

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**L'implication des tubules T dans la repolarisation
ventriculaire chez la souris**

par

Frédéric Mercier

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Août 2007

© Frédéric Mercier, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'implication des tubules T dans la repolarisation ventriculaire chez la souris

présenté par :
Frédéric Mercier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Servant, président-rapporteur
Céline Fiset, directrice de recherche
Éric Rousseau, membre du jury

Résumé

Les myocytes ventriculaires de souris adultes possèdent un réseau de tubules T particulièrement développé et complexe qui permet une propagation rapide de l'excitation électrique à l'intérieur de la cellule. D'autre part, les canaux K^+ cardiaques, qui jouent un rôle majeur dans la modulation de la durée du potentiel d'action et le couplage excitation-contraction, pourraient y être largement localisés. De plus, la contribution relative des courants K^+ et l'architecture des tubules T sont modifiés au cours du développement ainsi que dans diverses conditions pathologiques, suggérant une association entre les canaux K^+ et les tubules T. Les objectifs de la présente étude étaient de déterminer si les canaux potassiques fonctionnels sont préférentiellement localisés dans les tubules T des myocytes ventriculaires de souris adultes et de vérifier si l'augmentation générale de l'expression des canaux potassiques durant le développement est liée à l'apparition des tubules T dans les myocytes ventriculaires de souris. Les techniques de patch-clamp, d'immunofluorescence et de microscopie confocale ont été utilisées conjointement afin d'étudier les conséquences de la localisation des canaux potassiques dans les tubules T des myocytes ventriculaires de souris adultes. L'utilisation du double marquage, avec la wheat germ agglutinin (WGA, marqueur de la membrane plasmiques et des tubules T) et des anticorps spécifiques pour certains canaux K^+ (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3 et Kir2.1), a montré que les canaux K^+ fonctionnels étaient localisés dans les membranes du système tubulaire transverse. D'autre part, des études électrophysiologiques ont été réalisées avec le formamide, un agent qui rompt le réseau de tubules T de la membrane périphérique, en produisant un choc osmotique. Les courants enregistrés sont diminués après un traitement au formamide, suggérant aussi que les canaux K^+ fonctionnels sont localisés avec une grande densité dans les tubules T. La localisation des différents canaux K^+ , dans les ventricules de souris nouveau-nées, a ensuite été déterminée. Les résultats montrent qu'il n'y a pas co-localisation entre les canaux K^+ et les tubules T chez les cellules de souris nouveau-nées, dans lesquels des courants K^+ de faibles amplitudes sont mesurés. Des évaluations des

tubules T ont été réalisées dans certains modèles d'insuffisance cardiaque, soit le modèle de surexpression du récepteur adrénergique α_{1B} et l'infarctus par ligature de coronaire. Aucun changement au niveau des tubules T n'a été remarqué dans ces modèles.

Mots-clés : tubules T, repolarisation, canaux potassiques, myocytes ventriculaires, souris

Abstract

Adult mouse ventricular myocytes display a well-developed T-tubular system that facilitates a rapid propagation of electrical excitation into the cell interior. Cardiac K^+ channels, which play a major role in modulation of action potential duration and excitation-contraction coupling, could be localized in these structures. K^+ currents and T-tubules architecture are modified during development as well as under certain pathological conditions, which suggest potential association between T-tubules membrane system and K^+ channels locations. The main objectives of our study were to determine if functional K^+ channels were preferentially localized in T-tubules of adult mouse ventricular myocytes and to verify if overall augmentation of K^+ channels expression during development is link to T-tubules formation in mouse ventricular myocytes. Patch clamp, immunofluorescence and confocal microscopy were used to study consequences of T-tubules localization for K^+ channels in adult mouse ventricular myocytes. Double labeling with wheat germ agglutinin (WGA, plasma membrane and t-tubules marker) and specific antibodies for K^+ channels (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3 and Kir2.1) showed that functional K^+ channels were localized in T-tubules. Electrophysiological studies performed in the presence of formamide, a substance which disrupt the link between plasma membrane and T-tubules by an osmotic shock, showed smaller K^+ currents suggesting that functional K^+ channels are localized in T-tubules. Moreover, localization of different K^+ channels, in newborn mouse ventricle, has also been determined. Results showed that there is no co-localization between K^+ channels and T-tubules in newborn mouse ventricle myocyte, in which small K^+ currents were recorded. Evaluation of T-tubules was performed in two left anterior heart failure models, adrenergic receptor α_{1B} overexpression and infarction by coronary ligation. No diminution of T-tubules or modification of the T-tubular architecture was observed.

Keywords : t-tubules, cardiac repolarization, potassium channel, ventricular myocyte, mouse

Table des matières

Remerciements.....	xii
1 Introduction.....	1
1.1 La repolarisation cardiaque.....	1
1.1.1 Repolarisation cardiaque et activité électrique.....	1
1.1.2 Repolarisation cardiaque et couplage excitation-contraction.....	4
1.2 Les tubules T.....	6
1.2.1 Description des tubules T.....	6
1.2.2 Rôles physiologiques des tubules T.....	8
1.2.3 Les structures présentes au niveau des tubules T.....	12
1.2.4 Le marquage des tubules T.....	14
1.2.5 La détubulation.....	15
1.3 La souris comme modèle.....	17
1.3.1 La repolarisation chez la souris.....	17
1.3.2 Les tubules T chez la souris.....	21
1.4 Hypothèse et objectifs.....	21
2 Matériel et Méthodes.....	24
2.1 Isolation de myocytes ventriculaires.....	24
2.2 Microscopie confocale.....	24
2.3 La détubulation au formamide.....	26
2.4 Induction d'infarctus par ligature de coronaire.....	26
3 Résultats.....	28
3.1 Validation des méthodes utilisées.....	28
3.1.1 Vérification de la spécificité des anticorps contre les canaux potassiques..	28
3.1.2 Déconvolution des images de microscopie confocale.....	28
3.1.3 Comparaison des marqueurs de tubules T.....	31
3.2 Les effets de la détubulation.....	31
3.2.1 Au niveau de l'imagerie.....	31

3.2.2	Au niveau de l'électrophysiologie	34
3.3	Co-localisation des canaux potassiques et des tubules T au niveau des myocytes ventriculaires de souris adultes	34
3.3.1	Les canaux potassiques fonctionnels chez la souris adulte.....	34
3.3.2	Les canaux potassiques non-fonctionnels chez la souris adulte.....	37
3.4	Le développement chez la souris au niveau des myocytes ventriculaires	44
3.4.1	Évolution des courants potassiques et du potentiel d'action au niveau ventriculaire.....	44
3.4.2	La co-localisation pendant le développement postnatal au niveau ventriculaire chez la souris.....	46
3.5	Les modèles pathologiques chez la souris	48
3.5.1	Le modèle de souris transgénique surexprimant le récepteur adrénergique α_{1B}	48
3.5.2	Le modèle infarctus par ligature de l'interventriculaire antérieure.....	51
3.6	Autres réalisations pendant ma maîtrise	51
4	Discussion et conclusion	53
4.1	Résumé des résultats	53
4.2	Les canaux fonctionnels et les tubules T au niveau des ventricules de souris adultes	54
4.3	Les tubules T et le développement post-natal au niveau du ventricule de souris	56
4.4	Les tubules T dans les modèles pathologiques chez la souris.....	58
4.5	Perspectives futures.....	60
4.6	Conclusion	61
5	Bibliographie.....	63

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Les dilutions pour les anticorps des canaux potassiques fonctionnels.....25

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation schématique d'un potentiel d'action au niveau d'un myocyte cardiaque.....	2
Figure 1.2 : Exemple d'un tracé d'électrocardiogramme normal.....	3
Figure 1.3 : Représentation schématique des différents canaux et échangeurs présents chez le myocyte cardiaque.....	6
Figure 1.4 : Représentation de la localisation des tubules T et du réticulum sarcoplasmique dans le myocyte cardiaque.....	8
Figure 1.5 : Comparaison des courants K^+ entre les cellules ventriculaires et auriculaires de souris adultes.....	18
Figure 3.1 : La spécificité des anticorps contre les canaux potassiques.....	29
Figure 3.2 : Comparaison des images avant et après la déconvolution.....	30
Figure 3.3 : Comparaison de deux marqueurs de tubules T dans les myocytes de souris nouveau-nées et adultes.....	32
Figure 3.4 : Détubulation au formamide.....	33
Figure 3.5 : Effet de la détubulation sur les courants potassiques.....	35
Figure 3.6 : Marquage du canal Kv1.5 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	36
Figure 3.7 : Marquage du canal Kv2.1 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	38
Figure 3.8 : Marquage du canal Kv4.2 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	39
Figure 3.9 : Marquage du canal Kv4.3 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	40
Figure 3.10 : Marquage du canal Kir2.1 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	41
Figure 3.11 : Marquage du canal KvLQT1 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	42

Figure 3.12 : Marquage de minK et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.....	43
Figure 3.13 : Changements du décours des potentiels d'action en fonction du développement postnatal dans les myocytes ventriculaires de souris.....	45
Figure 3.14 : Marquage immunofluorescent des canaux K ⁺ fonctionnels et au WGA dans les myocytes ventriculaires de souris nouveau-nées.....	47
Figure 3.15 : Phénotype pathologique cardiaque des souris $\alpha 1b$ -AR.....	49
Figure 3.16 : Comparaison de I _{peak} au niveau des myocytes ventriculaires de souris contrôles et de souris transgénique surexprimant les récepteurs adrénergique $\alpha 1B$	50
Figure 3.17 : Comparaison des tubules T entre les myocytes ventriculaires de souris ayant subi un infarctus et les contrôles.....	52

Liste de abréviations

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : capacité de transformer l'ATP en ADP

CICR : calcium induced calcium release

Dabco : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane

ECG : électrocardiogramme

I_{K1} : courant à rectification entrante (inward rectifier)

I_{Kur} : ultra rapid delayed rectifier

I_{peak} : courants potassiques totaux

I_{ss} : courant à l'équilibre (steady-state K^+ current)

I_{to} : courant sortant transitoire indépendant du Ca^{2+} (Ca^{2+} -independant transient outward K^+ current)

I_{Kr} : composante rapide du courant K^+ à rectification retardée

I_{Ks} : composante lente du courant K^+ à rectification retardée

NCX : échangeur sodium calcium

SERCA : pompe à calcium du sarco-endo-reticulum

WGA : « wheat germ agglutinin »

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Céline Fiset pour toute la passion qu'elle a su me transmettre et son support constant qui m'a permis de développer mes qualités en recherche. Un merci spécial aux membres du jury qui ont trouvé du temps pour me soumettre des commentaires très pertinents pendant la rédaction de leur demande de bourse.

Un merci spécial à mes collègues de travail : Katy Rivard, Marie-Andrée Lupien, Gracia JBeayly et Chantale Saint-Michel, qui ont assuré le succès de ce projet grâce à leurs idées et à leur travail acharné. Particulièrement à Louis Villeneuve qui m'a enseigné tous les secrets du microscope.

Merci également à ma famille, à ma copine et à mes amis pour avoir cru en moi et pour m'avoir sans cesse encourager à me dépasser.

Finalement, je tiens à remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour avoir subventionné le projet et le Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) pour les bourses qui m'ont été octroyées.

1 Introduction

1.1 La repolarisation cardiaque

1.1.1 Repolarisation cardiaque et activité électrique

Il existe plusieurs courants au niveau des cellules cardiaques tel les courants sodiques, calciques et potassiques. Ils déterminent tous différentes phases du potentiel d'action. La phase 0, représentant la dépolarisation rapide, est due aux canaux sodiques. La phase 1 de repolarisation transitoire est provoquée par des canaux potassiques. La phase 2 de plateau est déterminée par les canaux calciques. Tandis que la phase 3, la repolarisation, est déterminée par l'activation des canaux potassiques et l'augmentation de la conductance du potassium macroscopique. Finalement la phase 4, qui est le maintien du potentiel de repos, dépend également des canaux potassiques mais aussi des pompes et échangeurs d'ions (voir figure 1.1, page 2). Il est connu depuis longtemps que la phase de repolarisation est régulée par les courants K^+ . Ces courants potassiques sont en fait des courants sortants de K^+ , qui facilitent le retour du potentiel membranaire vers son niveau basal.³ Après la phase de repolarisation, il y a obligatoirement une période durant laquelle les cellules ne peuvent être réactivées. Cette période est appelée période réfractaire. Cette période correspond au temps pendant lequel tous les canaux sodiques sont dans un état inactivé, définissant ainsi la période réfractaire absolue. Elle peut aussi correspondre au temps pour lequel il n'y a pas assez de canaux sodiques dans un état permettant leur réouverture, empêchant ainsi leur réactivation malgré l'atteinte du seuil de dépolarisation. Ceci correspond à la période réfractaire relative. La durée de ces périodes est aussi dépendante de la longueur du potentiel d'action qui est déterminée par les courants potassiques. Les périodes réfractaires sont très importantes au niveau cardiaque puisqu'elles permettent aux différents courants des myocytes de sortir de leur période d'inactivation et d'être prêt pour le prochain potentiel d'action. Les ventricules profitent aussi de cette pause pour se relaxer et se remplir de sang avant la contraction suivante.⁴ La

phase de repolarisation ventriculaire est représentée par la mesure de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme (ECG).

