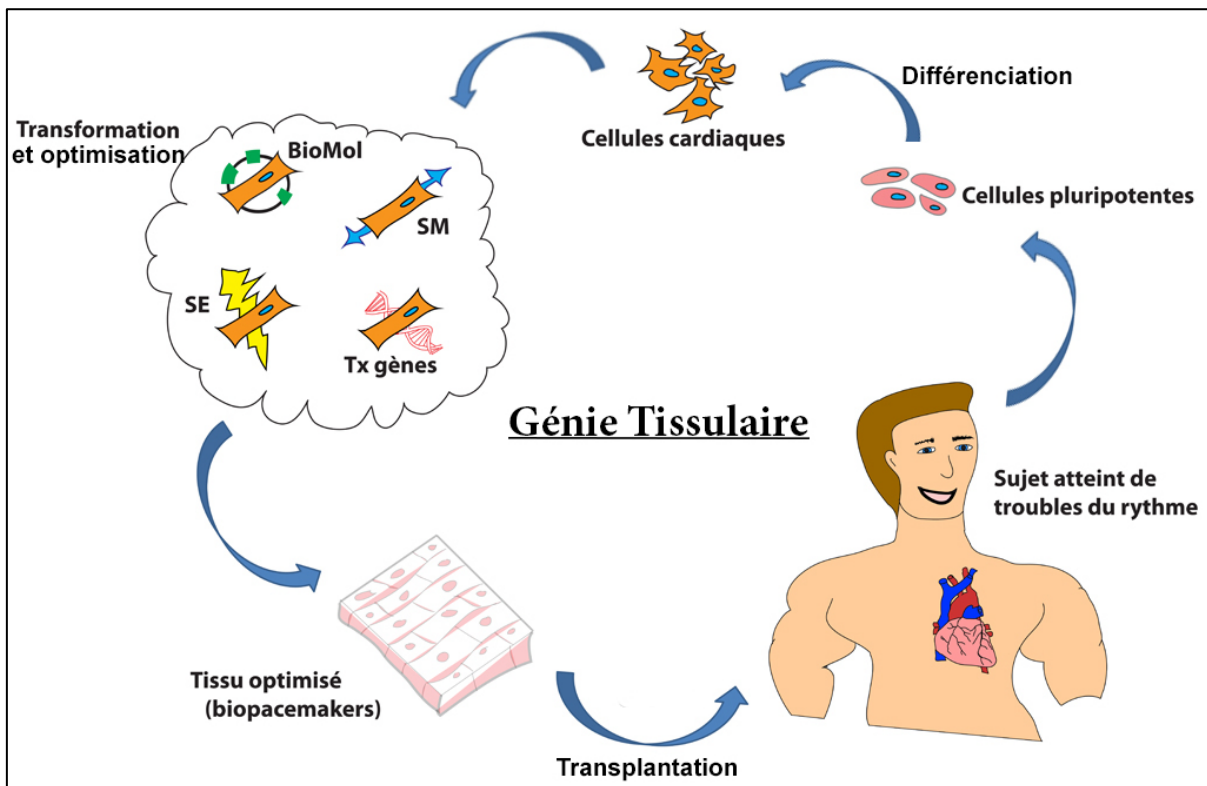


Figure 17 - Génie tissulaire

Bibliographie

1. Milgrom-Hoffman M, Michailovici I, Ferrara N, Zelzer E, Tzahor E. Endothelial cells regulate neural crest and second heart field morphogenesis. *Biology open*. 2014. doi: 10.1242/bio.20148078. PubMed PMID: 24996922.
2. Bettex DA, Pretre R, Chassot PG. Is our heart a well-designed pump? The heart along animal evolution. *European heart journal*. 2014. doi: 10.1093/eurheartj/ehu222. PubMed PMID: 24917644.
3. Sylva M, van den Hoff MJ, Moorman AF. Development of the human heart. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(6):1347-71. doi: 10.1002/ajmg.a.35896. PubMed PMID: 23633400.
4. Sun C, Yu D, Ye W, Liu C, Gu S, Sinsheimer NR, et al. The short stature homeobox 2 (Shox2)-bone morphogenetic protein (BMP) pathway regulates dorsal mesenchymal protrusion development and its temporary function as a pacemaker during cardiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(4):2007-23. doi: 10.1074/jbc.M114.619007. PubMed PMID: 25488669; PubMed Central PMCID: PMC4303656.
5. Meganathan K, Sotiriadou I, Natarajan K, Hescheler J, Sachinidis A. Signaling molecules, transcription growth factors and other regulators revealed from in-vivo and in-vitro models for the regulation of cardiac development. *Int J Cardiol*. 2015;183:117-28. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.01.049. PubMed PMID: 25662074.
6. van Berlo JH, Aronow BJ, Molkentin JD. Parsing the roles of the transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the adult cardiac hypertrophic response. *PloS one*. 2013;8(12):e84591. doi: 10.1371/journal.pone.0084591. PubMed PMID: 24391969; PubMed Central PMCID: PMC3877334.
7. Takashima Y, Suzuki A. Regulation of organogenesis and stem cell properties by T-box transcription factors. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(20):3929-45. doi: 10.1007/s00018-013-1305-5. PubMed PMID: 23479132.
8. Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovascular research*. 2011;91(2):212-22. doi: 10.1093/cvr/cvr112. PubMed PMID: 21498422.
9. Ebert SN. Tbx3: a new trick for an 'old' myocyte? *Cardiovascular research*. 2012;94(3):398-9. doi: 10.1093/cvr/cvs154. PubMed PMID: 22523095.
10. Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, et al. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev*. 2007;21(9):1098-112. doi: 10.1101/gad.416007. PubMed PMID: 17473172; PubMed Central PMCID: PMC1855235.
11. Bakker ML, Boink GJ, Boukens BJ, Verkerk AO, van den Boogaard M, den Haan AD, et al. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovascular research*. 2012;94(3):439-49. doi: 10.1093/cvr/cvs120. PubMed PMID: 22419669.
12. Papaioannou VE. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development*. 2014;141(20):3819-33. doi: 10.1242/dev.104471. PubMed PMID: 25294936; PubMed Central PMCID: PMC4197708.

13. Van Vliet P, Wu SM, Zaffran S, Puceat M. Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovasc Res.* 2012;96(3):352-62. doi: 10.1093/cvr/cvs270. PubMed PMID: 22893679; PubMed Central PMCID: PMC3500045.
14. Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, Langer EM, Cai M, Mashayekhi M, et al. *Mesp1* coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(1):55-68. doi: 10.1016/j.stem.2008.04.004. PubMed PMID: 18593559; PubMed Central PMCID: PMC2497439.
15. Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyba M, et al. *Mesp1* acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell.* 2008;3(1):69-84. doi: 10.1016/j.stem.2008.06.009. PubMed PMID: 18593560.
16. Lovato TL, Sensibaugh CA, Swingle KL, Martinez MM, Cripps RM. The *Drosophila* Transcription Factors *Tinman* and *Pannier* Activate and Collaborate with *Myocyte Enhancer Factor-2* to Promote Heart Cell Fate. *PloS one.* 2015;10(7):e0132965. doi: 10.1371/journal.pone.0132965. PubMed PMID: 26225919; PubMed Central PMCID: PMC4520567.
17. Hermans KC, Blankesteyn WM. Wnt Signaling in Cardiac Disease. *Comprehensive Physiology.* 2015;5(3):1183-11209. doi: 10.1002/cphy.c140060. PubMed PMID: 26140714.
18. Ozhan G, Weidinger G. Wnt/beta-catenin signaling in heart regeneration. *Cell Regen (Lond).* 2015;4(1):3. doi: 10.1186/s13619-015-0017-8. PubMed PMID: 26157574; PubMed Central PMCID: PMC4495933.
19. Liu H, Chen CH, Ye W, Espinoza-Lewis RA, Hu X, Zhang Y, et al. Phosphorylation of *Shox2* is required for its function to control sinoatrial node formation. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(3):e000796. doi: 10.1161/JAHA.114.000796. PubMed PMID: 24847033; PubMed Central PMCID: PMC4309068.
20. Hashem SI, Lam ML, Mihardja SS, White SM, Lee RJ, Claycomb WC. *Shox2* regulates the pacemaker gene program in embryoid bodies. *Stem cells and development.* 2013;22(21):2915-26. doi: 10.1089/scd.2013.0123. PubMed PMID: 23767866.
21. Ye W, Wang J, Song Y, Yu D, Sun C, Liu C, et al. A common *Shox2-Nkx2-5* antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development.* 2015;142(14):2521-32. doi: 10.1242/dev.120220. PubMed PMID: 26138475.
22. Gaborit N, Sakuma R, Wylie JN, Kim KH, Zhang SS, Hui CC, et al. Cooperative and antagonistic roles for *Irx3* and *Irx5* in cardiac morphogenesis and postnatal physiology. *Development.* 2012;139(21):4007-19. doi: 10.1242/dev.081703. PubMed PMID: 22992950; PubMed Central PMCID: PMC3472592.
23. Simmons CS, Petzold BC, Pruitt BL. Microsystems for biomimetic stimulation of cardiac cells. *Lab on a chip.* 2012;12(18):3235-48. doi: 10.1039/c2lc40308k. PubMed PMID: 22782590.
24. Wang B, Wang G, To F, Butler JR, Claude A, McLaughlin RM, et al. Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids.* 2013;29(35):11109-17. doi: 10.1021/la401702w. PubMed PMID: 23923967; PubMed Central PMCID: PMC3838927.
25. Modesto K, Sengupta PP. Myocardial mechanics in cardiomyopathies. *Progress in cardiovascular diseases.* 2014;57(1):111-24. doi: 10.1016/j.pcad.2014.03.003. PubMed PMID: 25081406.