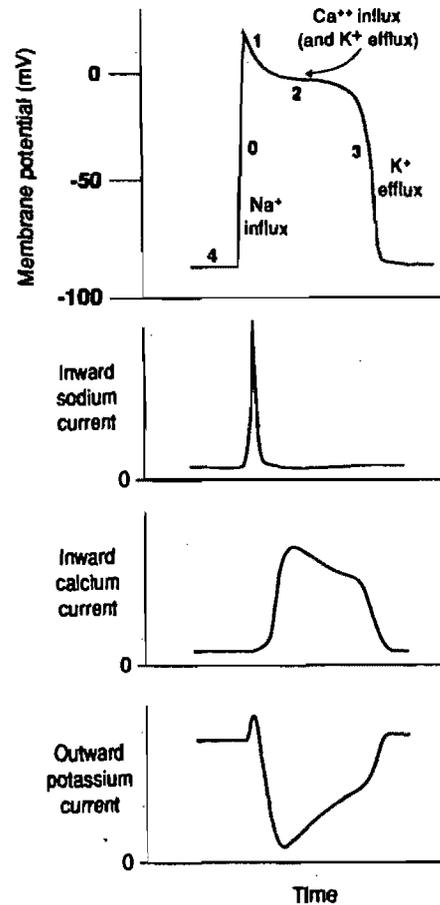
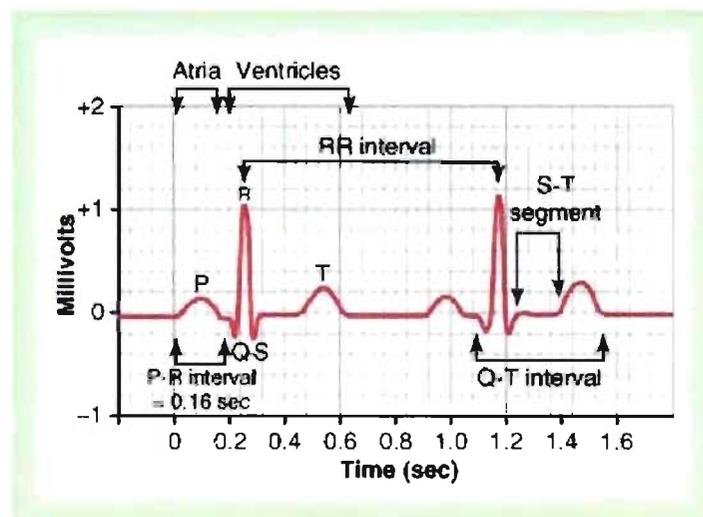


Figure 1.1 Représentation schématique d'un potentiel d'action au niveau d'un myocyte cardiaque (tiré de Elsevier. Goldberger :Clinical electrocardiography 7^e edition)

Cette période s'étend donc du début du complexe QRS jusqu'à la fin de l'onde T. Puisque l'intervalle QT est modifié par le rythme cardiaque, la valeur utilisée est l'intervalle QT corrigé (QTc), qui correspond à l'intervalle QT divisé par la racine carrée du RR chez l'humain.⁵ Le RR est en fait la durée en millisecondes d'un cycle cardiaque complet (voir figure 1.2, page 3) c'est-à-dire d'une onde R à une autre onde R.⁶ Le cycle cardiaque

représente les événements électriques et mécaniques résultant en une contraction auriculaire et ventriculaire coordonnée afin de produire la propulsion efficace de sang dans les circulations pulmonaire et systémique.⁴ Une régulation très précise de la période de repolarisation est importante. Une modification des courants potassiques, qui déterminent la phase de repolarisation, entraîne un changement dans la durée des potentiels d'action des cellules. Une augmentation des courants potassiques entraîne un raccourcissement des potentiels d'action et a contrario leur diminution provoque l'allongement de ceux-ci. Au niveau de l'ECG, la phase de repolarisation est représentée par l'intervalle QT. Or, il est maintenant prouvé que la prolongation excessive de la phase de repolarisation (allongement du QT) entraîne le déclenchement d'arythmies ventriculaires malignes tel les torsades de pointes et peuvent mener à la mort subite.⁷ Les torsades de pointes sont un type de tachycardies ventriculaires polymorphiques présentant un rythme irrégulier et une forme particulière de complexes QRS qui semblent augmenter d'amplitude pour ensuite diminuer d'amplitude ainsi de suite. Cette forme d'arythmie doit obligatoirement être accompagnée d'un allongement de l'intervalle QT.⁸ Des changements au niveau des périodes réfractaires facilitent la création de circuits de réentrées provoquant ainsi ces arythmies ventriculaires potentiellement mortelles.



© Elsevier. Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology 11e - www.studentconsult.com

Figure 1.2 : Exemple d'un tracé d'électrocardiogramme normal

1.1.2 Repolarisation cardiaque et couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction est un des concepts les plus importants en physiologie cardiaque, puisqu'il fait le lien entre l'activité électrique de la membrane de la cellule et la contraction des myofilaments de cellules ventriculaires qui mène à l'éjection de sang. Le couplage excitation-contraction représente le mécanisme par lequel le potentiel d'action entraîne la contraction de la cellule musculaire cardiaque. Au cours de la phase 2 du potentiel d'action (la phase plateau), il y a une entrée de calcium à l'intérieur de la cellule via les canaux calciques de type L, au niveau du sarcolemme et des tubules T. Cette quantité de calcium n'est pas suffisante pour entraîner la contraction musculaire, mais elle provoque une libération de calcium beaucoup plus importante du réticulum sarcoplasmique en agissant via les récepteurs à la ryanodine. Cette libération de calcium est communément appelée le «calcium-induced calcium release» (CICR).⁹ Lorsque le calcium est en quantité suffisante, il se lie à la sous-unité C de la troponine, ce qui inactive la sous-unité I (inhibitrice de l'activité ATPasique). Il se produit ensuite un changement de conformation de la tropomyosine, ce qui libère le site de liaison de la myosine sur le filament d'actine. Lorsque les sites sont libres, la contraction peut avoir lieu. Les têtes de myosine s'activent par l'action de l'adénosine triphosphate (ATP), elles lient ensuite leur site sur l'actine. Lorsque les têtes de myosine lient l'actine, il y a un changement de conformation qui provoque la flexion de la tête de myosine amenant ainsi le filament d'actine vers l'intérieur. Après la flexion de la tête de myosine, une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) est relâchée, et s'il y a suffisamment d'ATP, une molécule d'ATP vient se lier à la place de l'ADP entraînant la dissociation entre la tête de myosine et le filament d'actine. Le cycle peut donc se reproduire tant qu'il y a du calcium et de l'ATP. À force de se coupler et découpler les filaments d'actine et de myosine causent un raccourcissement de la cellule musculaire, en augmentant le chevauchement des filaments dans chaque sarcomère. Il y a une pompe au calcium dans la cellule musculaire cardiaque, situé sur la membrane du

réticulum sarcoplasmique, qui est constitutivement active: la «sarco(endo)plasmic réticulum calcium pump» (SERCA). Cette pompe retourne le calcium du cytosol dans le réticulum sarcoplasmique afin de rétablir les concentrations calciques basales. Lorsque la phase 2 arrive à sa fin, les canaux calciques se ferment. Comme il n'y a plus d'entrée de calcium, la SERCA arrive à ramener les niveaux calciques élevés à des niveaux de pré-contraction. À ce moment il n'y a plus assez de calcium pour lier les troponines C et ainsi empêcher l'activité de la troponine I. L'échangeur sodium-calcium (NCX) contribue aussi à l'extrusion du calcium vers l'extérieur de la cellule (voir figure 1.3, page 6).⁴ Cette activité cruciale de la cellule cardiaque est influencée par la repolarisation cardiaque. Comme mentionné dans la section 1.1.1, la cinétique de la phase de repolarisation influence la durée du potentiel d'action. Clark RB *et al* ont rapporté que la durée du potentiel d'action modifie l'influx calcique.¹⁰ Puisque la contraction cellulaire est dépendante de l'influx calcique et que la durée de celui-ci dépend de l'intensité des courants potassiques et de la vitesse à laquelle la cellule revient à son potentiel membranaire basal, il est évident que les courants de repolarisation sont des déterminants importants du couplage excitation-contraction. S'ils sont plus faibles la période de temps nécessaire pour retourner au potentiel de repos s'allonge, permettant ainsi à la cellule de rester plus longtemps à un potentiel dépolarisé où l'entrée de calcium est possible. Ce qui provoque un allongement du potentiel d'action par augmentation de la phase plateau et une contraction plus forte par une charge de calcium plus importante. Mais le contraire est aussi possible lorsque les courants de repolarisation sont de grande conductance. C'est-à-dire qu'ils diminuent le temps nécessaire à un retour au potentiel de repos, provoquant ainsi une diminution du temps d'ouverture des canaux calciques qui s'ouvrent seulement au cours de la phase plateau. Cela entraîne une diminution du potentiel d'action par le raccourcissement de la phase plateau et une faible contraction par un influx calcique de moindre amplitude.

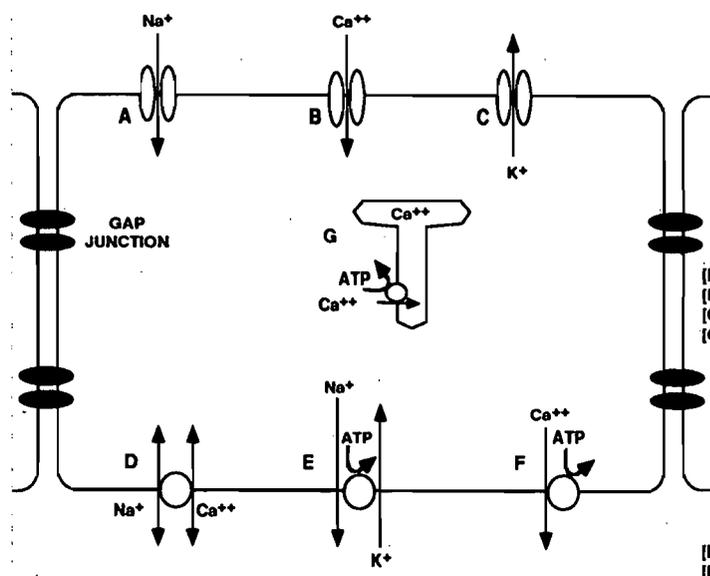


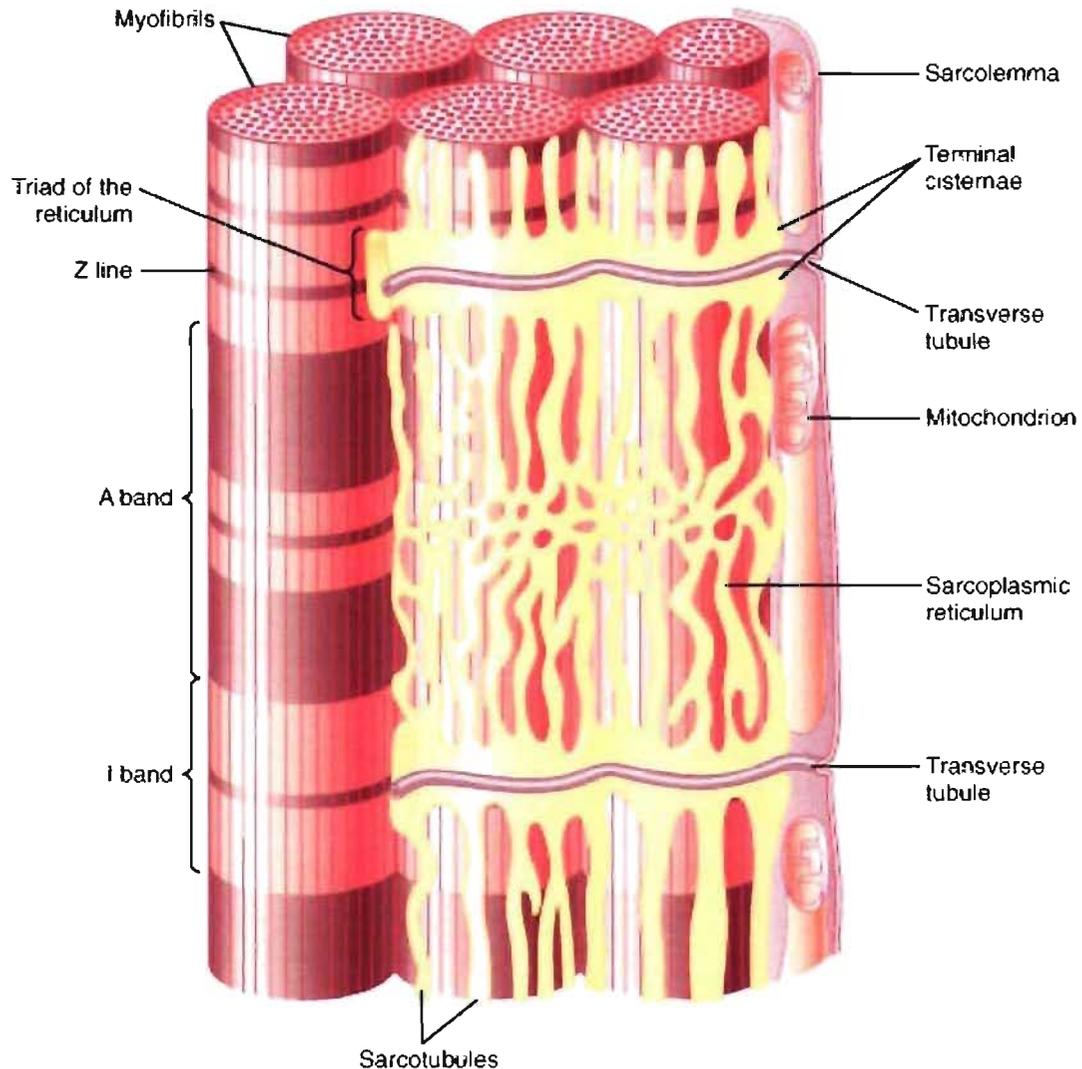
Figure 1.3 Représentation schématique des différents canaux et échangeurs présents chez le myocyte cardiaque (D représente le NCX) tiré de Elsevier. Goldberger :Clinical electrocardiography 7^e édition

1.2 Les tubules T

1.2.1 Description des tubules T

Les tubules T ou système tubulaire transverse sont des invaginations du sarcolemme recouvert d'un glycocalyx. Le glycocalyx reste associé au sarcolemme au niveau des tubules T. Ils sont localisés, de façon adjacente, à la jonction entre le sarcolemme et la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique¹¹. Les tubules T sont présents seulement dans les cellules cardiaques et les cellules musculaires squelettiques puisque ces structures membranaires spécialisées ont pour fonction de coordonner l'influx calcique afin d'obtenir une contraction plus efficace.¹² Les différences entre les espèces sont plus marquées au niveau cardiaque, puisque de grandes différences existent entre les rythmes cardiaques de repos des espèces. Il n'y a pas de tubules T dans le myocarde des reptiles et des

amphibiens¹³ ainsi que dans celui des oiseaux¹⁴. Par contre, chez tous les mammifères étudiés jusqu'à présent (souris¹⁵, rat¹⁶, lapin¹⁷, cobaye¹⁸, chien¹⁹ et humain¹⁵), un réseau de tubules T est en place dans le ventricule avec des différences de complexité et d'importance de structure selon l'espèce et le développement postnatal.²⁰ Au niveau cardiaque, les tubules T sont beaucoup plus développés dans les cellules ventriculaires que dans les autres structures telles les cellules auriculaires et les cellules « pacemakers ».²⁰ Dans ces autres structures cardiaques, ils sont pour la plupart absents, excepté dans les oreillettes où environ 50% des cellules posséderaient un système de tubules T irrégulier et éparse.²¹ Les tubules T sont structurellement semblables à la membrane plasmique de la cellule cardiaque ou musculaire (sarcolemme). Ils sont composés d'une bicouche de phospholipides traversée par des protéines. Ce réseau de tubules possède des extensions transverses, comme l'indique son nom, qui sont localisées au niveau de chaque ligne Z, ligne indiquant la jonction entre deux sarcomères. Puisque chaque sarcomère fait environ 2 μm de distance, les tubules T sont situés à des intervalles réguliers d'environ 2 μm sur l'axe longitudinal des cellules musculaires cardiaques. Par contre, malgré le nom de tubules transverses, il existe aussi des extensions longitudinales dans ce système mais seulement pour les cellules cardiaques.²⁰



© Elsevier. Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology 11e - www.studentconsult.com

Figure 1.4 : Représentation de la localisation des tubules T et du réticulum sarcoplasmique dans le myocyte cardiaque

1.2.2 Rôles physiologiques des tubules T

Des expériences, faites il y a une cinquantaine d'années, par Huxley et Taylor ont montré qu'une dépolarisation localisée au niveau des tubules T des muscles squelettiques

de grenouille, entraîne une contraction de la demie du sarcomère adjacent.²² Cela a aussi été tenté sur des cellules de myocarde avec un résultat différent.²⁰ La dépolarisation obtenue n'est pas localisée. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que les tubules T au niveau cardiaque possèdent des extensions longitudinales qui favoriseraient la propagation de l'influx à des régions adjacentes de la cellule.²⁰ Comme les tubules T représentent une « grande » réserve de liquide extracellulaire dans le myocarde, ils contribuent à diminuer les distances de diffusion ainsi que le temps nécessaire au transport de substances, entre l'intérieure et l'extérieure de la cellule.²³ Les substances transportées peuvent être des ions impliqués dans le potentiel d'action. Donc ces invaginations spécialisées de la membrane de surface ont pour fonction de transmettre rapidement le potentiel d'action cardiaque en profondeur de la cellule. Cela entraîne donc une contraction synchrone de toute la cellule.²⁴ Au niveau cardiaque, les tubules T sont spécialisés dans le transport de calcium. En effet, si on le compare au myocyte squelettique, le réticulum sarcoplasmique de la cellule cardiaque est beaucoup moins développé et il n'entrepose pas assez de calcium pour provoquer une contraction complète. Le calcium manquant provient donc des tubules T, qui sont cinq fois plus gros dans les myocytes cardiaques par rapport aux tubules T des myocytes des muscles squelettiques, étant donné que leur contribution est plus importante.¹² Comme mentionné précédemment, les tubules T représentent un compartiment de liquide extracellulaire qui peut permettre l'accumulation d'ions et ainsi influencer l'activité électrique. Par exemple, Clark *et al* ont rapporté que la présence d'un courant potassique lent et essentiellement entrant, exclusivement dans les myocytes ventriculaires de souris, était due à l'accumulation de potassium dans les tubules T. Cette accumulation d'ions potassiques entraîne l'activation de courants potassiques à rectification entrante. Cela se traduit en un courant K^+ à rectification entrante (I_{K1}) qui permet le passage d'ions potassium vers l'intérieure de la cellule lors de la fin de la repolarisation et contribue à la stabilisation du potentiel de repos membranaire.²⁵

Dans la section 1.2.1 description des tubules T, il est mentionné qu'il y a une différence d'expression des tubules T selon la localisation de la cellule. Par exemple, la

distinction la plus frappante est celle entre les oreillettes qui expriment peu de tubules T avec une structure de faible complexité par rapport aux ventricules qui ont un réseau très complexe. Il existe d'autres différences quant à l'expression des tubules T comme la formation de ce réseau pendant le développement. En effet, les cellules ventriculaires isolées de cœurs néonataux ne présentent pas de tubules T tandis que les cellules adultes présentent le même réseau très développé qui est décrit précédemment. Ce qui est très intéressant de constater c'est que dans les cellules ventriculaires le développement des courants calciques suit le développement des tubules T.¹⁷ Cette corrélation laisse présager que les tubules T ont un rôle à jouer dans le couplage excitation-contraction. Au niveau du réticulum sarcoplasmique jonctionnel, les récepteurs à la ryanodine qui sont les principaux médiateurs de la relâche de calcium induite par le calcium (CICR) sont toujours localisés, dans le réticulum sarcoplasmique jonctionnel, de façon adjacente aux canaux calciques de type L, ou récepteur à la dihydropyridine localisés dans la membrane du système tubulaire transverse. Ces canaux permettent de produire l'influx de calcium qui déclenche le CICR.²⁶ C'est pourquoi le complexe formé par les récepteurs à la ryanodine et les canaux calciques de type L est nommé la dyade. Cette proximité dans l'espace permet une augmentation locale plus rapide du calcium nécessaire à l'ouverture des canaux à la ryanodine qui amplifie les variations de calcium intracellulaire libre. Ceci facilite la relâche du calcium provenant du réticulum sarcoplasmique, principale source de calcium pour la contraction cellulaire.²⁷ Les tubules T sont donc le lieu de prédilection du CICR, un déterminant majeur du couplage excitation-contraction.²⁸

D'autres situations peuvent affecter le réseau de tubules T. La mise en culture des cellules de myocytes en est un exemple. Le groupe de Christe a maintenu des myocytes ventriculaires de lapin pendant six jours en culture. Ils ont mesurés différents paramètres électrophysiologiques, entre autres, les courants calciques de type L, des courants potassiques comme le courant sortant transitoire indépendant du Ca^{2+} (I_{t0}) et I_{K1} , la capacitance et la densité de tubules T. Il se trouve qu'après seulement 24 heures en culture, la capacitance cellulaire a diminué de 42 %. La capacitance cellulaire est proportionnelle à

la surface membranaire totale incluant les tubules T. Toujours après 24 heures, les courants calciques avaient diminué de 50%, I_{K1} avait diminué de 54%. Cependant I_{to} n'était pas affecté. Tandis qu'après six jours, un rétablissement partiel des courants calciques est observé mais aucun changement n'est mesuré pour I_{K1} . À ce moment, une diminution de I_{to} de 65% était observée ainsi qu'une diminution de la densité des tubules T de 57%. La perte de ces tubules T était surtout située aux extrémités des cellules, le centre semblait avoir conservé un réseau normal.²⁹ Une autre étude a montré que la capacitance après quatre jours de mise en culture avait chuté de 51% et que I_{K1} avait subi une diminution de 83% tandis que le courant potassique sensible à l'ATP ($I_{K,ATP}$) avait diminué de 88%.³⁰

Il semble que des changements au niveau du réseau de tubules T soient observés lors de certaines situations pathologiques, entre autres l'insuffisance cardiaque.¹⁹ L'insuffisance cardiaque est définie comme l'incapacité du cœur à pomper le sang vers la circulation périphérique à un débit suffisant pour subvenir à la demande métabolique du corps ou à l'aptitude de le faire seulement à des pressions de remplissage cardiaque anormalement élevées, ou les deux.⁴ Dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie chez le chien, He *et al.* ont montré que la densité du réseau de tubules T diminuait approximativement de 24%.¹⁹ Kostin *et al.* avaient déjà démontrés que dans les cellules humaines, il y avait une perte de la densité de tubules T mais que ceux qui étaient encore présents étaient dilatés.³¹ Dans une autre pathologie cardiaque très commune, l'infarctus du myocarde, des changements au niveau des tubules T ont été rapportés. L'infarctus du myocarde est la nécrose myocardique régionale habituellement due à une cessation de l'irrigation sanguine prolongée. Le plus souvent, cela résulte d'un thrombus à un site d'athérosclérose coronarienne.⁴ Des infarctus du myocarde ont été provoqués chez la souris en faisant la ligature de l'artère coronaire gauche.³² Lorsque les cellules ont été isolées après une semaine et trois semaines post-infarctus, les changements suivants ont été observés. Une semaine après un infarctus, le système de tubules T est désorganisé, comme l'indique la perte du marquage habituel en stries horizontales et verticales typique du système tubulaires transverse. La désorganisation est encore plus visible trois semaines

après l'infarctus, alors qu'il n'y a plus d'évidence du marquage en strie.³² Malgré les résultats de ces études, il n'y a encore aucune certitude quant à la modification des tubules T en conditions pathologiques. En effet, bien que des changements aient été observés dans les études mentionnées précédemment, d'autres études préliminaires faites sur des cellules de ventricules humains souffrant d'insuffisance cardiaque n'ont rapporté aucun changement dans la densité de tubules T.²⁰ Évidemment, le problème réside dans la difficulté de savoir d'où viennent les cellules observées (centre, périphérie ou extérieure de la zone infarctée).

1.2.3 Les structures présentes au niveau des tubules T

Comme les tubules T sont très importants au niveau des échanges ioniques et de la glycolyse de la cellule et surtout pour le couplage excitation-contraction, voir section précédente 1.2.2, il est logique de penser que les structures impliquées dans ces fonctions doivent être localisées au niveau de cette structure membranaire. Pour les protéines reliées au transport du calcium, des études ont démontré que la densité des canaux calciques de type L étaient plus élevée au niveau des tubules T que dans la membrane plasmique. Le niveau de cette concentration est variable d'une étude à l'autre, des augmentations de densité de trois à neuf fois ont été rapportées.^{28,33} Évidemment il existe de la variabilité entre les espèces par rapport à cette augmentation de la densité dans le système de tubules T. Les résultats montrent que la concentration des protéines au niveau du ventricule de rat serait, entre autres, plus importante que chez le lapin.³⁴ Des études ont déterminé que le couplage excitation-contraction fonctionnel nécessite la localisation des canaux calciques de type L et des récepteurs à la ryanodine à une très faible distance l'un de l'autre (200nm).²⁶ Donc, une concentration des canaux calciques de type L plus importante dans les tubules T qu'au niveau de la membrane plasmique suggère le même phénomène en regard des récepteurs à la ryanodine. Malgré qu'il ne soit pas la principale source de calcium pour amorcer le CICR, l'échangeur sodium-calcium (NCX) serait également localisé dans les tubules T. Aucune différence de densité du NCX dans les tubules T par rapport à la membrane plasmique n'a cependant été documentée pour le NCX. Mais le fait qu'il ne soit pas

localisé de façon adjacente aux récepteurs à la ryanodine, donc probablement pas concentré au niveau des tubules T, limite son impact dans des conditions physiologiques normales.²⁸ Par contre, dans certaines conditions pathologiques qui causent des concentrations de calcium intracellulaire libre plus élevées son importance relative pourrait être augmentée puisque que dans ces conditions une diminution du courant calcique provenant des canaux calciques de type L est observée.²⁶ L'augmentation du contenu de calcium dans le réticulum sarcoplasmique qui est rapporté va aussi contribuer à l'augmentation de l'importance du NCX car elle diminue l'amplitude de l'influx de calcium nécessaire au déclenchement du CICR. Finalement une augmentation du sodium intracellulaire, dû à l'extrusion plus importante de calcium par le NCX au repos, va promouvoir l'entrée de calcium lors du potentiel d'action de ces myocytes en conditions pathologiques.

Pour les protéines transportant le sodium, les résultats montrent aussi des différences de concentrations entre la membrane plasmique et les tubules T, en faveur de ces derniers. L'échangeur $\text{Na}^+\text{-H}^+$, qui régule le pH intracellulaire en permettant l'évacuation d'ions H^+ , est concentré au niveau des disques intercalaires et des tubules T.³⁵ Cela pourrait avoir un impact sur le maintien du pH dans les tubules T. Tandis que la pompe sodium-potassium ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) est distribuée différemment selon l'isoforme étudié malgré que les deux isoformes aient le même rôle. L'isoforme α_1 est concentré dans les tubules tandis que l'isoforme α_2 a une distribution semblable entre les tubules T et la membrane plasmique. Ces études de localisation ont été réalisées sur des cellules ventriculaires de rat.³⁶ Cela pourrait indiquer que les tubules T représentent un endroit de la cellule où la régulation du sodium est différente de celle de la membrane cellulaire.²⁰ Pour les canaux sodiques voltage dépendant, les résultats sont les mêmes que pour le NCX, c'est-à-dire qu'une localisation tubulaire a été retrouvée, mais qu'il n'y a pas d'étude sur les différences de densité entre le sarcolemme et les tubules T.²⁸

Takeuchi *et al.* ont démontré que Kv4.2, un des canaux à l'origine du courant I_{to} , est localisé de façon prédominante dans les tubules T des myocytes ventriculaires de rat.²³ Les mêmes résultats ont été obtenus pour le canal TASK-1 qui lui code pour le courant I_{ss} , chez le rat.³⁷ Quant à la protéine Kir2.1, principal déterminant du courant I_{K1} , elle a aussi été retrouvée de façon majoritaire dans les tubules T par Clark *et al.* au niveau des myocytes ventriculaires de souris.²⁵ Jusqu'à maintenant, il y a peu de connaissance accumulée au sujet de la distribution et la localisation asymétrique des canaux potassiques. Pourtant les canaux K^+ sont les canaux les plus nombreux et diversifiés au niveau cardiaque. Par contre, il y a une grande homologie entre tous ces canaux. Cette homologie cause problème pour l'obtention d'un marquage spécifique permettant d'obtenir une résolution assez grande afin d'assurer que la protéine soit située dans une structure d'environ 250 nm.

Outre l'échangeur Na^+-H^+ , une autre structure de régulation du pH est également présente au niveau des tubules T. Il s'agit de l'échangeur $Cl^-HCO_3^-$.³⁸ Puisque les tubules T contiennent beaucoup de protéines nécessaires au fonctionnement normal de la cellule, le pH doit être régulé de façon stricte.²⁰ Tout changement rapide du pH qui ne peut être compensé entraîne des conséquences au niveau des échanges ioniques. De tels changements de pH (0.1 à 0.2 unité de pH) peuvent interférer avec le CICR et les fonctions normales de la cellule et même l'empêcher de fonctionner pour maintenir son intégrité.

1.2.4 Le marquage des tubules T

Puisque les tubules T sont formés des mêmes substances que la membrane plasmique il est difficile voire impossible d'obtenir des marqueurs liant les tubules T sans lier la membrane plasmique. Deux types de marqueurs ont été choisis pour réaliser nos expériences. Premièrement le Di-8-ANEPPS qui provient de la famille des Amino-Naphthyl-Ethenyl-Pyridinium. Ce sont des substances qui lient des composantes de la membrane et dont les caractéristiques optiques vont varier selon le potentiel membranaire.³⁹ C'est pourquoi ils sont appelés marqueurs potentiométriques. D'autres groupes de

recherche les ont déjà utilisés comme marqueurs de tubules T.^{40, 41} L'autre marqueur choisi est la wheat-germ agglutinin ou WGA. La WGA se lie avec les résidus d'acide sialique qui se retrouve dans les glycoprotéines formant le glycocalyx.⁴² La WGA a aussi déjà été utilisé comme marqueur de tubules T par d'autres groupes de recherche tel Takeuchi *et al.* et Sedarat *et al.*^{23, 27}