26. Joung B, Ogawa M, Lin SF, Chen PS. The calcium and voltage clocks in sinoatrial node automaticity. *Korean Circ J.* 2009;39(6):217-22. doi: 10.4070/kcj.2009.39.6.217. PubMed PMID: 19949626; PubMed Central PMCID: PMC2771837.
27. Guo W, Kamiya K, Cheng J, Toyama J. Changes in action potentials and ion currents in long-term cultured neonatal rat ventricular cells. *The American journal of physiology.* 1996;271(1 Pt 1):C93-102. PubMed PMID: 8760034.
28. Robinson RB, Yu H, Chang F, Cohen IS. Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, *if*, in rat ventricle cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 1997;433(4):533-5. PubMed PMID: 9000433.
29. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circulation research.* 2010;106(3):434-46. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041. PubMed PMID: 20167941.
30. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological reviews.* 2009;89(3):847-85. doi: 10.1152/physrev.00029.2008. PubMed PMID: 19584315.
31. Fikret E, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ, et al. Dominant-Negative Suppression of HCN Channels Markedly Reduces the Native Pacemaker Current *If* and Undermines Spontaneous Beating of Neonatal Cardiomyocytes. *Circulation.* 2003;107(3):485-9. doi: 10.1161/01.cir.0000045672.32920.cb.
32. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node *I(f)* channels by ivabradine. *The Journal of general physiology.* 2002;120(1):1-13. PubMed PMID: 12084770; PubMed Central PMCID: PMC2238187.
33. Sasse P, Zhang J, Cleemann L, Morad M, Hescheler J, Fleischmann BK. Intracellular Ca^{2+} oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. *The Journal of general physiology.* 2007;130(2):133-44. doi: 10.1085/jgp.200609575. PubMed PMID: 17664344; PubMed Central PMCID: PMC2151640.
34. Brooks CM, Lu HH, Lange G, Mangi R, Shaw RB, Geoly K. Effects of localized stretch of the sinoatrial node region of the dog heart. *The American journal of physiology.* 1966;211(5):1197-202. PubMed PMID: 5924042.
35. Blinks JR. Positive chronotropic effect of increasing right atrial pressure in the isolated mammalian heart. *The American journal of physiology.* 1956;186(2):299-303. PubMed PMID: 13362527.
36. Deck KA. [Changes in the Resting Potential and the Cable Properties of Purkinje Fibers during Stretch]. *Pflugers Archiv fur die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 1964;280:131-40. PubMed PMID: 14253708.
37. Cooper PJ, Lei M, Cheng LX, Kohl P. Selected contribution: axial stretch increases spontaneous pacemaker activity in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Journal of applied physiology.* 2000;89(5):2099-104. PubMed PMID: 11053369.
38. Kohl P, Sachs F, Franz M. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias.* OUP Oxford, 2011. 2011;(2, illustrated):512.
39. Lakatta EG, DiFrancesco D. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2009;47(2):157-70. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.022. PubMed PMID: 19361514.
40. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circulation research.* 2010;106(4):659-73. doi:

- 10.1161/CIRCRESAHA.109.206078. PubMed PMID: 20203315; PubMed Central PMCID: PMC2837285.
41. Lin W, Laitko U, Juranka PF, Morris CE. Dual stretch responses of mHCN2 pacemaker channels: accelerated activation, accelerated deactivation. *Biophysical journal*. 2007;92(5):1559-72. doi: 10.1529/biophysj.106.092478. PubMed PMID: 17142286; PubMed Central PMCID: PMC1796836.
42. Yeh YH, Burstein B, Qi XY, Sakabe M, Chartier D, Comtois P, et al. Funny current downregulation and sinus node dysfunction associated with atrial tachyarrhythmia: a molecular basis for tachycardia-bradycardia syndrome. *Circulation*. 2009;119(12):1576-85. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.789677. PubMed PMID: 19289641.
43. Yanni J, Tellez JO, Maczewski M, Mackiewicz U, Beresewicz A, Billeter R, et al. Changes in ion channel gene expression underlying heart failure-induced sinoatrial node dysfunction. *Circulation Heart failure*. 2011;4(4):496-508. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.957647. PubMed PMID: 21565973.
44. Foltz WU, Wagner M, Rudakova E, Volk T. N-acetylcysteine prevents electrical remodeling and attenuates cellular hypertrophy in epicardial myocytes of rats with ascending aortic stenosis. *Basic research in cardiology*. 2012;107(5):290. doi: 10.1007/s00395-012-0290-4. PubMed PMID: 22855324.
45. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2012;125(17):2059-70. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306. PubMed PMID: 22456474.
46. Laitko U, Juranka PF, Morris CE. Membrane stretch slows the concerted step prior to opening in a Kv channel. *The Journal of general physiology*. 2006;127(6):687-701. doi: 10.1085/jgp.200509394. PubMed PMID: 16735754; PubMed Central PMCID: PMC2151533.
47. Iribe G, Ward CW, Camelliti P, Bollensdorff C, Mason F, Burton RA, et al. Axial stretch of rat single ventricular cardiomyocytes causes an acute and transient increase in Ca²⁺ spark rate. *Circulation research*. 2009;104(6):787-95. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193334. PubMed PMID: 19197074.
48. Iribe G, Kohl P. Axial stretch enhances sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and cellular Ca²⁺ reuptake in guinea pig ventricular myocytes: experiments and models. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2008;97(2-3):298-311. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2008.02.012. PubMed PMID: 18395247.
49. Gamble J, Taylor PB, Kenno KA. Myocardial stretch alters twitch characteristics and Ca²⁺ loading of sarcoplasmic reticulum in rat ventricular muscle. *Cardiovascular research*. 1992;26(9):865-70. PubMed PMID: 1451163.
50. Constantin M, Dupuis S, Chaigne S, Desplantez T. P385 Distinct contribution of cardiac connexins on regulating the action potential propagation in the healthy and diseased heart. *Cardiovascular research*. 2014;103 Suppl 1:S70-1. doi: 10.1093/cvr/cvu091.68. PubMed PMID: 25020772.
51. Chaigne S, Dupuis S, Constantin M, Desplantez T. P117 Co-expressed cardiac connexins: dependence on the Cx43:Cx40 ratio in regulating the gap junction channel make-up and electrical properties. *Cardiovascular research*. 2014;103 Suppl 1:S20. doi: 10.1093/cvr/cvu082.58. PubMed PMID: 25020539.

52. Dupuis S, Chaigne S, Constantin M, Desplantez T. P641 Dependence of the cardiac connexins Cx43:Cx45 ratio on the formation of gap junction channels and their electrical properties. *Cardiovascular research*. 2014;103 Suppl 1:S116-7. doi: 10.1093/cvr/cvu098.68. PubMed PMID: 25020366.
53. Saffitz JE, Kleber AG. Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart. *Circ Res*. 2004;94(5):585-91.
54. McCain ML, Desplantez T, Geisse NA, Rothen-Rutishauser B, Oberer H, Parker KK, et al. Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(2):H443-50. doi: 10.1152/ajpheart.01218.2010. PubMed PMID: 22081700; PubMed Central PMCID: PMC3339855.
55. Veeraghavan R, Poelzing S, Gourdie RG. Intercellular electrical communication in the heart: a new, active role for the intercalated disk. *Cell communication & adhesion*. 2014;21(3):161-7. doi: 10.3109/15419061.2014.905932. PubMed PMID: 24735129.
56. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324(5923):98-102. doi: 10.1126/science.1164680. PubMed PMID: 19342590; PubMed Central PMCID: PMC2991140.
57. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013;493(7432):433-6. doi: 10.1038/nature11682. PubMed PMID: 23222518; PubMed Central PMCID: PMC3548046.
58. Lazzara R, el-Sherif N, Scherlag BJ. Electrophysiological properties of canine Purkinje cells in one-day-old myocardial infarction. *Circulation research*. 1973;33(6):722-34. PubMed PMID: 4762012.
59. Kopanic JL, Al-mugotir MH, Kieken F, Zach S, Trease AJ, Sorgen PL. Characterization of the connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners. *Biophysical journal*. 2014;106(10):2184-95. doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.045. PubMed PMID: 24853747; PubMed Central PMCID: PMC4052358.
60. Shimkunas R, Zhang Z, Wenk JF, Soleimani M, Khazalpour M, Acevedo-Bolton G, et al. Left ventricular myocardial contractility is depressed in the borderzone after posterolateral myocardial infarction. *The Annals of thoracic surgery*. 2013;95(5):1619-25. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.02.005. PubMed PMID: 23523189; PubMed Central PMCID: PMC3640420.
61. Ali SR, Hippenmeyer S, Saadat LV, Luo L, Weissman IL, Ardehali R. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(24):8850-5. doi: 10.1073/pnas.1408233111. PubMed PMID: 24876275.
62. Rota M, Leri A, Anversa P. Human heart failure: is cell therapy a valid option? *Biochemical pharmacology*. 2014;88(2):129-38. doi: 10.1016/j.bcp.2013.10.031. PubMed PMID: 24239645; PubMed Central PMCID: PMC3943599.
63. Anversa P, Leri A. Innate regeneration in the aging heart: healing from within. *Mayo Clinic proceedings*. 2013;88(8):871-83. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.04.001. PubMed PMID: 23910414; PubMed Central PMCID: PMC3936323.

64. Ferrari R, Rizzo P. The Notch pathway: a novel target for myocardial remodelling therapy? *European heart journal*. 2014. doi: 10.1093/eurheartj/ehu244. PubMed PMID: 24970336.
65. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*. 2008;451(7181):943-8. doi: 10.1038/nature06801. PubMed PMID: 18288184.
66. Knoll R. A role for membrane shape and information processing in cardiac physiology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2014. doi: 10.1007/s00424-014-1575-2. PubMed PMID: 25129123.
67. Ferrer MI. The etiology and natural history of sinus node disorders. *Arch Intern Med*. 1982;142(2):371-2. PubMed PMID: 7059261.
68. Gomez JF, Cardona K, Martinez L, Saiz J, Trenor B. Electrophysiological and Structural Remodeling in Heart Failure Modulate Arrhythmogenesis. 2D Simulation Study. *PloS one*. 2014;9(7):e103273. doi: 10.1371/journal.pone.0103273. PubMed PMID: 25054335; PubMed Central PMCID: PMC4108391.
69. Emmert MY, Hitchcock RW, Hoerstrup SP. Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;69-70:254-69. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.004. PubMed PMID: 24378579.
70. Hashem SI, Claycomb WC. Genetic isolation of stem cell-derived pacemaker-nodal cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem*. 2013;383(1-2):161-71. doi: 10.1007/s11010-013-1764-x. PubMed PMID: 23877224.
71. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2008;1(1):62-73. doi: 10.1161/CIRCEP.107.754564. PubMed PMID: 19808395.
72. Yiu KH, Tse HF. Hypertension and cardiac arrhythmias: a review of the epidemiology, pathophysiology and clinical implications. *Journal of human hypertension*. 2008;22(6):380-8. doi: 10.1038/jhh.2008.10. PubMed PMID: 18337759.
73. Dobrzynski H, Boyett MR, Anderson RH. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation*. 2007;115(14):1921-32. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.616011. PubMed PMID: 17420362.
74. Herrmann S, Fabritz L, Layh B, Kirchhof P, Ludwig A. Insights into sick sinus syndrome from an inducible mouse model. *Cardiovascular research*. 2011;90(1):38-48. doi: 10.1093/cvr/cvq390. PubMed PMID: 21193513.
75. Lotfy W, Hegazy R, AbdElAziz O, Sobhy R, Hasanein H, Shaltout F. Permanent cardiac pacing in pediatric patients. *Pediatric cardiology*. 2013;34(2):273-80. Epub 2012-08-12. doi: 10.1007/s00246-012-0433-2. PubMed PMID: 22886361.
76. Dunn DA, Hodge AJ, Lipke EA. Biomimetic materials design for cardiac tissue regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2014;6(1):15-39. doi: 10.1002/wnan.1241. PubMed PMID: 24123919.
77. Ben-Mordechai T, Palevski D, Glucksam-Galnoy Y, Elron-Gross I, Margalit R, Leor J. Targeting Macrophage Subsets for Infarct Repair. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014. doi: 10.1177/1074248414534916. PubMed PMID: 24938456.
78. de Jong S, van Veen TA, van Rijen HV, de Bakker JM. Fibrosis and cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(6):630-8. doi: 10.1097/FJC.0b013e318207a35f. PubMed PMID: 21150449.