1.2.5 La détubulation

Pour déterminer le rôle des tubules T, il est intéressant d'étudier des cellules dont le réseau de tubules T a été détruit ou des cellules ne possédant pas de tubules T afin de les comparer à des cellules qui en possèdent. Une des grandes limites de ces études est le manque de similarités entre les deux types cellulaires. Il faut comparer des cellules de myocytes ventriculaires avec des cellules de Purkinje. Ces cellules n'ont pas la même densité de courants et ne partagent pas les mêmes propriétés électrophysiologiques. Une façon de palier à ces limites de différences entre les types cellulaires est de prendre le même type cellulaire et de lui enlever son réseau de tubules T. Dans cette optique, il y a au moins deux choix. Le premier est de mettre les myocytes ventriculaires en culture puisque comme mentionné précédemment après six jours de culture la densité du système de tubules T aura diminué de 57% surtout au niveau des extrémités de la cellule.²⁹ La deuxième possibilité est de provoquer la détubulation à l'aide d'un choc osmotique. La technique de choc osmotique des myocytes ventriculaires cardiaques est dérivée de la technique au gradient de glycérol effectuée sur la cellule de muscle squelettique.⁴³ Cette technique consiste à produire un rétrécissement cellulaire en perfusant un agent osmotique (substance qui augmente l'osmolarité d'un milieu) dans le milieu extracellulaire de la cellule. Ceci provoque un mouvement des molécules d'eau vers l'extérieur de la cellule diminuant ainsi sa taille et ainsi entraîne une diminution de la taille du système de tubule T. Ensuite lorsque la cellule retourne dans un environnement normal, les molécules d'eau reviennent à l'intérieur de la cellule, ce qui lui fait reprendre sa taille normale de façon très rapide. Alors que le réseau de tubules T ne peut pas reprendre sa taille aussi rapidement

que la membrane sarcolemmale de la cellule. Cela provoque le bris des liens entre le système de tubules T et la membrane plasmique. Le système de tubules T qui est resté à l'intérieur de la cellule, fait de nouvelles connections qui l'amène à prendre la forme de vacuole. Le même phénomène est observé dans la détubulation des muscles squelettiques.⁴⁴ Puisque la capacitance cellulaire est une mesure de la surface cellulaire et que la perte de tubules T équivaut à une perte de surface cellulaire. La détubulation se mesure par une chute de la capacitance cellulaire, chez le rat des diminutions de l'ordre de 30% ont été rapportées.³³ Puisque la perfusion de 1.5 M de formamide dans le milieu cellulaire représente un important choc osmotique, il est nécessaire de s'assurer que cette perturbation n'aura pas de répercussion sur l'intégrité de la cellule. Le groupe de Orchard a déjà évalué les conséquences fonctionnelles de la détubulation au formamide.^{33, 44} Ils ont tout d'abord montré que le choc osmotique n'avait aucun effet sur l'intégrité du cytosquelette.⁴⁴ Ensuite, ils ont comparé les courants calciques mesurés dans les myocytes ventriculaires de rats adultes à ceux des myocytes auriculaires de rats adultes. Étant donné qu'il n'y a pas de tubules T dans les myocytes auriculaires de rats, le traitement au formamide ne devrait pas les affecter de la même façon. C'est bien ce qui est observé. La relâche de calcium dans les myocytes ventriculaires de rats adultes traités au formamide suit une cinétique très similaire à celle observée dans les myocytes auriculaires de rats adultes. De plus, le formamide n'a pas d'effet mesurable sur les courants calciques ou bien sur la capacitance cellulaire des myocytes auriculaires de rats. Étant donné qu'aucun changement n'est mesuré dans des myocytes ne possédant pas de tubules T, cela suggère que l'effet du formamide est bien dû à la détubulation et non pas à un effet direct du formamide sur l'intégrité cellulaire ou sur les protéines.⁴⁴

1.3 La souris comme modèle

1.3.1 La repolarisation chez la souris

Étant donné que cette étude évalue l'implication des tubules T dans la repolarisation cardiaque et que la repolarisation cardiaque est due en grande partie aux courants potassiques, il est important de savoir quels courants sont à la base de la repolarisation dans le modèle de cellules étudiées. Puisque les courants potassiques sont les plus diversifiés, une caractérisation des courants produisant la repolarisation au niveau de la cellule ventriculaire de souris est nécessaire. Il est aussi important de bien comprendre les différences entre la repolarisation des cellules de ventricule et d'oreillette, la repolarisation de la cellule adulte et de la cellule de nouveau-né. Les myocytes d'oreillettes de souris adultes, parce qu'elles ne possèdent pas de tubules T, deviennent un point de comparaison intéressant. C'est la même chose pour le myocyte ventriculaire de souris néonatales, qui n'a pas encore de tubules T. Par contre, la caractérisation des courants de ces deux modèles est nécessaire afin d'établir de bonnes comparaisons avec les myocytes ventriculaires de souris adultes. Tout d'abord, la description électrophysiologique de la cellule de ventricule de souris adulte sera faite (voir figure 1.4). Au niveau des courants potassiques sortant, il en existe trois types. Le premier est un courant transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} qui est appelé « transient outward » (I_{to}). Les correspondants moléculaires de ce courant sont Kv4.2 et Kv4.3.^{45, 46} Ensuite il y a le courant à rectification retardé ultrarapide (ultrarapid delayed rectifier ou I_{Kur}) qui est un courant rectifiant retardé s'activant rapidement et s'inactivant lentement. Ce courant dépend du gène Kv1.5.^{47, 48} Finalement, le courant à l'équilibre (steady state ou I_{ss}) correspond à un courant qui s'active relativement lentement et qui ne s'inactive pas, même après des dépolarisations de plusieurs secondes. Kv2.1 est le gène codant pour ce courant.¹ Il y a aussi un courant potassique entrant dans les myocytes ventriculaires de souris adultes, il s'agit de I_{K1} . C'est un courant qualifié de rectifiant entrant dont le rôle est de maintenir le potentiel membranaire de repos aux valeurs normales

mais aussi de participer à la repolarisation terminale grâce à sa partie sortante. Le gène Kir2.1 a été ciblé comme déterminant majeur de ce courant avec une participation possible de Kir2.2.⁴⁹ La sommation de tous ces courants est appelée I_{peak} .

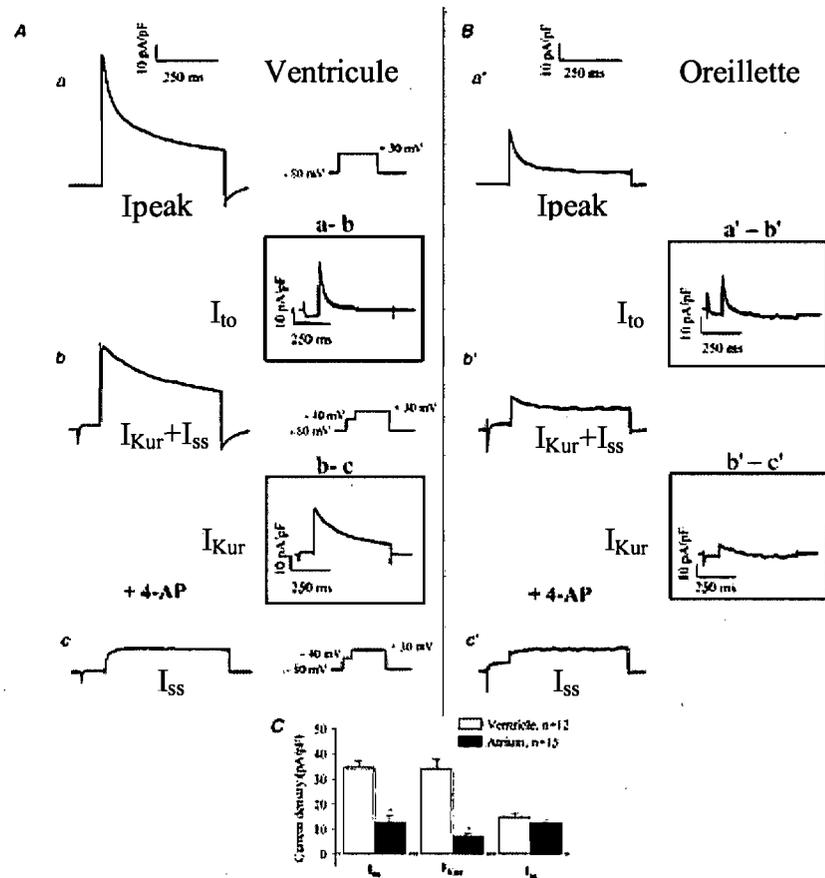


Figure 1.5 Comparaison des courants K^+ entre les cellules ventriculaires et auriculaires de souris adultes.¹

Maintenant que la caractérisation du modèle de base est faite, celle du myocyte auriculaire de souris adulte sera faite afin de procéder à une étude comparative. Certaines

différences sont observées entre les myocytes d'oreillettes et de ventricules de souris adultes. Ces différences ne se situent pas au niveau du profil des courants exprimés, puisque les oreillettes et ventricules de souris adultes expriment les mêmes courants.^{1, 50} Elles se voient plutôt dans l'amplitude et la contribution relative de chaque courant. La plus grande différence notée est dans le transcrite de Kv1.5. Il est exprimé trois fois plus abondamment dans le ventricule que dans l'oreillette. Ces données récoltées dans notre laboratoire, corrént bien avec les courants enregistrés en patch-clamp puisque I_{Kur} , le courant qui dépend de Kv1.5, est de faible amplitude dans l'oreillette, alors que dans le ventricule de souris, il est de grande amplitude et c'est un courant important pour la repolarisation de cette chambre cardiaque.¹ Même si les propriétés électrophysiologiques de I_{to} sont semblables entre l'oreillette et le ventricule, la densité de ce courant est beaucoup plus grande dans ce dernier.^{1, 50} Comme ce courant provient des protéines de Kv4.2 et Kv4.3, des quantifications ont été faites. Ces deux gènes ont été retrouvés en quantité significative autant dans l'oreillette que dans le ventricule. Ce qui n'est pas surprenant puisque les deux chambres expriment I_{to} . Aucune différence n'a été notée quant à la quantité de Kv4.3. Par contre, Kv4.2 était exprimé à des niveaux 80% plus élevés dans le ventricule par rapport à l'oreillette, suggérant que cette différence de densité de courant serait due à Kv4.2. Aucune différence entre les densités de courant de I_{ss} et de son gène correspondant Kv2.1 n'ont été retrouvée entre l'oreillette et le ventricule.¹

Afin de pouvoir faire une comparaison entre le myocyte ventriculaire de souris néonatales et adultes, la repolarisation du myocyte ventriculaire de souris néonatales doit être caractérisée. Comme pour les tubules T, un changement de la repolarisation est observée pendant le développement postnatal des cellules de ventricules de souris.^{51, 52} Il est difficile de faire un parallèle avec les différences observées dans la comparaison ventricule/oreillette et celles vues dans la comparaison ventricule adulte/ventricule nouveau-né. Entre l'oreillette et le ventricule, les différences observées se situent au niveau des amplitudes de courant. Tandis que dans la comparaison nouveau-né/adulte, les différences sont essentiellement au niveau des différents courants potassiques qui causent la

repolarisation. Tout d'abord I_{K1} , ce courant est observé dès le stade fœtal. Lors du développement des cellules du stade fœtal au stade néonatal, l'expression du canal devient quatre fois plus importante, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de I_{K1} . Étrangement, aucun changement n'est observé pour les densités de courant au cours de cette même période.⁵¹ Une étude antérieure dans le laboratoire a démontré qu'une progression de la densité de I_{K1} est observée dans les sept premiers jours de vie pour atteindre les niveaux adultes au jour sept.⁵² I_{to} est présent dès le jour de la naissance, puis le courant devient plus important lorsque la cellule vieillit. La plus grande progression dans la densité de I_{to} se produit entre les jours sept et 20 de vie. Au jour 20 postnatal, il a atteint une amplitude de courant similaire à celle enregistrée dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.⁵² Le même patron de développement est observé pour le courant I_{ss} . Son pic de développement est situé entre les jours sept et 20 après la naissance. Par contre, il n'y a pas de progression de I_{ss} entre les jours un à sept contrairement à I_{to} .⁵² Un des courants importants pour la repolarisation dans la cellule adulte, I_{Kur} , n'est pas exprimé dans la cellule de nouveau-né.^{51, 52} Par contre, il y a dans la cellule ventriculaire de nouveau-né d'autres courants potassiques à la base de la repolarisation qui ne sont pas présents dans la cellule ventriculaire adulte. Ces courants sont aussi présents dans d'autres organismes, tel les cobayes, où ils ont un rôle à jouer dans la repolarisation des cellules ventriculaires adultes, il s'agit de la composante rapide du courant K^+ à rectification retardée soit I_{Kr} et de la composante lente du courant K^+ à rectification retardée ou I_{Ks} .⁵³ Wang et al ont rapporté que I_{Kr} , le courant contribuant de façon majoritaire à la repolarisation au stade fœtal, subit une diminution importante lors du jour 1 après la naissance mais encore plus importante au jour 3 de vie.⁵⁴ Dans le cas de I_{Ks} c'est le contraire qui se produit. Au stade fœtal, il n'a pas beaucoup d'importance. Lors du jour 1 après la naissance, il est aussi important que I_{Kr} et finalement chez la souris de 3 jours il est le courant le plus important pour la repolarisation dans le myocyte ventriculaire de nouveau-né.⁵⁴ Après le jour 3, I_{Ks} diminue pour finalement disparaître au jour 7.⁵⁴

1.3.2 Les tubules T chez la souris

Le système de tubules T est présent dans les cellules de myocarde ventriculaire de tous les mammifères. Chez la souris, il est particulièrement bien développé au niveau de l'abondance. Par contre, un niveau de pléiomorphisme important est observé. La forme caractéristique des tubules T en treillis est moins ordonné chez la souris lorsque comparé avec les tubules T de cobayes, chiens et singes. Ce qui confère une apparence un peu plus primitive au système de tubules T de la souris.⁵⁵ Comme les tubules T sont très développés chez la souris, cela en fait un modèle intéressant pour l'étude de cette structure. Chez les mammifères, le rôle des tubules T est de provoquer une contraction musculaire plus rapide et mieux coordonnée. Ils font cela en apportant un espace qui diminue la distance de diffusion qui est trop grande dans les cardiomyocytes de mammifères à une valeur optimale pour l'obtention d'une excitation diffuse. Une excitation diffuse est une des conditions nécessaire à une contraction coordonné dans toute la cellule.⁵⁵ Dans les souris, dont le cœur bat à des rythmes avoisinant les 600-700 battements par minutes, les tubules T seraient donc plus importants.²⁰

1.4 Hypothèse et objectifs

Les myocytes ventriculaires de souris adultes possèdent un réseau de tubules T particulièrement développé et complexe. Ce réseau d'invagination de membranes plasmiques permet une propagation rapide de l'excitation électrique à l'intérieur de la cellule. D'autre part, les canaux K^+ cardiaques jouent un rôle majeur dans la modulation de la durée du potentiel d'action et le couplage excitation-contraction. Dans le but d'optimiser leur rôle dans le processus de repolarisation, les canaux K^+ pourraient être largement localisés dans les tubules T. De plus, les courants K^+ et l'architecture des tubules T sont modifiés durant le remodelage cardiaque associé au développement ainsi que sous diverses conditions pathologiques incluant la défaillance cardiaque. Ces observations suggèrent une

association potentielle entre les tubules T et les canaux K^+ . Cependant, très peu d'études sur une relation potentielle entre les canaux K^+ et les tubules T ont jusqu'à présent été réalisées.

Les objectifs de la présente étude sont (1) de déterminer si les canaux potassiques fonctionnels sont préférentiellement localisés dans les tubules T des myocytes ventriculaires de souris adultes, (2) de vérifier si l'augmentation générale de l'expression des canaux potassiques durant le développement est liée à l'apparition des tubules T dans les myocytes ventriculaires de souris et ⁵⁶ d'évaluer l'impact de l'insuffisance cardiaque sur la structure des tubules T.

Les techniques de patch-clamp, d'immunofluorescence et de microscopie confocale seront utilisées conjointement afin d'étudier les conséquences physiologiques de la localisation des canaux potassiques dans les tubules T des myocytes ventriculaires de souris adultes. L'imagerie confocale de myocytes ventriculaires marqués avec la « wheat germ agglutinin » (WGA) sera utilisée pour visualiser la membrane plasmique et les tubules T des myocytes. Un double marquage sera réalisé avec la WGA et des anticorps spécifiques pour certains canaux K^+ (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3 et Kir2.1) afin d'établir si ces canaux sont également localisés dans les tubules T des myocytes ventriculaires. D'autre part, des études électrophysiologiques seront réalisées pour mesurer des courants K^+ (I_{Kur} , I_{ss} , I_{to} et I_{K1}) présents dans les myocytes ventriculaires de souris. Des évidences directes sur le rôle fonctionnel des tubules T dans la repolarisation cardiaque sera fournie par la « détubulation » avec la formamide, un agent causant un choc osmotique qui entraîne la rupture du réseau de tubules T de la membrane périphérique.

L'absence de réseau de tubules T développés dans les ventricules de souris nouveau-nées suggère une distribution subcellulaire des canaux K^+ différente de celle

rencontrée chez la souris adulte. Ceci pourrait fournir une explication structurelle pour la faible densité de courant K^+ observée dans le cœur de souris nouveau-nées. Également, afin d'approfondir les évidences suggérant que la majorité des canaux K^+ fonctionnels sont préférentiellement localisés dans les tubules T, l'évaluation du lien entre le développement postnatal de la repolarisation cardiaque et l'acquisition d'un réseau de tubules T mature et fonctionnel sera faite. Les mêmes approches expérimentales décrites à l'objectif 1 seront utilisées.

Puisque des indications, sur la modification de l'architecture des tubules T dans l'insuffisance cardiaque ont été rapportées dans la littérature, une évaluation du réseau de tubules T, par la WGA, sera effectuée dans deux modèles d'insuffisance cardiaque. Soit, un modèle de surexpression du récepteur adrénergique α_{1B} et un modèle par infarctus suite à la ligature de l'interventriculaire antérieure.

Ces études permettront d'approfondir la compréhension des conséquences fonctionnelles de la localisation des canaux potassiques dans les tubules T et également de fournir des informations importantes sur le rôle fonctionnel des canaux K^+ cardiaques en conditions physiologiques et lors de certaines conditions pathologiques.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Isolation de myocytes ventriculaires

Des souris CD1 adultes, de sexe masculin (âgées de 2 à 3 mois, pesant entre 25 et 30 grammes) ont été injectées avec de l'héparine. Ensuite, les souris ont été anesthésiées par l'inhalation d'isoflurane avant d'être sacrifiées par dislocation cervicale. Le cœur a rapidement été retiré de la cage thoracique, pour ensuite être perfusé de façon rétrograde par l'aorte sur un appareil de Langendorff modifié avec les solutions suivantes (A) 5 minutes avec une solution de Tyrode, tamponnée à l'HEPES contenant (en mM) : 130 NaCl, 5,4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0,33 Na₂HPO₄, 10 HEPES et 5,5 de glucose (pH ajusté à 7,4 avec du NaOH 1N) (B) 10 minutes avec une solution de Tyrode sans calcium (C) 20 minutes avec une solution de Tyrode sans calcium contenant 73,7 U/ml de collagénase Type 2 (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA); 0,1% d'albumine bovine sérique (BSA; Fraction V, Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA); 20 mM de taurine et 30 µM de CaCl₂. Finalement en (D) une solution Kraft-Bruhe contenant (en mM) 100 K⁺-glutamate, 10 K⁺-aspartate, 25 KCl, 10 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 20 taurine, 5 créatine base, 0,5 EGTA, 5 HEPES, 0,1% albumine bovine sérique et 20 glucose (pH ajusté à 7,2 avec du KOH 1N). Pendant la perfusion, les solutions sont maintenues à 37±1°C et elles sont constamment oxygénées. À la fin de la perfusion, la paroi libre du ventricule droit a été isolée et coupée en petits morceaux. Ensuite, les morceaux ont été remués doucement, en faisant un mouvement de haut en bas, avec le liquide dans une pipette Pasteur de verre. Les cellules ont été filtrées à travers un filtre de 150 µm de type Mesh, les myocytes ventriculaires isolés ainsi obtenus sont maintenus dans une solution Kraft-Bruhe à 4 degré celcius jusqu'à leur utilisation.

2.2 Microscopie confocale

Des cellules ventriculaires ont été isolées avec la technique décrite ci-dessus. Toutes les solutions utilisées pour la microscopie confocale sont à base de salin tamponné au phosphate (PBS) à pH 7,4. Les cellules ont adhéré sur des lamelles couvertes de

2.3 La détubulation au formamide

Après que les cellules aient été isolées (voir isolation de myocytes ventriculaires), elles ont été incubées 10 minutes dans une solution de Tyrode contenant 1,5 M de formamide. Ensuite, elles ont été remises dans la solution de Tyrode normal pendant 10 minutes afin d'effectuer la période de lavage. Elles ont été à nouveau déposées dans une solution de Tyrode pour compléter le lavage et s'assurer qu'il n'y a plus de formamide, jusqu'à leur utilisation. Cette technique a été mise au point par le groupe de Clive Orchard de l'Université de Leeds, Angleterre.⁴⁴

2.4 Induction d'infarctus par ligature de coronaire

Tout d'abord, l'animal est anesthésié avec l'isoflurane 2,5% et un débit d'oxygène de 0,5 L/min. La souris est mise dans une boîte d'induction. Lorsque l'animal est anesthésié, la buprénorphine à 0,05 mg/kg est injectée intra-péritonéale. Puis l'animal est intubé avec un cathéter de 20G, relié à un respirateur Hugo Sachs elektronik Minivent type 845. La fréquence respiratoire est de 160 BPM avec un volume courant de 0,25mL/min. L'animal est ensuite placé sur un tapis chauffant à eau (Gaymar t-pump) en position dorsale et les yeux sont recouverts d'un peu de gel Lacrilub afin de protéger les yeux du dessèchement. Des électrodes pour enregistrer l'ECG sont ensuite placées en position D1. Les pattes antérieures sont maintenues sur le tapis chauffant et les pattes postérieures sont attachées en position supine pour que la partie gauche des côtes soit plus facilement accessible. L'animal est rasé par application de la crème épilatoire (Veet) pendant deux minutes, celle-ci est enlevée avec des gazes et la peau est rincée avec de l'eau tiède. La peau est ensuite désinfectée en mettant de la chlorexidine (doxidine 0,5%) qui sèche 2 minutes. L'incision est faite en débutant du sternum vers la patte antérieure gauche sur une longueur de 2 cm. Le muscle pectoral transverse est séparé du conjonctif et repoussé du côté sternal. Puis le muscle pectoral profond est repoussé en latéral. Une incision entre les

côtes 3 et 4 sur 0.5 cm de long est faite. L'artère coronaire interventriculaire antérieure est repérée. Le péricarde est déchiré, puis avec un fil 10-0 (ethilon 9009G) une ligature de l'artère est faite à 1 mm en dessous de l'oreillette. La qualité de la ligature est vérifiée par le changement de couleur. C'est-à-dire par l'apparition d'une zone grise correspondant à la zone infarctée. L'ouverture au niveau des côtes est refermée avec un fil de soie 5-0 (Sherwood Davis and Geck 1022-21). Puis les muscles, qui ne devraient pas être déchirés, sont remis en place. Quelques gouttes de saline sont ajoutées afin de réhumidifier les tissus. Finalement, la peau est fermée avec trois agrafes. L'isoflurane est ensuite fermée mais la respiration artificielle est maintenue en surveillant l'augmentation du rythme cardiaque. L'inversion de l'onde T caractéristique de l'infarctus est aussi surveillée. Lorsque l'animal cherche à respirer seul, l'intubation est cessée. Il est maintenu sur le tapis chauffant jusqu'à son retour complet à l'état d'éveil. L'animal est ensuite remis dans sa cage qui est maintenue sur un tapis chauffant pendant 2 jours pour éviter les problèmes de thermorégulation.

3 Résultats

3.1 Validation des méthodes utilisées

3.1.1 Vérification de la spécificité des anticorps contre les canaux potassiques

Dans la figure 3.1A, le patron de marquage de chacun des canaux potassiques fonctionnels est montré. Tous les canaux potassiques observés dans cette expérience semblent avoir une localisation similaire, caractérisée par un marquage au niveau de la membrane plasmique ainsi que par un patron de stries transverses et axiales. Les stries, sont clairement définies, et positionnées à un intervalle régulier. Pour démontrer que les anticorps contre les canaux potassiques ne reconnaissent pas d'autres protéines exprimées dans les myocytes cardiaques, la spécificité a été testée avec un marquage immunofluorescent en présence de l'antigène en excès. Les données présentées dans la figure 3.1B établissent clairement qu'aucune autre protéine n'est reconnue par ces anticorps puisque le signal obtenu est très faible et à peine différent du bruit de fond.

3.1.2 Déconvolution des images de microscopie confocale

Une comparaison des résultats obtenus avec et sans la déconvolution est présentée dans la figure 3.2. La déconvolution est une technique de traitement d'images par ordinateur qui ne modifie rien les résultats obtenus mais qui permet d'obtenir meilleure résolution. Il est évident que sans la déconvolution l'image est beaucoup moins claire est que la définition obtenue est vraiment moins élevée. Donc toutes les images présentées par la suite ont été déconvoluées afin d'obtenir la meilleure résolution possible.

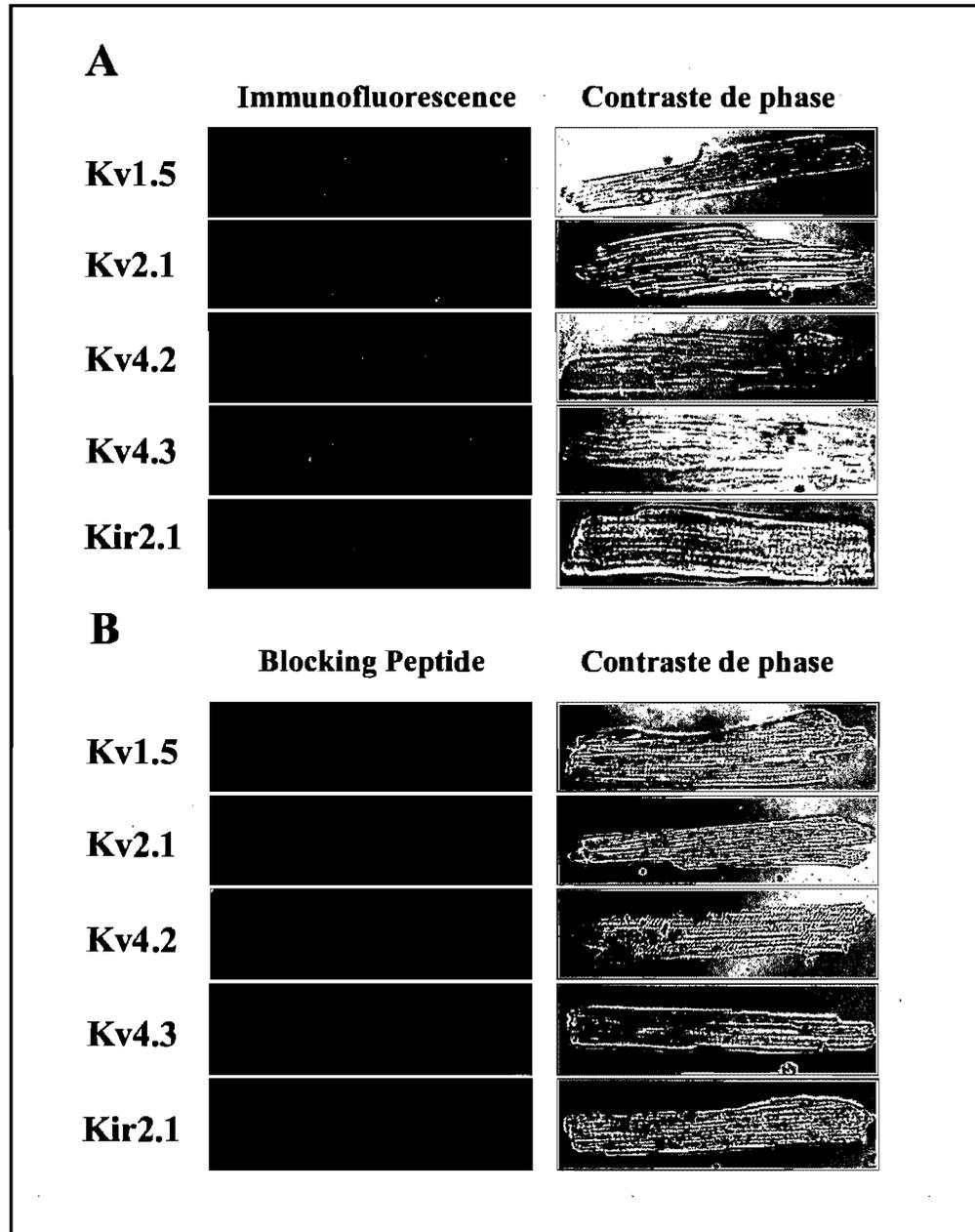


Figure 3.1 La spécificité des anticorps contre les canaux potassiques.
A) Gauche: La détection par immunofluorescence des canaux K^+ étudiés dans les myocytes ventriculaires de souris adultes. **Droite:** Le contraste de phase de la même cellule
B) Gauche: Préincubation de l'anticorps avec la protéine de fusion en excès, contre laquelle les anticorps ont été générée. **Droite:** Le contraste de phase de la même cellule.