79. Hullin R. Heart transplantation: current practice and outlook to the future. *Swiss medical weekly*. 2014;144:w13977. doi: 10.4414/smw.2014.13977. PubMed PMID: 25102016.
80. Hormann M, Everly MJ. Heart transplantation in an aging society: an analysis of 25 years of the OPTN/UNOS registry. *Clinical transplants*. 2013:31-44. PubMed PMID: 25095490.
81. Gregoratos G, Abrams J, Epstein AE, Freedman RA, Hayes DL, Hlatky MA, et al. ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/NASPE Committee to Update the 1998 Pacemaker Guidelines). *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(9):1703-19. PubMed PMID: 12427427.
82. Miller MA, Neuzil P, Dukkipati SR, Reddy VY. Leadless Cardiac Pacemakers: Back to the Future. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(10):1179-89. doi: 10.1016/j.jacc.2015.06.1081. PubMed PMID: 26337997.
83. Li Y, Dykoski R, Li J. [Chronic transvenous pacemaker/implantable cardioverter defibrillator leads implantation induced pathological changes]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2015;43(5):423-7. PubMed PMID: 26419988.
84. Capucci A, Luzi M, Cipolletta L, Molini S. Health economic concerns on cardiac rhythm management devices longevity and how to overcome them. *Expert Rev Med Devices*. 2016;13(3):297-303. doi: 10.1586/17434440.2016.1142871. PubMed PMID: 26778415.
85. Al Sabti H, Menon RG, Maddali MM, Valliattu J. Wandering permanent pacemaker generators in children: a case series. *Journal of medical case reports*. 2008;2:163. doi: 10.1186/1752-1947-2-163. PubMed PMID: 18485236; PubMed Central PMCID: PMC2396653.
86. Wu H, Opperman, K., Kaboord, B. Easily isolate and culture highly viable, functional primary cardiomyocytes. *Free Protein Expression Handbook*. 2014.
87. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research*. 2011;109(8):923-40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243147. PubMed PMID: 21960725; PubMed Central PMCID: PMC3604746.
88. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(6):H2196-203. doi: 10.1152/ajpheart.01017.2005. PubMed PMID: 16473959.
89. Del Alamo JC, Lemons D, Serrano R, Savchenko A, Cerignoli F, Bodmer R, et al. High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development. *Biochimica et biophysica acta*. 2016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.003. PubMed PMID: 26952934.
90. Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(5):H2006-17. doi: 10.1152/ajpheart.00694.2011. PubMed PMID: 21890694; PubMed Central PMCID: PMC3604746.
91. Knollmann BC. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: boutique science or valuable arrhythmia model? *Circulation research*. 2013;112(6):969-76; discussion

76. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300567. PubMed PMID: 23569106; PubMed Central PMCID: PMC3667201.
92. Amano Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, Iseoka H, Miyagawa S, Sawa Y, et al. Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays. *Acta biomaterialia*. 2016;33:110-21. doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.033. PubMed PMID: 26821339.
93. Celiz AD, Smith JG, Langer R, Anderson DG, Winkler DA, Barrett DA, et al. Materials for stem cell factories of the future. *Nature materials*. 2014;13(6):570-9. doi: 10.1038/nmat3972. PubMed PMID: 24845996.
94. Kane C, Couch L, Terracciano CM. Excitation-contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:59. doi: 10.3389/fcell.2015.00059. PubMed PMID: 26484342; PubMed Central PMCID: PMC364586503.
95. Matsuura K, Utoh R, Nagase K, Okano T. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.024. PubMed PMID: 24858800.
96. Weisbrod D, Peretz A, Ziskind A, Menaker N, Oz S, Barad L, et al. SK4 Ca²⁺ activated K⁺ channel is a critical player in cardiac pacemaker derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(18):E1685-94. doi: 10.1073/pnas.1221022110. PubMed PMID: 23589888; PubMed Central PMCID: PMC3645592.
97. Muller M, Stockmann M, Malan D, Wolheim A, Tischendorf M, Linta L, et al. Ca²⁺ activated K channels-new tools to induce cardiac commitment from pluripotent stem cells in mice and men. *Stem Cell Rev*. 2012;8(3):720-40. doi: 10.1007/s12015-011-9324-9. PubMed PMID: 22038332.
98. Kleger A, Seufferlein T, Malan D, Tischendorf M, Storch A, Wolheim A, et al. Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells. *Circulation*. 2010;122(18):1823-36. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971721. PubMed PMID: 20956206.
99. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006;442(7102):533-8. doi: 10.1038/nature04915. PubMed PMID: 16767105.
100. Xue C, Zhang J, Lv Z, Liu H, Huang C, Yang J, et al. Angiotensin II promotes differentiation of mouse c-kit-positive cardiac stem cells into pacemaker-like cells. *Mol Med Rep*. 2015;11(5):3249-58. doi: 10.3892/mmr.2015.3149. PubMed PMID: 25572000; PubMed Central PMCID: PMC4368082.
101. Jin MS, Shi S, Zhang Y, Yan Y, Sun XD, Liu W, et al. Icariin-mediated differentiation of mouse adipose-derived stem cells into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 2010;344(1-2):1-9. doi: 10.1007/s11010-010-0523-5. PubMed PMID: 20563742.
102. Sun J, He W, Bai SZ, Peng X, Zhang N, Li HX, et al. The expression of calcium-sensing receptor in mouse embryonic stem cells (mESCs) and its influence on differentiation of mESC into cardiomyocytes. *Differentiation*. 2013;85(1-2):32-40. doi: 10.1016/j.diff.2012.11.002. PubMed PMID: 23314289.
103. Zhou L, Zheng B, Tang L, Huang Y, Zhu D. Involvement of PIKE in icariin induced cardiomyocyte differentiation from murine embryonic stem cells. *Pharmazie*. 2014;69(3):198-202. PubMed PMID: 24716409.

104. Ishida O, Hagino I, Nagaya N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y, et al. Adipose-derived stem cell sheet transplantation therapy in a porcine model of chronic heart failure. *Transl Res.* 2015;165(5):631-9. doi: 10.1016/j.trsl.2014.12.005. PubMed PMID: 25613060.
105. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology.* 2004;22(10):1282-9. doi: 10.1038/nbt1014. PubMed PMID: 15448703.
106. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* 1993;44(1):41-50. PubMed PMID: 8155574.
107. Funakoshi S, Miki K, Takaki T, Okubo C, Hatani T, Chonabayashi K, et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Scientific reports.* 2016;6:19111. doi: 10.1038/srep19111. PubMed PMID: 26743035; PubMed Central PMCID: PMC4705488.
108. Pavo N, Charwat S, Nyolczas N, Jakab A, Murlasits Z, Bergler-Klein J, et al. Cell therapy for human ischemic heart diseases: Critical review and summary of the clinical experiences. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2014;75C:12-24. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.06.016. PubMed PMID: 24998410.
109. Hazeltine LB, Badur MG, Lian X, Das A, Han W, Palecek SP. Temporal impact of substrate mechanics on differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Acta biomaterialia.* 2014;10(2):604-12. doi: 10.1016/j.actbio.2013.10.033. PubMed PMID: 24200714.
110. Pillekamp F, Haustein M, Khalil M, Emmelheinz M, Nazzal R, Adelman R, et al. Contractile properties of early human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: beta-adrenergic stimulation induces positive chronotropy and lusitropy but not inotropy. *Stem cells and development.* 2012;21(12):2111-21. doi: 10.1089/scd.2011.0312. PubMed PMID: 22268955.
111. Wendel JS, Ye L, Zhang P, Tranquillo RT, Zhang J. Functional Consequences of a Tissue-Engineered Myocardial Patch for Cardiac Repair in a Rat Infarct Model. *Tissue engineering Part A.* 2013. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0312. PubMed PMID: 24295499.
112. Zhang D, Shadrin IY, Lam J, Xian HQ, Snodgrass HR, Bursac N. Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials.* 2013;34(23):5813-20. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.026. PubMed PMID: 23642535; PubMed Central PMCID: PMC3660435.
113. Lu TY, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama G, et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature communications.* 2013;4:2307. doi: 10.1038/ncomms3307. PubMed PMID: 23942048.
114. Vunjak-Novakovic G, Lui KO, Tandon N, Chien KR. Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. *Annual review of biomedical engineering.* 2011;13:245-67. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124701. PubMed PMID: 21568715; PubMed Central PMCID: PMC3405288.
115. Nunes SS, Miklas JW, Liu J, Aschar-Sobbi R, Xiao Y, Zhang B, et al. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature methods.* 2013;10(8):781-7. doi: 10.1038/nmeth.2524. PubMed PMID: 23793239.
116. Navarrete EG, Liang P, Lan F, Sanchez-Freire V, Simmons C, Gong T, et al. Screening drug-induced arrhythmia events using human induced pluripotent stem cell-derived

- cardiomyocytes and low-impedance microelectrode arrays. *Circulation*. 2013;128(11 Suppl 1):S3-13. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000570. PubMed PMID: 24030418; PubMed Central PMCID: PMC3855862.
117. Dick E, Rajamohan D, Ronksley J, Denning C. Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening. *Biochemical Society transactions*. 2010;38(4):1037-45. doi: 10.1042/BST0381037. PubMed PMID: 20659000.
118. Muylaert DE, Fledderus JO, Bouten CV, Dankers PY, Verhaar MC. Combining tissue repair and tissue engineering; bioactivating implantable cell-free vascular scaffolds. *Heart*. 2014. doi: 10.1136/heartjnl-2014-306092. PubMed PMID: 25053725.
119. Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circulation research*. 2006;98(5):705-12. doi: 10.1161/01.RES.0000209515.59115.70. PubMed PMID: 16469955.
120. Treskes P, Neef K, Perumal Srinivasan S, Halbach M, Stamm C, Cowan D, et al. Preconditioning of skeletal myoblast-based engineered tissue constructs enables functional coupling to myocardium in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;149(1):348-56. doi: 10.1016/j.jtcvs.2014.09.034. PubMed PMID: 25439779; PubMed Central PMCID: PMC4476636.
121. Wendel JS, Ye L, Zhang P, Tranquillo RT, Zhang JJ. Functional consequences of a tissue-engineered myocardial patch for cardiac repair in a rat infarct model. *Tissue engineering Part A*. 2014;20(7-8):1325-35. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0312. PubMed PMID: 24295499; PubMed Central PMCID: PMC3993032.
122. Lesman A, Habib M, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Levenberg S, et al. Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle. *Tissue engineering Part A*. 2010;16(1):115-25. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0130. PubMed PMID: 19642856.
123. Hou L, Hu B, Jalife J. Genetically engineered excitable cardiac myofibroblasts coupled to cardiomyocytes rescue normal propagation and reduce arrhythmia complexity in heterocellular monolayers. *PloS one*. 2013;8(2):e55400. doi: 10.1371/journal.pone.0055400. PubMed PMID: 23393574; PubMed Central PMCID: PMC3564921.
124. Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circulation research*. 2006;98(6):801-10. doi: 10.1161/01.RES.0000214537.44195.a3. PubMed PMID: 16484613.
125. Ko HC, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *European cells & materials*. 2007;14:1-18; discussion -9. PubMed PMID: 17654452.
126. Ilic D, Devito L, Miere C, Codognotto S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br Med Bull*. 2015;116(1):19-27. doi: 10.1093/bmb/ldv045. PubMed PMID: 26582538.
127. Csobonyeiova M, Danisovic L, Polak S. Recent advances in iPSC technologies involving cardiovascular and neurodegenerative disease modeling. *Gen Physiol Biophys*. 2016;35(1):1-12. doi: 10.4149/gpb_2015023. PubMed PMID: 26492069.
128. Tallawi M, Rai R, Boccaccini AR, Aifantis KE. Effect of substrate mechanics on cardiomyocyte maturation and growth. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(1):157-65. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0383. PubMed PMID: 25148904; PubMed Central PMCID: PMC4321772.
129. Galie PA, Khalid N, Carnahan KE, Westfall MV, Stegemann JP. Substrate stiffness affects sarcomere and costamere structure and electrophysiological function of isolated adult