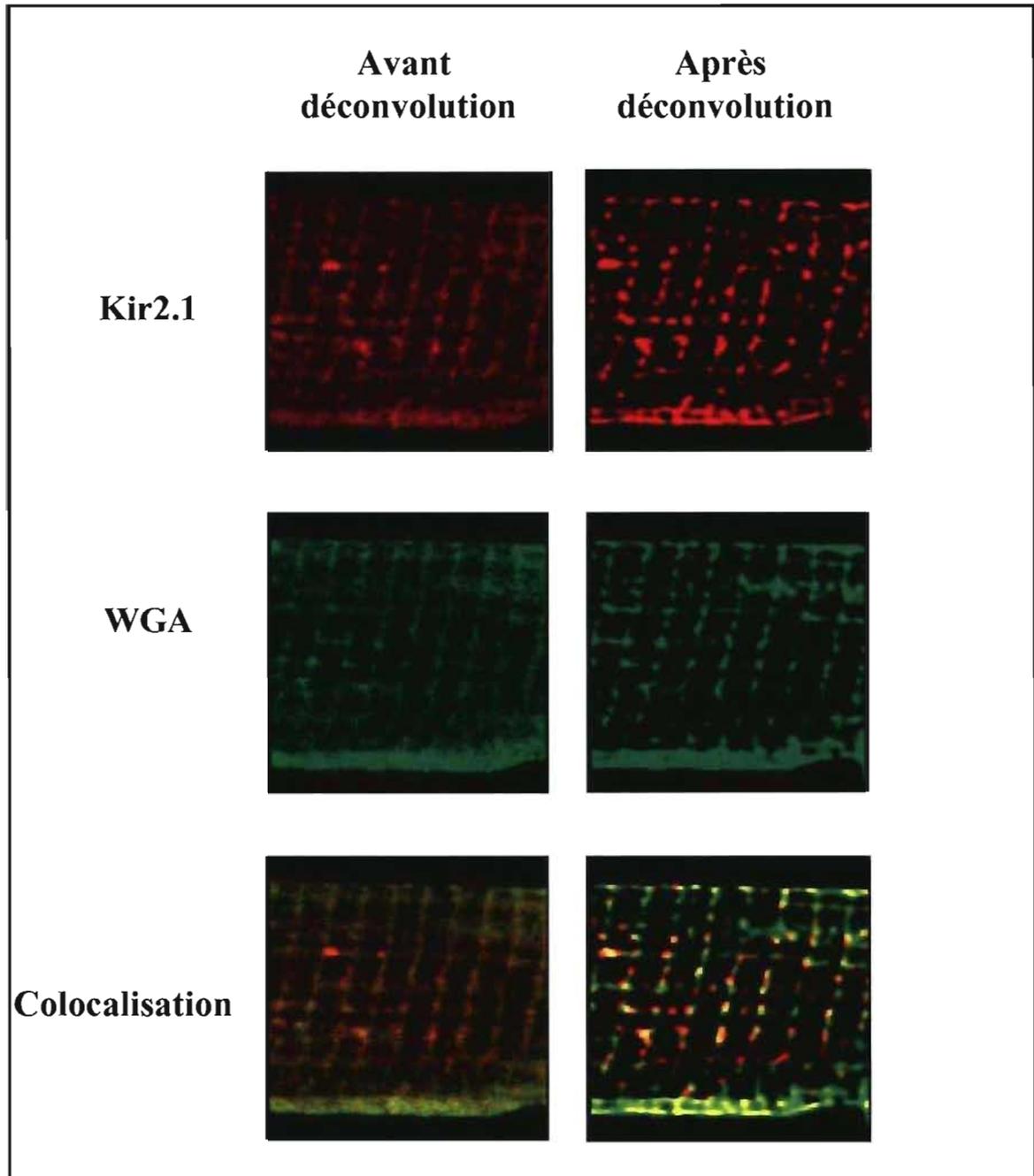


Figure 3.2 Comparaison des images avant et après la déconvolution. Des marquages contre Kir2.1 et pour le WGA dans des myocytes ventriculaires de souris adultes avant (gauche) et après (droite) déconvolution. Les signaux rouge et vert indiquent la présence de Kir2.1 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation (signal jaune) significative de Kir2.1 et WGA dans les stries transverses des myocytes ventriculaires de souris adultes. Cette figure montre que la déconvolution améliore grandement la résolution des images.

3.1.3 Comparaison des marqueurs de tubules T

Il a été discuté dans l'introduction qu'il existe plusieurs façons de marquer les tubules T. Deux de ces méthodes ont été employées dans notre laboratoire. Afin de sélectionner une seule des deux méthodes, une comparaison des résultats obtenus avec les deux marqueurs, la WGA et le di-8-ANEPPS, a été faite. La figure 3.3 montre que les deux marquages sont semblables, autant au niveau de la cellule de nouveau-né que de l'adulte. La striation axiale et transverse est facilement reconnaissable dans les deux cas, le marquage au niveau de la membrane plasmique est aussi assez semblable. La seule différence semble se situer au niveau de la résolution. Avec la WGA, le marquage obtenu semble plus fin et mieux défini, surtout au niveau de la membrane plasmique de nouveau-né et des stries dans la cellule adulte. C'est donc pour cette raison que la WGA a été préféré au di-8-ANEPPS.

3.2 Les effets de la détubulation

3.2.1 Au niveau de l'imagerie

Les effets d'un traitement au formamide ont ensuite été évalués afin de déterminer l'impact des tubules T dans la physiologie normale de la cellule cardiaque de souris adultes. Dans la figure 3.4 le marquage obtenu pour la cellule contrôle, correspond bien à la description des tubules T. C'est-à-dire un marquage à l'intérieure de la cellule avec des lignes dans les sens axiales et transverses, évidemment le marquage de la membrane plasmique est toujours présent. Dans la cellule traitée au formamide, il est facile de noter la perte des stries situées à l'intérieur de la cellule, surtout au niveau du centre. Près de la membrane plasmique, il est possible d'observer quelques bouts de tubules T encore présents. Mais la différence avec la cellule contrôle est évidente quand à la perte de ce réseau. Ce qui est intéressant de noter, c'est que le marquage de la membrane plasmique n'a pas changé, suggérant que les propriétés de la membrane ne sont pas modifiées par le

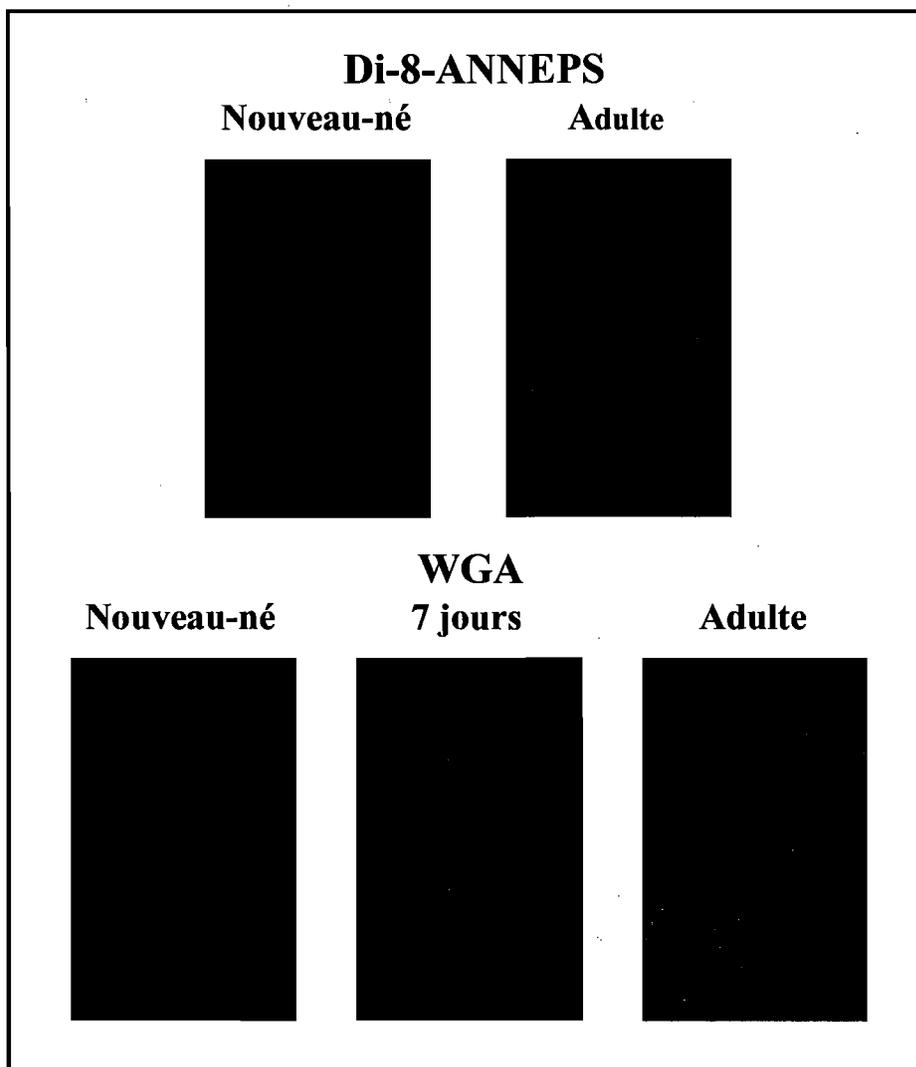


Figure 3.3 Comparaison de deux marqueurs de tubules T dans les myocytes de souris nouveau-nées et adultes. Un marquage immunofluorescent de la membrane cellulaire avec la WGA et le Di-8-ANEPPS dans des myocytes ventriculaires de souris de nouveau-nées, de 7 jours et adulte.

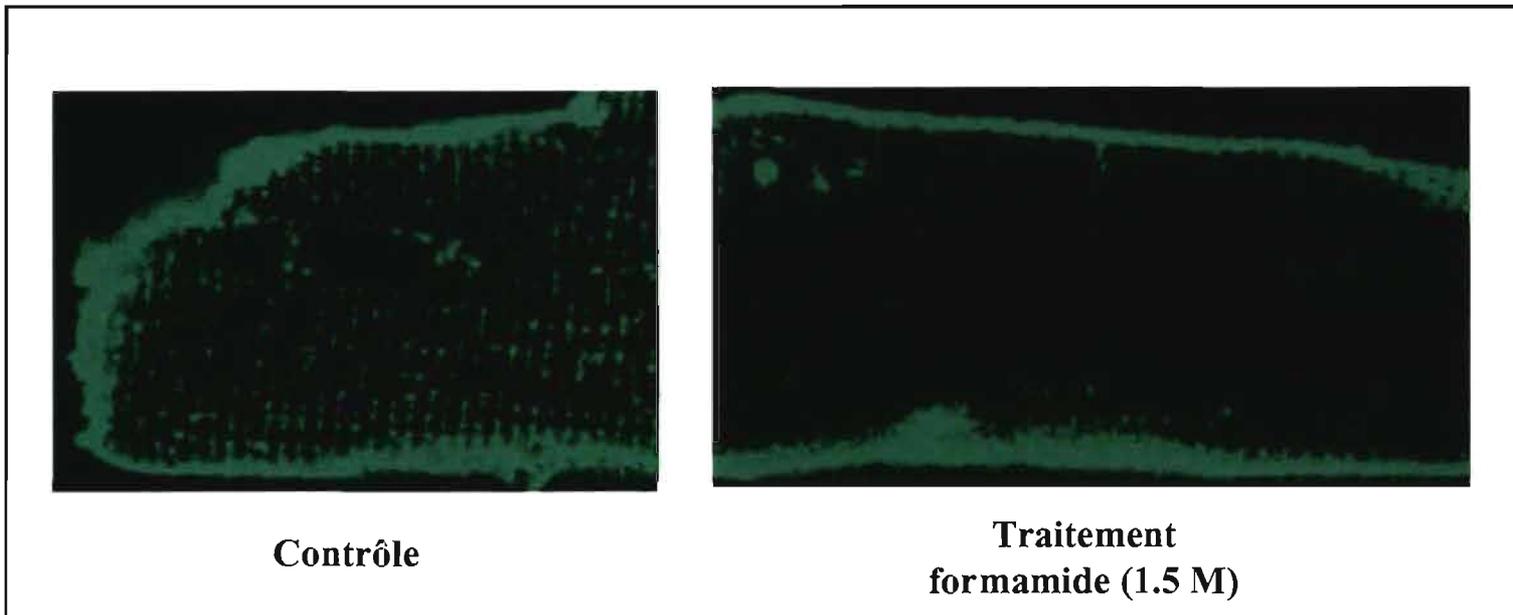


Figure 3.4 Détubulation au formamide. Le marquage à la WGA au niveau des myocytes ventriculaires de souris adultes sous des conditions contrôles et après un traitement au formamide (1.5 M, 10 minutes de lavage), montre que la WGA n'a plus accès aux tubules T après le traitement au formamide, seulement un marquage en périphérie de la cellule est encore présent.

traitement au formamide. Par contre la WGA n'a plus accès aux tubules T indiquant la rupture des liens entre les deux systèmes.

3.2.2 Au niveau de l'électrophysiologie

De plus, la densité des courants potassiques totaux des myocytes ventriculaires de souris adultes diminuent de façon significative après une manœuvre de détubulation. Comme la figure 3.5, qui présente une étude de patch-clamp sur cellule entière le montre. Les données utilisées pour le montage de la figure 3.5 ont été récoltées avant mon arrivée dans le laboratoire par une autre étudiante, Véronique Trépanier-Boulay.

3.3 Co-localisation des canaux potassiques et des tubules T au niveau des myocytes ventriculaires de souris adultes

3.3.1 Les canaux potassiques fonctionnels chez la souris adulte

Les expériences suivantes ont été entreprises afin de vérifier si la diminution des courants potassiques totaux pouvaient être reliée à la perte de tubules T. En effet, il a été mentionné précédemment que la densité des courants potassiques totaux sont diminuée dans les cellules exposées au formamide et que ces cellules montrent une perte de tubules T. Cela pourrait permettre de savoir si les canaux potassiques sont situés dans les tubules T. Les figures 3.6 à 3.10 illustrent la localisation des canaux potassiques fonctionnels. La figure 3.6 décrit la localisation du canal Kv1.5. Le marquage en rouge qui correspond à Kv1.5 est localisé au niveau de la membrane plasmique et aussi dans le cytoplasme, où il suit un marquage en forme de treillis composé de stries axiales et transverses toujours séparées par une distance constante. Le marquage en vert, quant à lui, représente la WGA, la substance qui se lie aux membranes incluant les tubules T. Le résultat est semblable à celui observé dans la figure 3.4 pour la cellule contrôle, c'est-à-dire un marquage plasmique ainsi que cytoplasmique strié dans les sens axial et transverse de manière

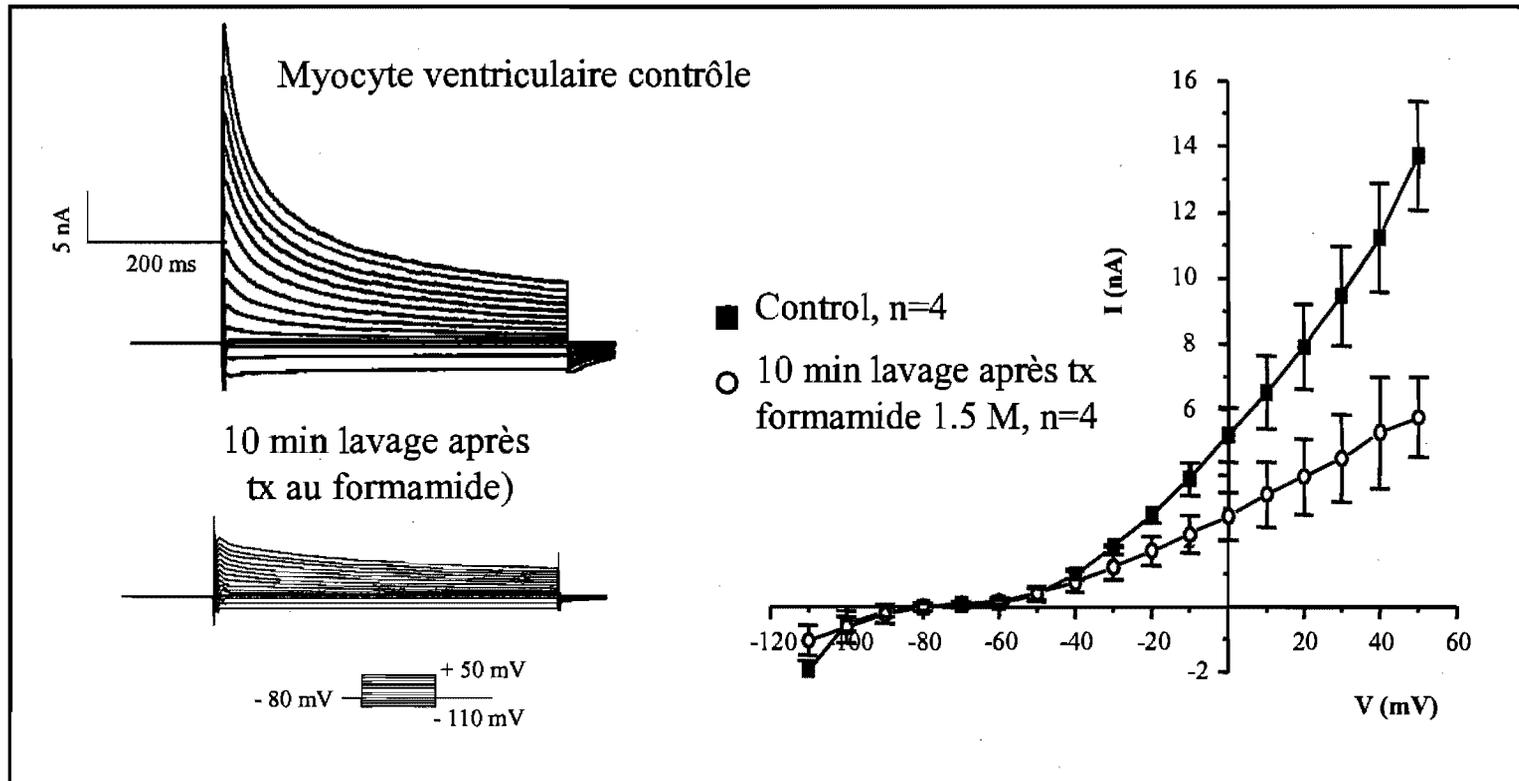


Figure 3.5 Effet de la détubulation sur les courants potassiques. *Gauche:* Des exemples de traces de courants superposés des courants potassiques totaux (I_{Peak}) enregistrés dans des myocytes ventriculaires de souris adultes sous conditions contrôles et après un traitement au formamide (1.5 M, 10 min. lavage). *Droite:* Les courbes IV correspondantes de I_{Peak} sous conditions contrôles et après traitement au formamide.