- cardiomyocytes. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2013;22(3):219-27. doi: 10.1016/j.carpath.2012.10.003. PubMed PMID: 23266222; PubMed Central PMCID: PMC3610795.
130. Engler AJ, Carag-Krieger C, Johnson CP, Raab M, Tang HY, Speicher DW, et al. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 22):3794-802. Epub 2008/10/30. doi: jcs.029678 [pii] 10.1242/jcs.029678. PubMed PMID: 18957515; PubMed Central PMCID: PMC2740334.
131. Dingal PC, Discher DE. Systems mechanobiology: tension-inhibited protein turnover is sufficient to physically control gene circuits. *Biophysical journal*. 2014;107(11):2734-43. doi: 10.1016/j.bpj.2014.10.042. PubMed PMID: 25468352; PubMed Central PMCID: PMC4255197.
132. Curran J, Makara MA, Little SC, Musa H, Liu B, Wu X, et al. EHD3-dependent endosome pathway regulates cardiac membrane excitability and physiology. *Circulation research*. 2014;115(1):68-78. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304149. PubMed PMID: 24759929; PubMed Central PMCID: PMC4065849.
133. Qiu Y, Bayomy AF, Gomez MV, Bauer M, Du P, Yang Y, et al. A role for matrix stiffness in the regulation of cardiac side population cell function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2015;308(9):H990-7. doi: 10.1152/ajpheart.00935.2014. PubMed PMID: 25724498; PubMed Central PMCID: PMC4551131.
134. van Putten S, Shafieyan Y, Hinz B. Mechanical control of cardiac myofibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.025. PubMed PMID: 26620422.
135. Heras-Bautista CO, Katsen-Globa A, Schloerer NE, Dieluweit S, Abd El Aziz OM, Peinkofer G, et al. The influence of physiological matrix conditions on permanent culture of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*. 2014;35(26):7374-85. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.027. PubMed PMID: 24889032.
136. Macri-Pellizzeri L, Pelacho B, Sancho A, Iglesias-Garcia O, Simon-Yarza AM, Soriano-Navarro M, et al. Substrate stiffness and composition specifically direct differentiation of induced pluripotent stem cells. *Tissue engineering Part A*. 2015;21(9-10):1633-41. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0251. PubMed PMID: 25668195.
137. Taggart P, Orini M, Hanson B, Hayward M, Clayton R, Dobrzynski H, et al. Developing a novel comprehensive framework for the investigation of cellular and whole heart electrophysiology in the in situ human heart: Historical perspectives, current progress and future prospects. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2014. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.004. PubMed PMID: 24972083.
138. Keller TaK, A. . Electrodes for transcutaneous (surface) electrical stimulation. *Journal of Automatic Control*. 2008;18(2):35-45. doi: 10.2298/JAC0802035K.
139. Plenk H, Jr. The role of materials biocompatibility for functional electrical stimulation applications. *Artificial organs*. 2011;35(3):237-41. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01221.x. PubMed PMID: 21401666.
140. Tandon N, Marsano A, Maidhof R, Wan L, Park H, Vunjak-Novakovic G. Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2011;5(6):e115-25. doi: 10.1002/term.377. PubMed PMID: 21604379; PubMed Central PMCID: PMC3117092.

141. Zhang P, Liu ZT, He GX, Liu JP, Feng J. Low-voltage direct-current stimulation is safe and promotes angiogenesis in rabbits with myocardial infarction. *Cell biochemistry and biophysics*. 2011;59(1):19-27. doi: 10.1007/s12013-010-9107-y. PubMed PMID: 20714826.
142. De Paula PM, Castania JA, Bonagamba LG, Salgado HC, Machado BH. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. *The American journal of physiology*. 1999;277(1 Pt 2):R31-8. PubMed PMID: 10409255.
143. Grobety M, Sedmera D, Kappenberger L. The chick embryo heart as an experimental setup for the assessment of myocardial remodeling induced by pacing. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. 1999;22(5):776-82. PubMed PMID: 10353138.
144. Schwaab B, Schwerdt H, Heisel A, Frohlig G, Schieffer H. Chronic ventricular pacing using an output amplitude of 1.0 volt. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. 1997;20(9 Pt 1):2171-8. PubMed PMID: 9309740.
145. Xiao Y, Zhang B, Liu H, Miklas JW, Gagliardi M, Pahnke A, et al. Microfabricated perfusable cardiac biowire: a platform that mimics native cardiac bundle. *Lab on a chip*. 2014;14(5):869-82. doi: 10.1039/c3lc51123e. PubMed PMID: 24352498; PubMed Central PMCID: PMC3969269.
146. Lu L, Mende M, Yang X, Korber HF, Schnittler HJ, Weinert S, et al. Design and validation of a bioreactor for simulating the cardiac niche: a system incorporating cyclic stretch, electrical stimulation, and constant perfusion. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(3-4):403-14. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0135. PubMed PMID: 22991978.
147. Barash Y, Dvir T, Tandeitnik P, Ruvinov E, Guterman H, Cohen S. Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2010;16(6):1417-26. doi: 10.1089/ten.TEC.2010.0068. PubMed PMID: 20367291.
148. Nick C, Joshi R, Schneider JJ, Thielemann C. Three-dimensional carbon nanotube electrodes for extracellular recording of cardiac myocytes. *Biointerphases*. 2012;7(1-4):58. doi: 10.1007/s13758-012-0058-2. PubMed PMID: 22956466.
149. Tung L, Sliz N, Mulligan MR. Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. *Circ Res*. 1991;69(3):722-30. Epub 1991/09/01. PubMed PMID: 1873867.
150. Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(52):18129-34. Epub 2004/12/18. doi: 0407817101 [pii] 10.1073/pnas.0407817101. PubMed PMID: 15604141; PubMed Central PMCID: PMC539727.
151. Martherus RS, Vanherle SJ, Timmer ED, Zeijlemaker VA, Broers JL, Smeets HJ, et al. Electrical signals affect the cardiomyocyte transcriptome independently of contraction. *Physiological genomics*. 2010;42A(4):283-9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00182.2009. PubMed PMID: 20858713.
152. Di Nardo P, Minieri M, Carbone A, Maggiano N, Micheletti R, Peruzzi G, et al. Myocardial expression of atrial natriuretic factor gene in early stages of hamster cardiomyopathy. *Molecular and cellular biochemistry*. 1993;125(2):179-92. PubMed PMID: 8283973.
153. Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, Pimental D, Ellingsen O, Marsh JD, et al. Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular

- myocytes in primary culture. *The American journal of physiology*. 1994;266(1 Pt 2):H341-9. PubMed PMID: 8304516.
154. Yang Z, Shen W, Rottman JN, Wikswo JP, Murray KT. Rapid stimulation causes electrical remodeling in cultured atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(2):299-308. PubMed PMID: 15698836.
155. Ling LH, Khammy O, Byrne M, Amirahmadi F, Foster A, Li G, et al. Irregular rhythm adversely influences calcium handling in ventricular myocardium: implications for the interaction between heart failure and atrial fibrillation. *Circulation Heart failure*. 2012;5(6):786-93. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.968321. PubMed PMID: 23014130.
156. Tremblay D, Cuerrier CM, Andrzejewski L, O'Brien ER, Pelling AE. A novel stretching platform for applications in cell and tissue mechanobiology. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014;(88). doi: 10.3791/51454. PubMed PMID: 24962250.
157. Sachs FaF, M.R. . *Cardiac mechano-electric coupling and arrhythmias*. Oxford: Oxford University Press xxx. 2011;(2nd ed2011):477 p.
158. Wang K, Terrar D, Gavaghan DJ, Mu UMR, Kohl P, Bollensdorff C. Living cardiac tissue slices: An organotypic pseudo two-dimensional model for cardiac biophysics research. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2014. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.08.006. PubMed PMID: 25124067.
159. Hamill OP, McBride DW, Jr. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev*. 1996;48(2):231-52. PubMed PMID: 8804105.
160. Peyronnet R, Tran D, Girault T, Frachisse JM. Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. *Front Plant Sci*. 2014;5:558. doi: 10.3389/fpls.2014.00558. PubMed PMID: 25374575; PubMed Central PMCID: PMC4204436.
161. Jacot JG, McCulloch AD, Omens JH. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophysical journal*. 2008;95(7):3479-87. doi: 10.1529/biophysj.107.124545. PubMed PMID: 18586852; PubMed Central PMCID: PMC2547444.
162. Youm JB, Han J, Kim N, Zhang YH, Kim E, Leem CH, et al. Role of Stretch-activated Channels in the Heart: Action Potential and Ca²⁺ Transients. In: Kamkin A, Kiseleva I, editors. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. Moscow2005.
163. Nakagawa A, Arita M, Shimada T, Shirabe J. Effects of mechanical stretch on the membrane potential of guinea pig ventricular muscles. *Jpn J Physiol*. 1988;38(6):819-38. PubMed PMID: 3249465.
164. Bowman CL, Gottlieb PA, Suchyna TM, Murphy YK, Sachs F. Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology. *Toxicon*. 2007;49(2):249-70. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.030. PubMed PMID: 17157345; PubMed Central PMCID: PMC1852511.
165. Riemer TL, Tung L. Stretch-induced excitation and action potential changes of single cardiac cells. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2003;82(1-3):97-110. PubMed PMID: 12732271.
166. Stacy GP, Jr., Jobe RL, Taylor LK, Hansen DE. Stretch-induced depolarizations as a trigger of arrhythmias in isolated canine left ventricles. *The American journal of physiology*. 1992;263(2 Pt 2):H613-21. PubMed PMID: 1510158.