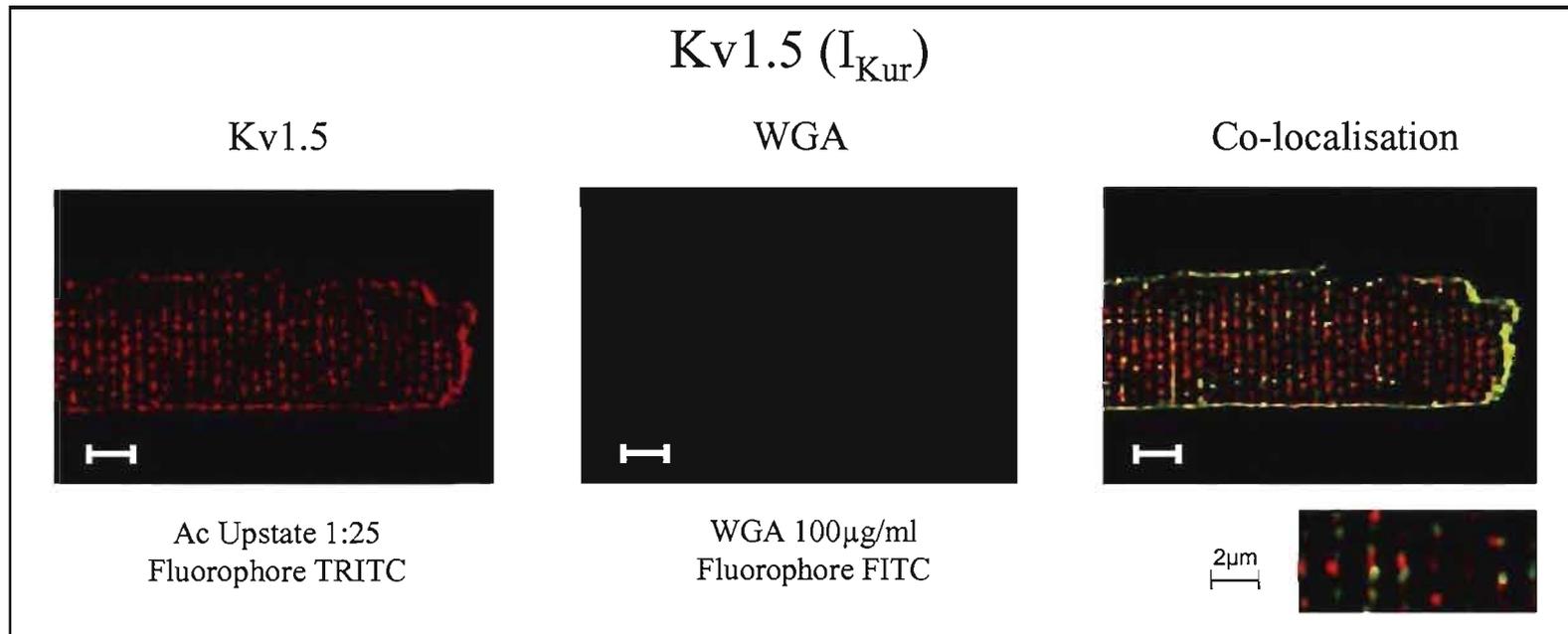


Figure 3.6 Marquage du canal Kv1.5 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de Kv1.5 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation significative entre Kv1.5 et la WGA dans les stries transverses de myocytes ventriculaires de souris adultes.

régulière. Le troisième panneau est composé de la superposition des deux images précédentes. Un pixel de couleur jaune est obtenu lorsque un pixel rouge et un pixel vert sont au même endroit. Le marquage de couleur jaune représente donc la co-localisation. Cette co-localisation s'observe au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans les stries axiales et transverses du cytoplasme. Il est intéressant de noter que la distance entre deux rangées de tubules, axiales ou transverses, est légèrement inférieure à 2 μm , comme il est possible de l'observer dans le petit encadré représentant un plus fort grossissement. Cette valeur ressemble beaucoup à la valeur de 1,8 μm des tubules T de rat rapportée dans la littérature.¹⁶ Dans les figures 3.7 à 3.10, les résultats obtenus sont semblables à ceux de Kv1.5 mais le marquage en rouge correspond à Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3 et Kir2.1, respectivement. Tandis que le marquage en vert représente toujours la WGA et le jaune la superposition des deux images donc la co-localisation.

3.3.2 Les canaux potassiques non-fonctionnels chez la souris adulte

Dans les figures 3.11 et 3.12, les mêmes types de marquage ont été effectués. Donc en vert, c'est la WGA, en rouge les canaux potassiques minK et KvLQT1. La différence avec les figures précédentes, c'est que cette fois ce sont des canaux potassiques qui ne correspondent à aucun courant potassique dans la cellule de ventricule de souris adultes, d'où la désignation de canaux non-fonctionnels. Puisque ces canaux n'ont pas de fonction dans ces cellules, leur localisation dans les tubules T n'est pas nécessaire. C'est ce qui est observé pour minK. Comme montré par la figure 3.12, dans le panneau de co-localisation il y a très peu de pixels jaunes. De plus, le grossissement dans le bas de la figure montre bien que les rangées de marquage rouge sont situées entre les rangées de vert. Pour KvLQT1, cela n'est pas aussi clair. Beaucoup de pixels jaunes sont observés, donc il semble co-localisé avec les tubules T (figure 3.11). Malgré sa co-localisation possible avec les tubules T, une explication peut être trouvée dans le marquage de minK. Pour que

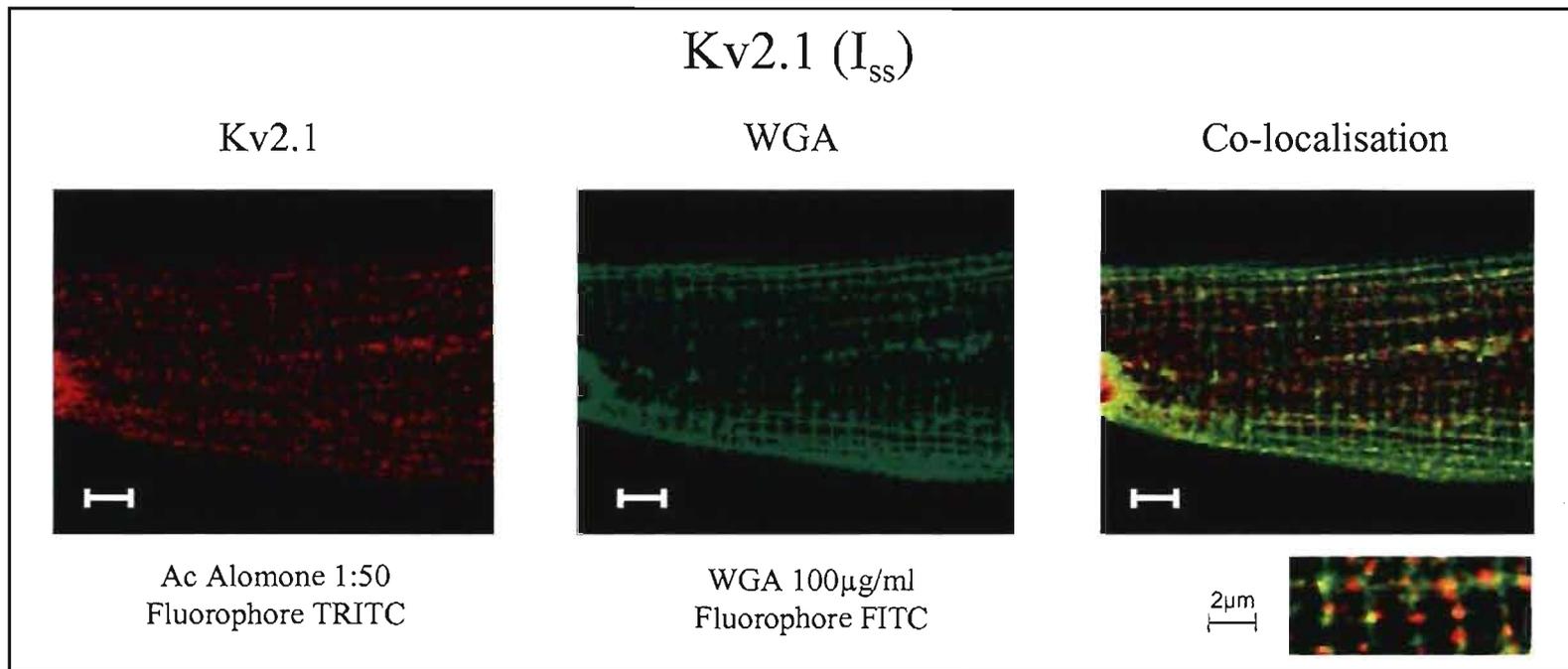


Figure 3.7 Marquage du canal Kv2.1 et sa co-localisation avec le WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de Kv2.1 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation significative entre Kv2.1 et la WGA dans les stries transverses de myocytes ventriculaires de souris adultes.

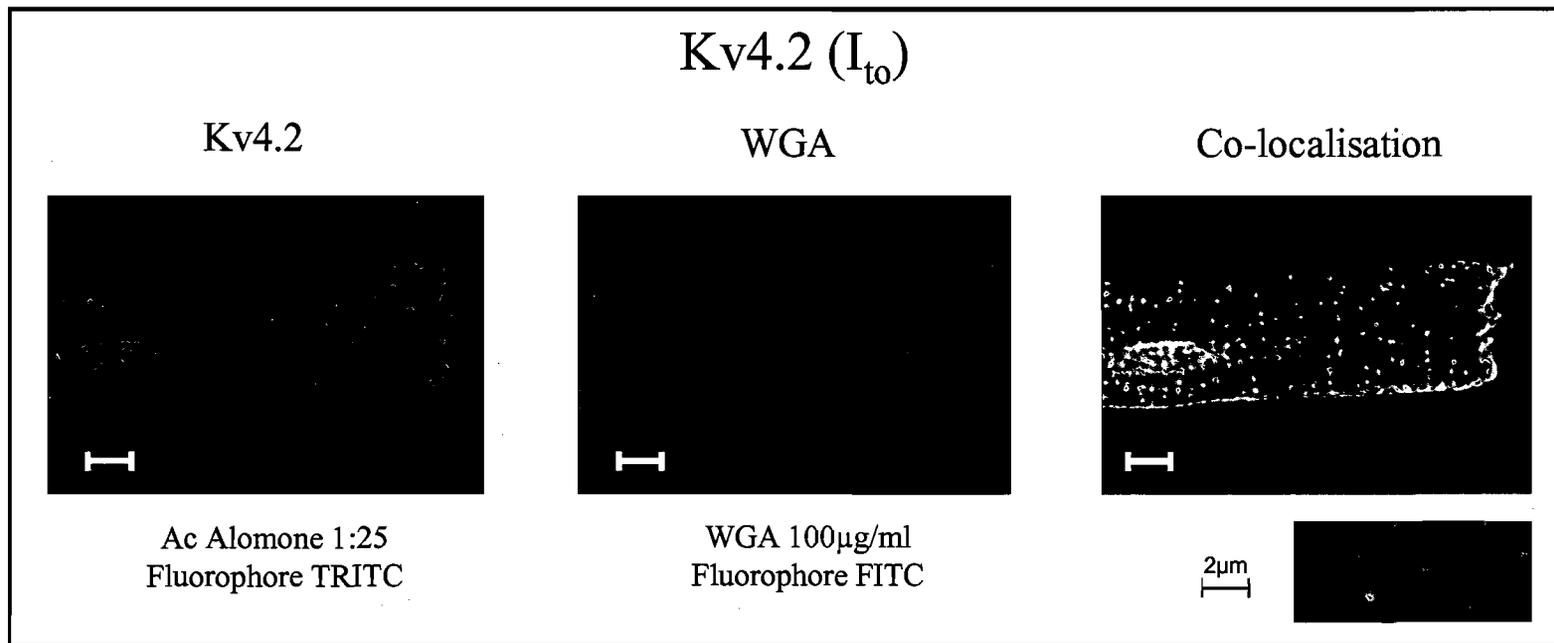


Figure 3.8 Marquage du canal Kv4.2 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de Kv4.2 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation significative entre Kv4.2 et la WGA dans les stries transverses de myocytes ventriculaires de souris adultes.