167. Franz MR, Burkhoff D, Yue DT, Sagawa K. Mechanically induced action potential changes and arrhythmia in isolated and in situ canine hearts. *Cardiovascular research*. 1989;23(3):213-23. PubMed PMID: 2590905.
168. Qi Y, Li Z, Kong CW, Tang NL, Huang Y, Li RA, et al. Uniaxial cyclic stretch stimulates TRPV4 to induce realignment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;87:65-73. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.08.005. PubMed PMID: 26259779.
169. Lux M, Andree B, Horvath T, Nosko A, Manikowski D, Hilfiker-Kleiner D, et al. In vitro maturation of large-scale cardiac patches based on a perfusable starter matrix by cyclic mechanical stimulation. *Acta biomaterialia*. 2016;30:177-87. doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.006. PubMed PMID: 26546973.
170. Nguyen MD, Tinney JP, Ye F, Elnakib AA, Yuan F, El-Baz A, et al. Effects of physiologic mechanical stimulation on embryonic chick cardiomyocytes using a microfluidic cardiac cell culture model. *Analytical chemistry*. 2015;87(4):2107-13. doi: 10.1021/ac503716z. PubMed PMID: 25539164; PubMed Central PMCID: PMC4334242.
171. Banerjee I, Carrion K, Serrano R, Dyo J, Sasik R, Lund S, et al. Cyclic stretch of embryonic cardiomyocytes increases proliferation, growth, and expression while repressing Tgf-beta signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;79:133-44. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.11.003. PubMed PMID: 25446186; PubMed Central PMCID: PMC4302020.
172. Gannier F, White E, Garnier, Le Guennec JY. A possible mechanism for large stretch-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovascular research*. 1996;32(1):158-67. PubMed PMID: 8776413.
173. Saygili E, Rana OR, Saygili E, Reuter H, Frank K, Schwinger RH, et al. Losartan prevents stretch-induced electrical remodeling in cultured atrial neonatal myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;292(6):H2898-905. doi: 10.1152/ajpheart.00546.2006. PubMed PMID: 17293496.
174. Gaughan JP, Hefner CA, Houser SR. Electrophysiological properties of neonatal rat ventricular myocytes with alpha1-adrenergic-induced hypertrophy. *The American journal of physiology*. 1998;275(2 Pt 2):H577-90. PubMed PMID: 9683447.
175. Kunert-Keil C, Landsberger M, Jantzen F, Niessner F, Kroemer HK, Felix SB, et al. Molecular changes in the early phase of renin-dependent cardiac hypertrophy in hypertensive cypla1ren-2 transgenic rats. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2012. doi: 10.1177/1470320312460070. PubMed PMID: 23060473.
176. Morgan KY, Black LD, 3rd. It's all in the timing: Modeling isovolumic contraction through development and disease with a dynamic dual electromechanical bioreactor system. *Organogenesis*. 2014;10(3). PubMed PMID: 24836721.
177. Morgan KY, Black LD, 3rd. Investigation into the effects of varying frequency of mechanical stimulation in a cycle-by-cycle manner on engineered cardiac construct function. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2014. doi: 10.1002/term.1915. PubMed PMID: 24916022.
178. Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of biomechanics*. 2000;33(1):3-14. PubMed PMID: 10609513.

179. Kim BS, Mooney DJ. Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions. *Journal of biomechanical engineering*. 2000;122(3):210-5. PubMed PMID: 10923287.
180. Schurmann S, Wagner S, Herlitze S, Fischer C, Gumbrecht S, Wirth-Hucking A, et al. The IsoStretcher: An isotropic cell stretch device to study mechanical biosensor pathways in living cells. *Biosensors & bioelectronics*. 2016;81:363-72. doi: 10.1016/j.bios.2016.03.015. PubMed PMID: 26991603.
181. Verkerk AO, Wilders R, Coronel R, Ravensloot JH, Verheijck EE. Ionic remodeling of sinoatrial node cells by heart failure. *Circulation*. 2003;108(6):760-6. doi: 10.1161/01.CIR.0000083719.51661.B9. PubMed PMID: 12885752.
182. Qin Y, Zhang Z, Chen J, Ding X, Tong S, Song Z. Ca²⁺(+) disorder caused by rapid electrical field stimulation can be modulated by CaMKII δ expression in primary rat atrial myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;409(2):287-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.003. PubMed PMID: 21575598.
183. Salameh A, Wustmann A, Karl S, Blanke K, Apel D, Rojas-Gomez D, et al. Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circulation research*. 2010;106(10):1592-602. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214429. PubMed PMID: 20378856.
184. Tangney JR, Campbell SG, McCulloch AD, Omens JH. Timing and magnitude of systolic stretch affect myofilament activation and mechanical work. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;307(3):H353-60. doi: 10.1152/ajpheart.00233.2014. PubMed PMID: 24878774; PubMed Central PMCID: PMC4182292.
185. Kshitiz, Park J, Kim P, Helen W, Engler AJ, Levchenko A, et al. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 2012;4(9):1008-18. PubMed PMID: 23077731; PubMed Central PMCID: PMC3476065.
186. Boerboom RA, Rubbens MP, Driessen NJ, Bouten CV, Baaijens FP. Effect of strain magnitude on the tissue properties of engineered cardiovascular constructs. *Annals of biomedical engineering*. 2008;36(2):244-53. doi: 10.1007/s10439-007-9413-8. PubMed PMID: 18066665; PubMed Central PMCID: PMC2211363.
187. Feng Z, Matsumoto T, Nomura Y, Nakamura T. An electro-tensile bioreactor for 3-D culturing of cardiomyocytes. A bioreactor system that simulates the myocardium's electrical and mechanical response in vivo. *IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society*. 2005;24(4):73-9. PubMed PMID: 16119216.
188. Zhuang J, Yamada KA, Saffitz JE, Kleber AG. Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. *Circulation research*. 2000;87(4):316-22. PubMed PMID: 10948066.
189. Salameh A, Apel D, Gonzalez Casanova J, von Salisch S, Mohr FW, Daehnert I, et al. On the different roles of AT1 and AT2 receptors in stretch-induced changes of connexin43 expression and localisation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2012;464(5):535-47. doi: 10.1007/s00424-012-1161-4. PubMed PMID: 23007463.
190. Kreutzer J, Ikonen L, Hirvonen J, Pekkanen-Mattila M, Aalto-Setälä K, Kallio P. Pneumatic cell stretching system for cardiac differentiation and culture. *Medical engineering & physics*. 2013. doi: 10.1016/j.medengphy.2013.09.008. PubMed PMID: 24148238.

191. Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bonnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *The Journal of cell biology*. 2004;166(6):877-87. doi: 10.1083/jcb.200405004. PubMed PMID: 15364962; PubMed Central PMCID: PMC2172122.
192. Hazeltine LB, Simmons CS, Salick MR, Lian X, Badur MG, Han W, et al. Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells. *International journal of cell biology*. 2012;2012:508294. doi: 10.1155/2012/508294. PubMed PMID: 22649451; PubMed Central PMCID: PMC3357596.
193. Horning M, Kidoaki S, Kawano T, Yoshikawa K. Rigidity matching between cells and the extracellular matrix leads to the stabilization of cardiac conduction. *Biophysical journal*. 2012;102(3):379-87. doi: 10.1016/j.bpj.2011.12.018. PubMed PMID: 22325259; PubMed Central PMCID: PMC3274804.
194. Brown XQ, Ookawa K, Wong JY. Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Biomaterials*. 2005;26(16):3123-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.009. PubMed PMID: 15603807.
195. Yang CH, Wang MX, Haider H, Yang JH, Sun JY, Chen YM, et al. Strengthening alginate/polyacrylamide hydrogels using various multivalent cations. *ACS applied materials & interfaces*. 2013;5(21):10418-22. doi: 10.1021/am403966x. PubMed PMID: 24128011.
196. Annabi N, Selimovic S, Acevedo Cox JP, Ribas J, Afshar Bakooshli M, Heintze D, et al. Hydrogel-coated microfluidic channels for cardiomyocyte culture. *Lab on a chip*. 2013;13(18):3569-77. doi: 10.1039/c3lc50252j. PubMed PMID: 23728018; PubMed Central PMCID: PMC3744594.
197. Macfelda K, Kapeller B, Wilbacher I, Losert UM. Behavior of cardiomyocytes and skeletal muscle cells on different extracellular matrix components--relevance for cardiac tissue engineering. *Artificial organs*. 2007;31(1):4-12. doi: 10.1111/j.1525-1594.2007.00334.x. PubMed PMID: 17209955.
198. Laurila E, Ahola A, Hyttinen J, Aalto-Setälä K. Methods for in vitro functional analysis of iPSC derived cardiomyocytes - Special focus on analyzing the mechanical beating behavior. *Biochimica et biophysica acta*. 2015. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.013. PubMed PMID: 26707468.
199. Bub G, Shrier A, Glass L. Global organization of dynamics in oscillatory heterogeneous excitable media. *Physical review letters*. 2005;94(2):028105. PubMed PMID: 15698236.
200. Duverger JE, Boudreau-Beland J, Le MD, Comtois P. Multicellular automaticity of cardiac cell monolayers: effects of density and spatial distribution of pacemaker cells. *New Journal of Physics*. 2014:Accepted for publication 6 october 2014.
201. Bursac N, Parker KK, Irvanian S, Tung L. Cardiomyocyte cultures with controlled macroscopic anisotropy: a model for functional electrophysiological studies of cardiac muscle. *Circ Res*. 2002;91(12):e45-54.
202. Arutunyan A, Webster DR, Swift LM, Sarvazyan N. Localized injury in cardiomyocyte network: a new experimental model of ischemia-reperfusion arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(4):H1905-15. Epub 2001/03/15. PubMed PMID: 11247808; PubMed Central PMCID: PMC3019580.

203. Bub G, Tateno K, Shrier A, Glass L. Spontaneous initiation and termination of complex rhythms in cardiac cell culture. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2003;14(10 Suppl):S229-36. PubMed PMID: 14760928.
204. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological reviews*. 2008;88(3):919-82. doi: 10.1152/physrev.00018.2007. PubMed PMID: 18626064.
205. Sirenko S, Yang D, Li Y, Lyashkov AE, Lukyanenko YO, Lakatta EG, et al. Ca²⁺(+)-dependent phosphorylation of Ca²⁺(+) cycling proteins generates robust rhythmic local Ca²⁺(+) releases in cardiac pacemaker cells. *Science signaling*. 2013;6(260):ra6. doi: 10.1126/scisignal.2003391. PubMed PMID: 23362239.
206. El Khoury N, Mathieu S, Marger L, Ross J, El Gebeily G, Ethier N, et al. Upregulation of the hyperpolarization-activated current increases pacemaker activity of the sinoatrial node and heart rate during pregnancy in mice. *Circulation*. 2013;127(20):2009-20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001689. PubMed PMID: 23609807.
207. Rozanski GJ, Lipsius SL. Electrophysiology of functional subsidiary pacemakers in canine right atrium. *The American journal of physiology*. 1985;249(3 Pt 2):H594-603. PubMed PMID: 4037107.
208. Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Roles of hyperpolarization-activated current *I_f* in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(6):H1748-60. doi: 10.1152/ajpheart.00729.2009. PubMed PMID: 20363885.
209. Maltsev VA, Lakatta EG. Normal heart rhythm is initiated and regulated by an intracellular calcium clock within pacemaker cells. *Heart Lung Circ*. 2007;16(5):335-48. Epub 2007/09/11. doi: S1443-9506(07)00843-8 [pii] 10.1016/j.hlc.2007.07.005. PubMed PMID: 17827062; PubMed Central PMCID: PMC2078332.
210. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. Epub 2002/01/24. doi: 10.1038/415198a 415198a [pii]. PubMed PMID: 11805843.
211. Sachs F, Franz MR. Cardiac mechano-electric coupling and arrhythmias. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2011. xxx, 477 p. p.
212. Cooper PJ, Kohl P. Species- and preparation-dependence of stretch effects on sinoatrial node pacemaking. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1047:324-35. Epub 2005/08/12. doi: 1047/1/324 [pii] 10.1196/annals.1341.029. PubMed PMID: 16093508.
213. Kuijpers NH, ten Eikelder HM, Bovendeerd PH, Verheule S, Arts T, Hilbers PA. Mechanoelectric feedback leads to conduction slowing and block in acutely dilated atria: a modeling study of cardiac electromechanics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(6):H2832-53. PubMed PMID: 17277026.
214. Grevesse T, Versaevel M, Circelli G, Desprez S, Gabriele S. A simple route to functionalize polyacrylamide hydrogels for the independent tuning of mechanotransduction cues. *Lab on a chip*. 2013;13(5):777-80. doi: 10.1039/c2lc41168g. PubMed PMID: 23334710.
215. Bhana B, Iyer RK, Chen WL, Zhao R, Sider KL, Likhitanichkul M, et al. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. *Biotechnol Bioeng*. 2010;105(6):1148-60. Epub 2009/12/17. doi: 10.1002/bit.22647. PubMed PMID: 20014437.

216. Li D, Zhou J, Chowdhury F, Cheng J, Wang N, Wang F. Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells. *Regenerative medicine*. 2011;6(2):229-40. doi: 10.2217/rme.11.2. PubMed PMID: 21391856; PubMed Central PMCID: PMC3128460.
217. Evans ND, Minelli C, Gentleman E, LaPointe V, Patankar SN, Kallivretaki M, et al. Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells. *European cells & materials*. 2009;18:1-13; discussion -4. PubMed PMID: 19768669.
218. Arshi A, Nakashima Y, Nakano H, Eaimkhong S, Evseenko D, Reed J, et al. Rigid microenvironments promote cardiac differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2013;14(2). doi: Artn 025003 Doi 10.1088/1468-6996/14/2/025003. PubMed PMID: WOS:000318267000005.
219. Palchesko RN, Zhang L, Sun Y, Feinberg AW. Development of polydimethylsiloxane substrates with tunable elastic modulus to study cell mechanobiology in muscle and nerve. *PloS one*. 2012;7(12):e51499. doi: 10.1371/journal.pone.0051499. PubMed PMID: 23240031; PubMed Central PMCID: PMC3519875.
220. Maji D, Lahiri SK, Das S. Study of hydrophilicity and stability of chemically modified PDMS surface using piranha and KOH solution. *Surface and Interface Analysis*. 2012;44(1):62-9. doi: 10.1002/sia.3770.
221. Brown DA, Beygui RE, MacLellan WR, Laks H, Dunn JC, Wu BM. Modulation of gene expression in neonatal rat cardiomyocytes by surface modification of polylactide-co-glycolide substrates. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2005;74(3):419-29. doi: 10.1002/jbm.a.30344. PubMed PMID: 15973694.
222. Morris GM, Boyett MR. Perspectives -- biological pacing, a clinical reality? *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2009;3(6):479-83. Epub 2009/09/01. doi: 1753944709345792 [pii] 10.1177/1753944709345792. PubMed PMID: 19717570.
223. Kanakov OI, Osipov GV, Chan CK, Kurths J. Cluster synchronization and spatio-temporal dynamics in networks of oscillatory and excitable Luo-Rudy cells. *Chaos*. 2007;17(1):015111. doi: 10.1063/1.2437581. PubMed PMID: 17411268.
224. Kryukov AK, Petrov VS, Averyanova LS, Osipov GV, Chen W, Drugova O, et al. Synchronization phenomena in mixed media of passive, excitable, and oscillatory cells. *Chaos*. 2008;18(3):037129. doi: 10.1063/1.2956985. PubMed PMID: 19045503.
225. Larsen JK, Mitchell JW, Best PM. Quantitative analysis of the expression and distribution of calcium channel alpha 1 subunit mRNA in the atria and ventricles of the rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(5):519-32. doi: 10.1006/jmcc.2001.1534. PubMed PMID: 12056856.
226. Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res*. 2007;101(8):755-8. Epub 2007/09/18. doi: 10.1161/circresaha.107.160549. PubMed PMID: 17872460.
227. Zlochiver S, Munoz V, Vikstrom KL, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Electrotonic Myofibroblast-to-Myocyte Coupling Increases Propensity to Reentrant Arrhythmias in 2-Dimensional Cardiac Monolayers. *Biophys J*. 2008. Epub 2008/07/29. doi: biophysj.108.136473 [pii] 10.1529/biophysj.108.136473. PubMed PMID: 18658226.
228. Aguilar M, Qi XY, Huang H, Comtois P, Nattel S. Fibroblast electrical remodeling in heart failure and potential effects on atrial fibrillation. *Biophys J*. 2014;107(10):2444-55. Epub 2014/11/25. doi: 10.1016/j.bpj.2014.10.014. PubMed PMID: 25418313; PubMed Central PMCID: PMC4241450.

229. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993;75(5):977-84. PubMed PMID: 8252633.
230. De Jong AM, Maass AH, Oberdorf-Maass SU, De Boer RA, Van Gilst WH, Van Gelder IC. Cyclical stretch induces structural changes in atrial myocytes. *J Cell Mol Med*. 2013;17(6):743-53. doi: 10.1111/jcmm.12064. PubMed PMID: 23617620.
231. Sadoshima J, Takahashi T, Jahn L, Izumo S. Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(20):9905-9. PubMed PMID: 1384064; PubMed Central PMCID: PMC50242.
232. Pimentel RC, Yamada KA, Kleber AG, Saffitz JE. Autocrine regulation of myocyte Cx43 expression by VEGF. *Circulation research*. 2002;90(6):671-7. PubMed PMID: 11934834.
233. Wang JA, Lin W, Morris T, Banderali U, Juranka PF, Morris CE. Membrane trauma and Na⁺ leak from Nav1.6 channels. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297(4):C823-34. doi: 10.1152/ajpcell.00505.2008. PubMed PMID: 19657055.
234. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2005;60(1):24-34. doi: 10.1002/cm.20041. PubMed PMID: 15573414.
235. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005;310(5751):1139-43. doi: 10.1126/science.1116995. PubMed PMID: 16293750.
236. Shapira-Schweitzer K, Seliktar D. Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial. *Acta Biomater*. 2007;3(1):33-41. doi: 10.1016/j.actbio.2006.09.003. PubMed PMID: 17098488.
237. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368-73. doi: 10.1038/nature05058. PubMed PMID: 16871203.
238. Bursac N, Tung L. Acceleration of functional reentry by rapid pacing in anisotropic cardiac monolayers: formation of multi-wave functional reentries. *Cardiovasc Res*. 2006;69(2):381-90. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.09.014. PubMed PMID: 16274682.
239. Entcheva E, Lu SN, Troppman RH, Sharma V, Tung L. Contact fluorescence imaging of reentry in monolayers of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11(6):665-76. Epub 2000/06/27. PubMed PMID: 10868740.
240. Bursac N, Aguel F, Tung L. Multiarm spirals in a two-dimensional cardiac substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15530-4.
241. Bub G, Glass L, Publicover NG, Shrier A. Bursting calcium rotors in cultured cardiac myocyte monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10283-7.
242. Orita H, Fukasawa M, Hirooka S, Uchino H, Fukui K, Washio M. Modulation of cardiac myocyte beating rate and hypertrophy by cardiac fibroblasts isolated from neonatal rat ventricle. *Japanese circulation journal*. 1993;57(9):912-20. PubMed PMID: 8371484.
243. Ladoux B, Nicolas A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on progress in physics Physical Society*. 2012;75(11):116601. doi: 10.1088/0034-4885/75/11/116601. PubMed PMID: 23085962.

244. Poelzing S, Rosenbaum DS. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;287(4):H1762-70. doi: 10.1152/ajpheart.00346.2004. PubMed PMID: 15205174.
245. Comtois P, Vinet A. Multistability of reentrant rhythms in an ionic model of a two-dimensional annulus of cardiac tissue. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2005;72(5 Pt 1):051927. PubMed PMID: 16383665.
246. Comtois P, Vinet A. Curvature effects on activation speed and repolarization in an ionic model of cardiac myocytes. *Physical review E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics*. 1999;60(4 Pt B):4619-28. PubMed PMID: 11970323.
247. Ponard JG, Kondratyev AA, Kucera JP. Mechanisms of intrinsic beating variability in cardiac cell cultures and model pacemaker networks. *Biophysical journal*. 2007;92(10):3734-52. doi: 10.1529/biophysj.106.091892. PubMed PMID: 17325022; PubMed Central PMCID: PMC1853135.
248. Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ Res*. 2001;89(1):E8-14. PubMed PMID: 11440985.
249. Yaniv Y, Stern MD, Lakatta EG, Maltsev VA. Mechanisms of beat-to-beat regulation of cardiac pacemaker cell function by Ca²⁺(+) cycling dynamics. *Biophysical journal*. 2013;105(7):1551-61. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.024. PubMed PMID: 24094396; PubMed Central PMCID: PMC3791306.
250. Yaniv Y, Spurgeon HA, Lyashkov AE, Yang D, Ziman BD, Maltsev VA, et al. Crosstalk between mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling modulates cardiac pacemaker cell automaticity. *PloS one*. 2012;7(5):e37582. doi: 10.1371/journal.pone.0037582. PubMed PMID: 22666369; PubMed Central PMCID: PMC3362629.
251. Kurata Y, Hisatome I, Matsuda H, Shibamoto T. Dynamical mechanisms of pacemaker generation in IK1-downregulated human ventricular myocytes: insights from bifurcation analyses of a mathematical model. *Biophys J*. 2005;89(4):2865-87. doi: 10.1529/biophysj.105.060830. PubMed PMID: 16040746; PubMed Central PMCID: PMC1366784.
252. Mesirca P, Marger L, Toyoda F, Rizzetto R, Audoubert M, Dubel S, et al. The G-protein-gated K⁺ channel, IKACH, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. *J Gen Physiol*. 2013;142(2):113-26. doi: 10.1085/jgp.201310996. PubMed PMID: 23858001; PubMed Central PMCID: PMC3727310.
253. Rocchetti M, Malfatto G, Lombardi F, Zaza A. Role of the input/output relation of sinoatrial myocytes in cholinergic modulation of heart rate variability. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11(5):522-30. PubMed PMID: 10826931.
254. Fleischmann BK, Duan Y, Fan Y, Schoneberg T, Ehlich A, Lenka N, et al. Differential subunit composition of the G protein-activated inward-rectifier potassium channel during cardiac development. *J Clin Invest*. 2004;114(7):994-1001. doi: 10.1172/JCI15925. PubMed PMID: 15467839; PubMed Central PMCID: PMC518658.
255. Kim TJ, Sun J, Lu S, Zhang J, Wang Y. The regulation of beta-adrenergic receptor-mediated PKA activation by substrate stiffness via microtubule dynamics in human MSCs. *Biomaterials*. 2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.018. PubMed PMID: 24973298.

256. Averin AS, Zakharova NM, Ignat'ev DA, Tarlachkov SV, Nakipova OV. [Effect of isoproterenol on contractility of the heart papillary muscles of a ground squirrel]. *Biofizika*. 2010;55(5):910-7. PubMed PMID: 21033361.
257. Moorthy BS, Gao Y, Anand GS. Phosphodiesterases catalyze hydrolysis of cAMP-bound to regulatory subunit of protein kinase A and mediate signal termination. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(2):M110 002295. doi: 10.1074/mcp.M110.002295. PubMed PMID: 20923972; PubMed Central PMCID: PMC3033673.
258. Hua R, Adamczyk A, Robbins C, Ray G, Rose RA. Distinct patterns of constitutive phosphodiesterase activity in mouse sinoatrial node and atrial myocardium. *PloS one*. 2012;7(10):e47652. doi: 10.1371/journal.pone.0047652. PubMed PMID: 23077656; PubMed Central PMCID: PMC3471891.
259. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ, et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*. 2014;129(14):1483-92. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004042. PubMed PMID: 24573352; PubMed Central PMCID: PMC4181359.
260. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2009;104(4):e30-41. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192237. PubMed PMID: 19213953; PubMed Central PMCID: PMC2741334.
261. Wang L, Liu Z, Yin C, Asfour H, Chen O, Li Y, et al. Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circ Res*. 2015;116(2):237-44. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305547. PubMed PMID: 25416133; PubMed Central PMCID: PMC4299697.
262. Tulloch NL, Muskheli V, Razumova MV, Korte FS, Regnier M, Hauch KD, et al. Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res*. 2011;109(1):47-59. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237206. PubMed PMID: 21597009; PubMed Central PMCID: PMC3140796.
263. Jackman CP, Shadrin IY, Carlson AL, Bursac N. Human Cardiac Tissue Engineering: From Pluripotent Stem Cells to Heart Repair. *Curr Opin Chem Eng*. 2015;7:57-64. doi: 10.1016/j.coche.2014.11.004. PubMed PMID: 25599018; PubMed Central PMCID: PMC4293542.
264. Sathaye A, Bursac N, Sheehy S, Tung L. Electrical pacing counteracts intrinsic shortening of action potential duration of neonatal rat ventricular cells in culture. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(4):633-41. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.06.076. PubMed PMID: 16950369.
265. Rangarajan S, Madden L, Bursac N. Use of flow, electrical, and mechanical stimulation to promote engineering of striated muscles. *Ann Biomed Eng*. 2014;42(7):1391-405. doi: 10.1007/s10439-013-0966-4. PubMed PMID: 24366526; PubMed Central PMCID: PMC4069203.
266. Kensah G, Gruh I, Viering J, Schumann H, Dahlmann J, Meyer H, et al. A Novel Miniaturized Multimodal Bioreactor for Continuous In Situ Assessment of Bioartificial Cardiac Tissue During Stimulation and Maturation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011. Epub 2010/12/15. doi: 10.1089/ten.TEC.2010.0405. PubMed PMID: 21142417.
267. Nussinovitch U, Gepstein L. Optogenetics for in vivo cardiac pacing and resynchronization therapies. *Nature biotechnology*. 2015;33(7):750-4. doi: 10.1038/nbt.3268. PubMed PMID: 26098449.

268. Knisley SB, Hill BC. Effects of bipolar point and line stimulation in anisotropic rabbit epicardium: assessment of the critical radius of curvature for longitudinal block. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1995;42(10):957-66.
269. Pietronave S, Zamperone A, Oltolina F, Colangelo D, Follenzi A, Novelli E, et al. Monophasic and biphasic electrical stimulation induces a precardiac differentiation in progenitor cells isolated from human heart. *Stem cells and development.* 2014;23(8):888-98. doi: 10.1089/scd.2013.0375. PubMed PMID: 24328510; PubMed Central PMCID: PMC3991992.
270. Jacot JG, Raskin AJ, Omens JH, McCulloch AD, Tung L. Mechano-transduction in Cardiac and Stem-Cell Derived Cardiac Cells. 2010:99-139. doi: 10.1007/978-90-481-2850-1_5.
271. Thangawng AL, Ruoff RS, Swartz MA, Glucksberg MR. An ultra-thin PDMS membrane as a bio/micro-nano interface: fabrication and characterization. *Biomedical microdevices.* 2007;9(4):587-95. doi: 10.1007/s10544-007-9070-6. PubMed PMID: 17516172.
272. Boudreau-Beland J, Duverger JE, Petitjean E, Maguy A, Ledoux J, Comtois P. Spatiotemporal stability of neonatal rat cardiomyocyte monolayers spontaneous activity is dependent on the culture substrate. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127977. doi: 10.1371/journal.pone.0127977. PubMed PMID: 26035822; PubMed Central PMCID: PMC4452796.
273. Badie N, Scull JA, Klinger RY, Krol A, Bursac N. Conduction block in micropatterned cardiomyocyte cultures replicating the structure of ventricular cross-sections. *Cardiovasc Res.* 2012;93(2):263-71. Epub 2011/11/11. doi: 10.1093/cvr/cvr304
cvr304 [pii]. PubMed PMID: 22072633.
274. Munoz V, Grzeda KR, Desplantez T, Pandit SV, Mironov S, Taffet SM, et al. Adenoviral expression of IKs contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circ Res.* 2007;101(5):475-83. Epub 2007/07/14. doi: CIRCRESAHA.107.149617 [pii]
10.1161/CIRCRESAHA.107.149617. PubMed PMID: 17626898.
275. Tandon N, Goh B, Marsano A, Chao PH, Montouri-Sorrentino C, Gimble J, et al. Alignment and elongation of human adipose-derived stem cells in response to direct-current electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009;2009:6517-21. Epub 2009/12/08. doi: 10.1109/IEMBS.2009.5333142. PubMed PMID: 19964171; PubMed Central PMCID: PMC2791914.
276. Ling LH, Khammy O, Byrne M, Amirahmadi F, Foster A, Li G, et al. Irregular rhythm adversely influences calcium handling in ventricular myocardium: implications for the interaction between heart failure and atrial fibrillation. *Circ Heart Fail.* 2012;5(6):786-93. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.968321. PubMed PMID: 23014130.
277. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 1992;267(15):10551-60. Epub 1992/05/25. PubMed PMID: 1534087.
278. Lau JJ, Wang RM, Black LD, 3rd. Development of an arbitrary waveform membrane stretcher for dynamic cell culture. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(5):1062-73. doi: 10.1007/s10439-014-0976-x. PubMed PMID: 24473700; PubMed Central PMCID: PMC3976041.

279. Le Guennec JY, Peineau N, Argibay JA, Mongo KG, Garnier D. A new method of attachment of isolated mammalian ventricular myocytes for tension recording: length dependence of passive and active tension. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22(10):1083-93. Epub 1990/10/01. doi: 0022-2828(90)90072-A [pii]. PubMed PMID: 2095433.
280. Rana OR, Zobel C, Saygili E, Brixius K, Gramley F, Schimpf T, et al. A simple device to apply equibiaxial strain to cells cultured on flexible membranes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(1):H532-40. Epub 2007/10/30. doi: 00649.2007 [pii] 10.1152/ajpheart.00649.2007. PubMed PMID: 17965285.
281. Lee AA, Delhaas T, Waldman LK, MacKenna DA, Villarreal FJ, McCulloch AD. An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 1):C1400-8. Epub 1996/10/01. PubMed PMID: 8897847.
282. Nitsan I, Drori S, Lewis YE, Cohen S, Tzlil S. Mechanical communication in cardiac cell synchronized beating. *Nature Physics.* 2016. doi: 10.1038/nphys3619.
283. Duverger JE, Boudreau-Béland J, Le MD, Comtois P. Multicellular automaticity of cardiac cell monolayers: effects of density and spatial distribution of pacemaker cells. *New Journal of Physics.* 2014;16(11):113046.
284. Béland JB, Duverger JE, Comtois P. Génie tissulaire appliqué à l'activité électrique cardiaque autonome: une alternative au pacemaker électronique? Tissue engineering applied to cardiac autonomous activity: an alternative to electronic pacemaker? *Médecine/Sciences Amérique.* 2013;2(2):1.
285. Stevens JL, Baker TK. The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. *Drug Discov Today.* 2009;14(3-4):162-7. doi: 10.1016/j.drudis.2008.11.009. PubMed PMID: 19100337.
286. Ferri N, Siegl P, Corsini A, Herrmann J, Lerman A, Benghozi R. Drug attrition during pre-clinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity. *Pharmacol Ther.* 2013;138(3):470-84. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.03.005. PubMed PMID: 23507039.
287. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(5):978-89. doi: 10.1021/tx800002r. PubMed PMID: 18376852.
288. Schimmel KJ, Richel DJ, van den Brink RB, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):181-91. doi: 10.1016/j.ctrv.2003.07.003. PubMed PMID: 15023436.
289. Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation.* 2004;109(25):3122-31. doi: 10.1161/01.CIR.0000133187.74800.B9. PubMed PMID: 15226229.
290. Desai VG, Herman EH, Moland CL, Branham WS, Lewis SM, Davis KJ, et al. Development of doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in the B6C3F1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;266(1):109-21. doi: 10.1016/j.taap.2012.10.025. PubMed PMID: 23142469.
291. Alderton PM, Gross J, Green MD. Comparative study of doxorubicin, mitoxantrone, and epirubicin in combination with ICRF-187 (ADR-529) in a chronic cardiotoxicity animal model. *Cancer Res.* 1992;52(1):194-201. PubMed PMID: 1727379.
292. Herman EH, Rahman A, Ferrans VJ, Vick JA, Schein PS. Prevention of chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles by liposomal encapsulation. *Cancer Res.* 1983;43(11):5427-32. PubMed PMID: 6616474.

293. Dorr RT, Bozak KA, Shipp NG, Hendrix M, Alberts DS, Ahmann F. In vitro rat myocyte cardiotoxicity model for antitumor antibiotics using adenosine triphosphate/protein ratios. *Cancer Res.* 1988;48(18):5222-7. PubMed PMID: 3409247.
294. Shirhatti V, George M, Chenery R, Krishna G. Structural requirements for inducing cardiotoxicity by anthracycline antibiotics: studies with neonatal rat cardiac myocytes in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986;84(1):173-91. PubMed PMID: 3459265.
295. Feinberg AW, Alford PW, Jin H, Ripplinger CM, Werdich AA, Sheehy SP, et al. Controlling the contractile strength of engineered cardiac muscle by hierarchical tissue architecture. *Biomaterials.* 2012;33(23):5732-41. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.043. PubMed PMID: 22594976; PubMed Central PMCID: PMC4026933.
296. Sheehy SP, Grosberg A, Parker KK. The contribution of cellular mechanotransduction to cardiomyocyte form and function. *Biomech Model Mechanobiol.* 2012;11(8):1227-39. doi: 10.1007/s10237-012-0419-2. PubMed PMID: 22772714; PubMed Central PMCID: PMC3786397.
297. Sham JS, Hatem SN, Morad M. Species differences in the activity of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in mammalian cardiac myocytes. *J Physiol.* 1995;488 (Pt 3):623-31. PubMed PMID: 8576853; PubMed Central PMCID: PMC1156729.
298. Grosberg A, Alford PW, McCain ML, Parker KK. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip. *Lab Chip.* 2011;11(24):4165-73. Epub 2011/11/11. doi: 10.1039/c1lc20557a. PubMed PMID: 22072288.
299. McCain ML, Sheehy SP, Grosberg A, Goss JA, Parker KK. Recapitulating maladaptive, multiscale remodeling of failing myocardium on a chip. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(24):9770-5. doi: 10.1073/pnas.1304913110. PubMed PMID: 23716679; PubMed Central PMCID: PMC3683774.
300. Chiu LL, Iyer RK, King JP, Radisic M. Biphasic electrical field stimulation aids in tissue engineering of multicell-type cardiac organoids. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(11-12):1465-77. Epub 2008/09/12. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0244. PubMed PMID: 18783322; PubMed Central PMCID: PMC3098954.
301. McCain ML, Agarwal A, Nesmith HW, Nesmith AP, Parker KK. Micromolded gelatin hydrogels for extended culture of engineered cardiac tissues. *Biomaterials.* 2014;35(21):5462-71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.052. PubMed PMID: 24731714; PubMed Central PMCID: PMC4057039.
302. Rohr S. A computerized device for long-term measurements of the contraction frequency of cultured rat heart cells under stable incubating conditions. *Pflugers Arch.* 1990;416(1-2):201-6. Epub 1990/04/01. PubMed PMID: 2352834.
303. Zheng G, Lee SA, Antebi Y, Elowitz MB, Yang C. The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (SPSM). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(41):16889-94. doi: 10.1073/pnas.1110681108. PubMed PMID: 21969539; PubMed Central PMCID: PMC3193234.
304. Korhonen T, Hanninen SL, Tavi P. Model of excitation-contraction coupling of rat neonatal ventricular myocytes. *Biophys J.* 2009;96(3):1189-209. Epub 2009/02/03. doi: S0006-3495(08)00099-4 [pii] 10.1016/j.bpj.2008.10.026. PubMed PMID: 19186154; PubMed Central PMCID: PMC2716686.

305. Wang LJ, Sobie EA. Mathematical model of the neonatal mouse ventricular action potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(6):H2565-75. Epub 2008/04/15. doi: 01376.2007 [pii] 10.1152/ajpheart.01376.2007. PubMed PMID: 18408122.
306. Cerbai E, Pino R, Sartiani L, Mugelli A. Influence of postnatal-development on I(f) occurrence and properties in neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovascular research*. 1999;42(2):416-23. PubMed PMID: 10533577.
307. Wickenden AD, Kaprielian R, Parker TG, Jones OT, Backx PH. Effects of development and thyroid hormone on K⁺ currents and K⁺ channel gene expression in rat ventricle. *The Journal of physiology*. 1997;504 (Pt 2):271-86. PubMed PMID: 9365903; PubMed Central PMCID: PMCPMC1159909.
308. Rice JJ, Wang F, Bers DM, de Tombe PP. Approximate model of cooperative activation and crossbridge cycling in cardiac muscle using ordinary differential equations. *Biophysical journal*. 2008;95(5):2368-90. doi: 10.1529/biophysj.107.119487. PubMed PMID: 18234826; PubMed Central PMCID: PMCPMC2517033.
309. Kim SB, Bae H, Cha JM, Moon SJ, Dokmeci MR, Cropek DM, et al. A cell-based biosensor for real-time detection of cardiotoxicity using lensfree imaging. *Lab Chip*. 2011;11(10):1801-7. doi: 10.1039/c1lc20098d. PubMed PMID: 21483937; PubMed Central PMCID: PMC3611966.
310. Agustini FD, Arozal W, Louisa M, Siswanto S, Soetikno V, Nafrialdi N, et al. Cardioprotection mechanism of mangiferin on doxorubicin-induced rats: Focus on intracellular calcium regulation. *Pharm Biol*. 2015:1-9. doi: 10.3109/13880209.2015.1073750. PubMed PMID: 26440532.
311. Pushkarsky I, Liu Y, Weaver W, Su TW, Mudanyali O, Ozcan A, et al. Automated single-cell motility analysis on a chip using lensfree microscopy. *Sci Rep*. 2014;4:4717. doi: 10.1038/srep04717. PubMed PMID: 24739819; PubMed Central PMCID: PMC3989554.
312. Pinto VI, Mohammadi H, Lee WS, Cheung AH, McCulloch CA. PAK1 is involved in sensing the orientation of collagen stiffness gradients in mouse fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(10 Pt A):2526-38. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.019. PubMed PMID: 26025676.
313. Wang Y, Tsui H, Ke Y, Shi Y, Li Y, Davies L, et al. Pak1 is required to maintain ventricular Ca²⁺(+) homeostasis and electrophysiological stability through SERCA2a regulation in mice. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2014;7(5):938-48. doi: 10.1161/CIRCEP.113.001198. PubMed PMID: 25217043; PubMed Central PMCID: PMCPMC4213946.
314. Nemeč J, Kim JJ, Salama G. The link between abnormal calcium handling and electrical instability in acquired long QT syndrome - Does calcium precipitate arrhythmic storms? *Progress in biophysics and molecular biology*. 2015. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.11.003. PubMed PMID: 26631594.
315. Fromaget C, el Aoumari A, Gros D. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*. 1992;51(1):9-20. PubMed PMID: 1333424.
316. Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):1429-47. doi: 10.3390/ijms16011429. PubMed PMID: 25580535; PubMed Central PMCID: PMCPMC4307311.

317. Boink GJ, Duan L, Nearing BD, Shlapakova IN, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, et al. HCN2/SkM1 gene transfer into canine left bundle branch induces stable, autonomically responsive biological pacing at physiological heart rates. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(11):1192-201. doi: 10.1016/j.jacc.2012.12.031. PubMed PMID: 23395072.
318. Myers JD, Jacot JG. The Effect of Substrate Stiffness on Cardiomyocyte Calcium Currents. *Biophysical journal*. 2012;102(3):128a. doi: 10.1016/j.bpj.2011.11.713.
319. Young JL, Kretchmer K, Ondeck MG, Zambon AC, Engler AJ. Mechanosensitive kinases regulate stiffness-induced cardiomyocyte maturation. *Scientific reports*. 2014;4:6425. doi: 10.1038/srep06425. PubMed PMID: 25236849; PubMed Central PMCID: PMC4168277.
320. Li Z, Guo X, Palmer AF, Das H, Guan J. High-efficiency matrix modulus-induced cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells inside a thermosensitive hydrogel. *Acta biomaterialia*. 2012;8(10):3586-95. doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.024. PubMed PMID: 22729021.
321. Ehler E, Moore-Morris T, Lange S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013;(79). doi: 10.3791/50154. PubMed PMID: 24056408; PubMed Central PMCID: PMC3857885.
322. Elliott K, Ge K, Du W, Prendergast GC. The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene*. 2000;19(41):4669-84. doi: 10.1038/sj.onc.1203681. PubMed PMID: 11032017.
323. Fu Y, Shaw SA, Naami R, Vuong CL, Basheer WA, Guo X, et al. Isoproterenol Promotes Rapid Ryanodine Receptor Movement to Bridging Integrator 1 (BIN1)-Organized Dyads. *Circulation*. 2016;133(4):388-97. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018535. PubMed PMID: 26733606; PubMed Central PMCID: PMC4729615.
324. Neve KA, Molinoff PB. Turnover of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors after down-regulation or irreversible blockade. *Mol Pharmacol*. 1986;30(2):104-11. PubMed PMID: 3016496.
325. Volovyk ZM, Wolf MJ, Prasad SV, Rockman HA. Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(14):9773-80. doi: 10.1074/jbc.M511435200. PubMed PMID: 16461348.
326. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142(3):375-86. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.002. PubMed PMID: 20691899; PubMed Central PMCID: PMC2919844.
327. Nam YJ, Lubczyk C, Bhakta M, Zang T, Fernandez-Perez A, McAnally J, et al. Induction of diverse cardiac cell types by reprogramming fibroblasts with cardiac transcription factors. *Development*. 2014;141(22):4267-78. doi: 10.1242/dev.114025. PubMed PMID: 25344074; PubMed Central PMCID: PMC4302916.
328. Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, Marban E, Cingolani E. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. *Science translational medicine*. 2014;6(245):245ra94. doi: 10.1126/scitranslmed.3008681. PubMed PMID: 25031269.

Curriculum vitae



Jonathan Béland

PhD. M.Sc., B.Sc.

EXPÉRIENCE

**Institut de Cardiologie
de Montréal**
2008 - 2015

Laboratoire Dr. Philippe Comtois (2010-2015)
Physiologie, modélisation et instrumentalisation cardiovasculaire
Culture cellulaire (maintien de lignées, cellules primaires et souches)
Gestion du laboratoire (commandes, stagiaires, projets)
Écriture d'articles scientifiques et demandes de subvention

Laboratoire Dr. Pierre Thérioux (2008-2010)
Protéomique - biomarqueurs dans la maladie coronarienne
Biochimie & biologie moléculaire - RCPG (coagulation)
Création de formulaires - gestion des dossiers cliniques de recherche

Université de Montréal
Mars à août 2008

Laboratoire Dr. Denis Deblois
Pharmacologie & radioactivité - hyperplasie cardiovasculaire

CURSUS ACADÉMIQUE

- 2015** | Doctorat en Physiologie | Institut de Cardiologie de Montréal, Mtl, Qc.
- 2010** | Maîtrise en Sciences Biomédicales | Institut de Cardiologie de Montréal, Mtl, Qc.
- 2008** | Baccalauréat en Sciences Biomédicales | Université de Montréal, Mtl. Qc.
- 2004** | DEC en Sciences Pures | Collège Ahuntsic, Mtl. Qc.
- 2001** | DES-Plus | Polyvalente des Monts, Ste-Agathe-des-Monts, Qc.

BÉNÉVOLAT ET ACTIVITÉS CONNEXES

Institut de Cardiologie de Montréal :

- Responsable étudiant – communications à l'interne entre les étudiants (2011-2014)
- Responsable étudiant du programme de séminaires (2011-2014)
- Membre du comité de la Journée de la recherche (2011-2013)
- Membre du comité CENTRAIDE (2011)

Autres :

- Bénévolat Fondation Charles-Bruneau (2005-2012)
- Athlète de niveau international en patinage artistique en couple (2001-2008)