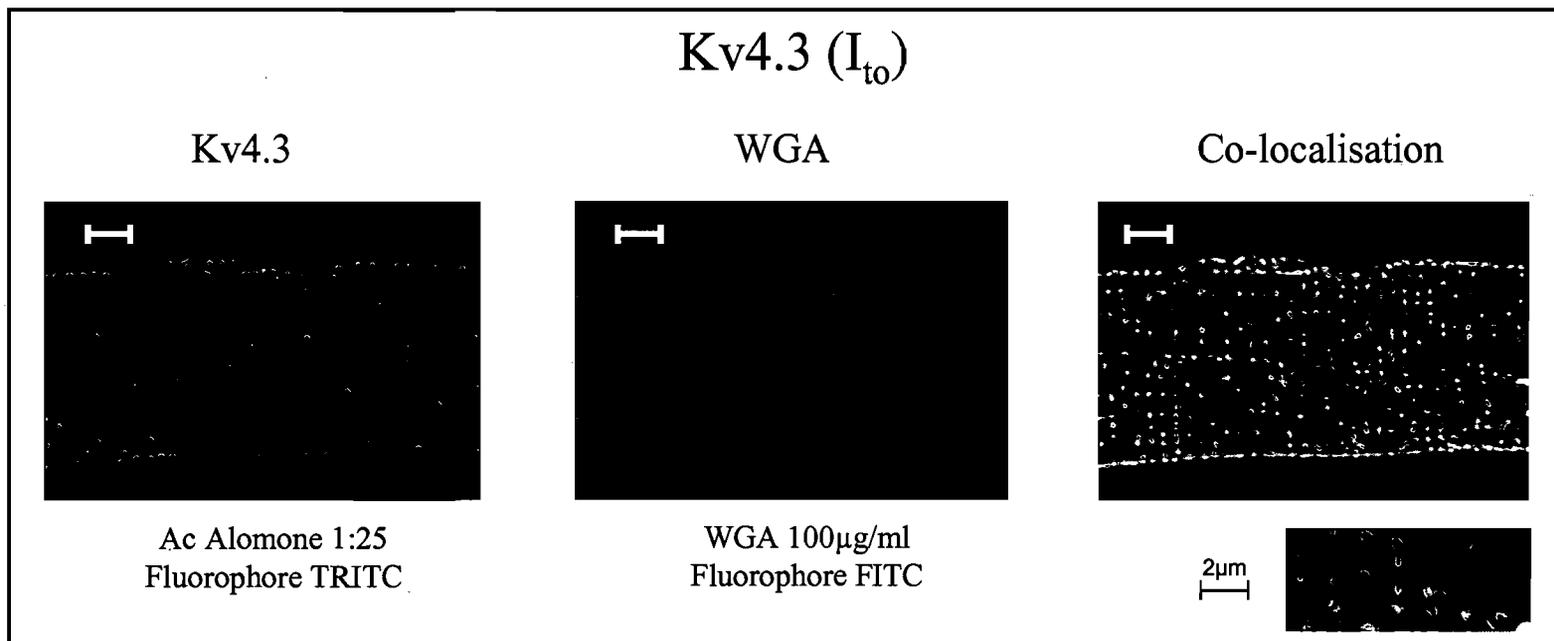


Figure 3.9 Marquage du canal Kv4.3 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de Kv4.3 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation significative entre Kv4.3 et le WGA dans les stries transverses de myocytes ventriculaires de souris adultes.

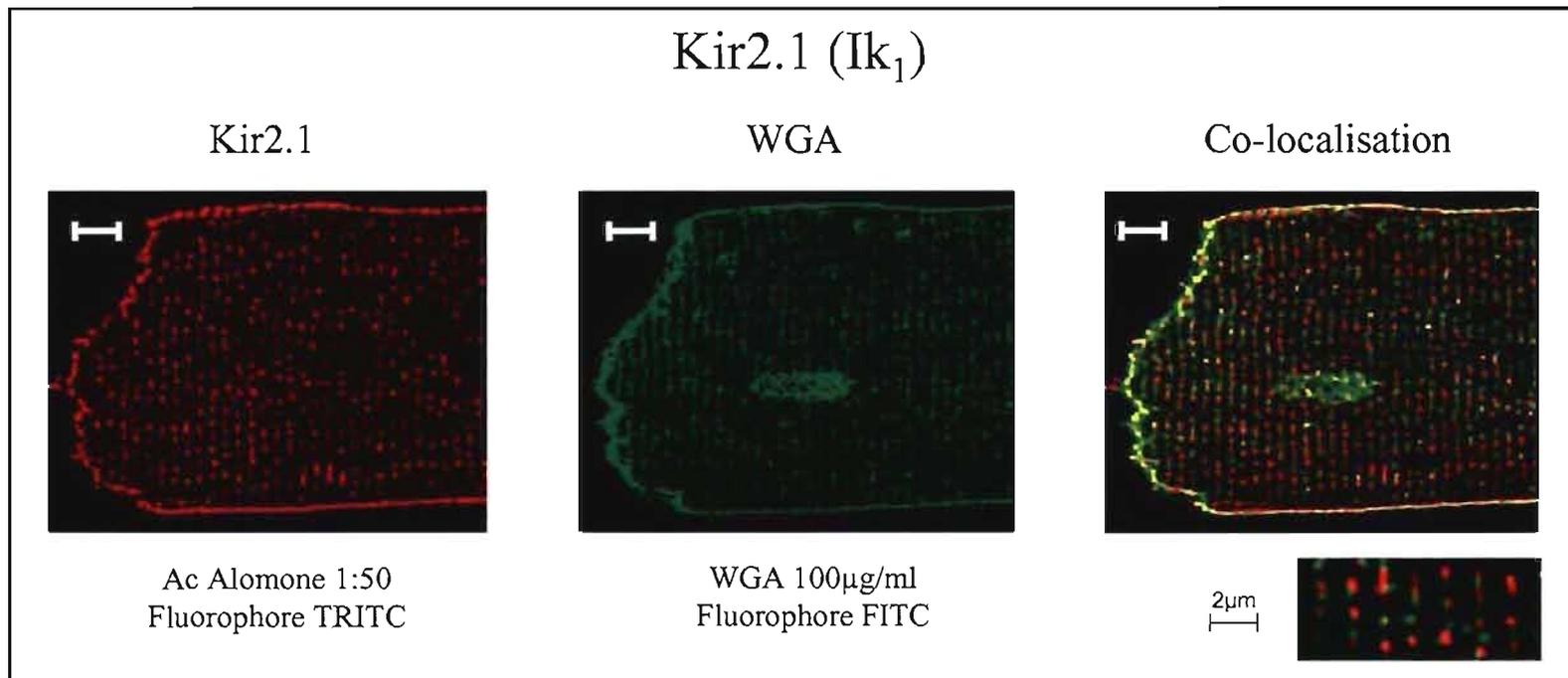


Figure 3.10 Marquage du canal Kir2.1 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de Kir2.1 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation significative entre Kir2.1 et la WGA dans les stries transverses de myocytes ventriculaires de souris adultes.

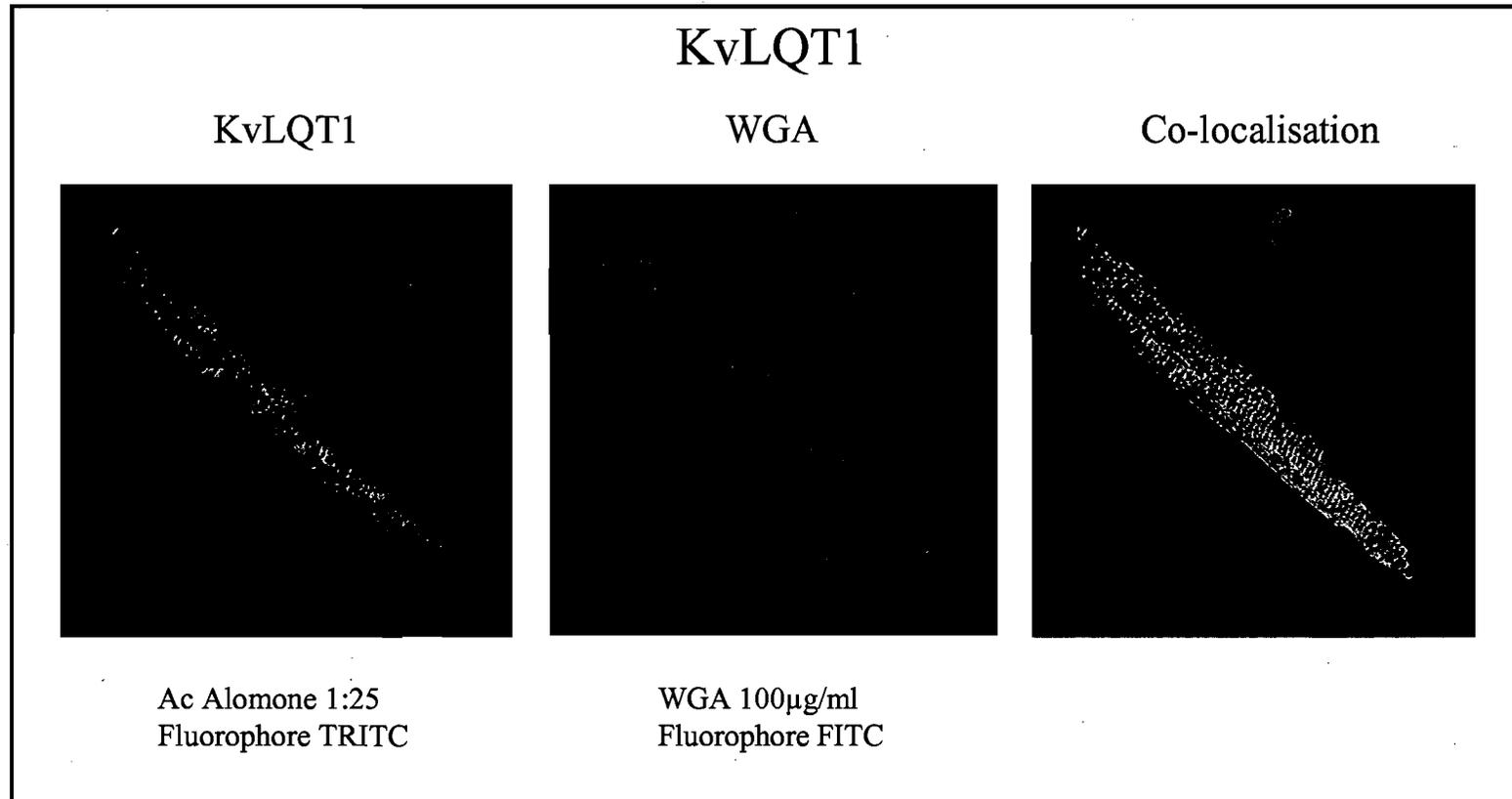


Figure 3.11 Marquage du canal KvLQT1 et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de KvLQT1 et de la WGA respectivement. La superposition des deux images montre une co-localisation significative entre KvLQT1 et la WGA dans les stries transverses de myocytes ventriculaires de souris adultes.

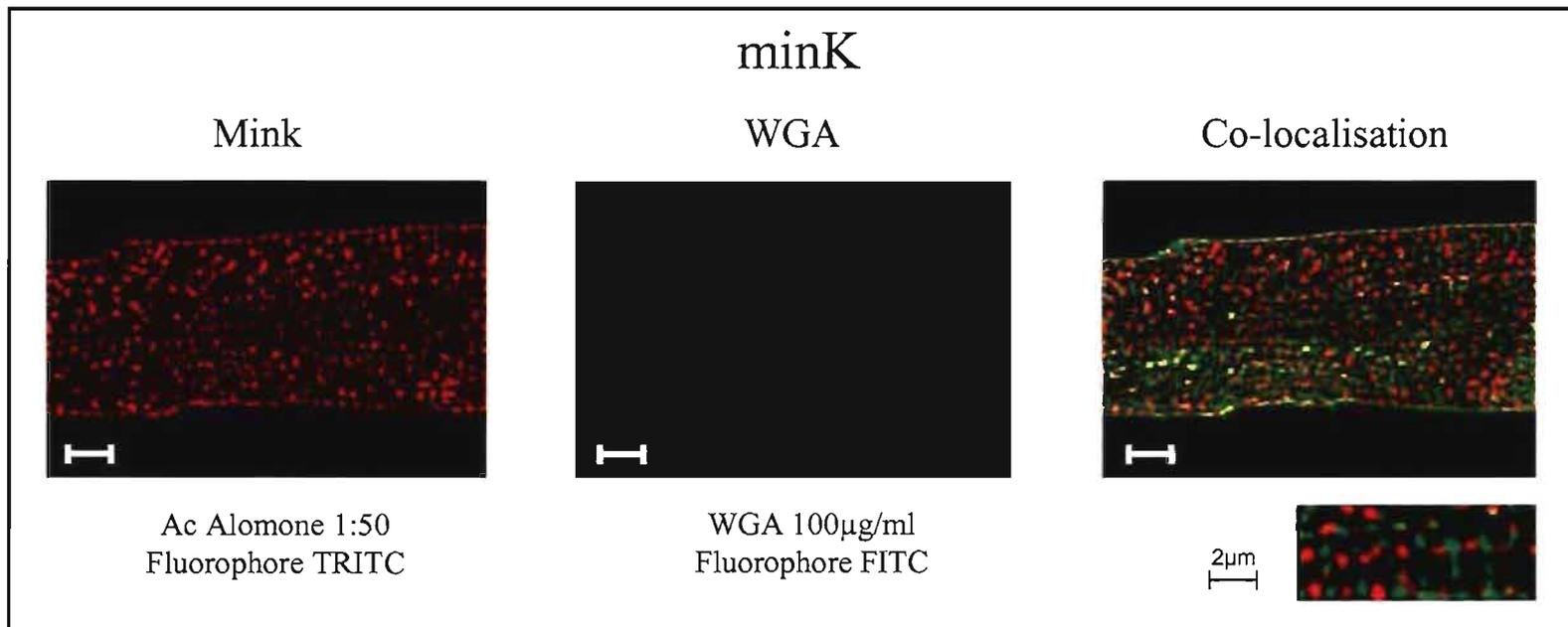


Figure 3.12 Marquage de minK et sa co-localisation avec la WGA dans les myocytes de souris adultes. Le marquage fluorescent rouge et vert indique la présence de minK et de la WGA respectivement. La superposition des deux images ne montre pas de co-localisation significative entre minK et la WGA. Il est même possible de voir que minK se situe entre les stries transverses de la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris adultes.

KvLQT1 soit actif, il nécessite la présence de la sous-unité minK. La figure 3.12 a montrée que celle-ci n'est pas dans les tubules T. Cela pourrait expliquer que KvLQT1 malgré sa présence dans les tubules T ne produise pas un courant K^+ fonctionnel.

3.4 Le développement chez la souris au niveau des myocytes ventriculaires

3.4.1 Évolution des courants potassiques et du potentiel d'action au niveau ventriculaire

Les courants potassiques commencent très petits et augmentent suivant le développement de la cellule. C'est ce que montre les courbes IV de I_{peak} , dans la figure 3.13B. Le courant de la cellule néonatale a une valeur moyenne de 6 pA/pF comparativement à 17 pA/pF pour la cellule de 7 jours, 45 pA/pF pour celle de 19 jours et 70 pA/pF pour l'adulte. Tandis que pour les durées des potentiels d'action, l'effet inverse est observé. Ce qui est normal puisque la durée du potentiel d'action est fonction de l'amplitude des courants potassiques. Donc il était attendu que les potentiels d'action les plus long seront au niveau néonatal, là où les courants potassiques sont les plus petits et qu'ils raccourciront durant le développement (figure 3.13A). Les cellules de souris nouveau-nées ont des courants potassiques dont les amplitudes sont semblables aux cellules qui ont été traitées au formamide. De plus, le traitement au formamide a pour effet de séparer, par un choc osmotique, le lien entre la membrane plasmique et le réseau de tubules T. Ces données suggèrent donc que la présence des tubules T ait une importance dans l'amplitude des courants potassiques et leur participation dans le couplage excitation-contraction. Les données électrophysiologiques utilisées dans cette figure ont été récoltées par une autre étudiante avant le début de ma maîtrise en l'occurrence Véronique Trépanier-Boulay.

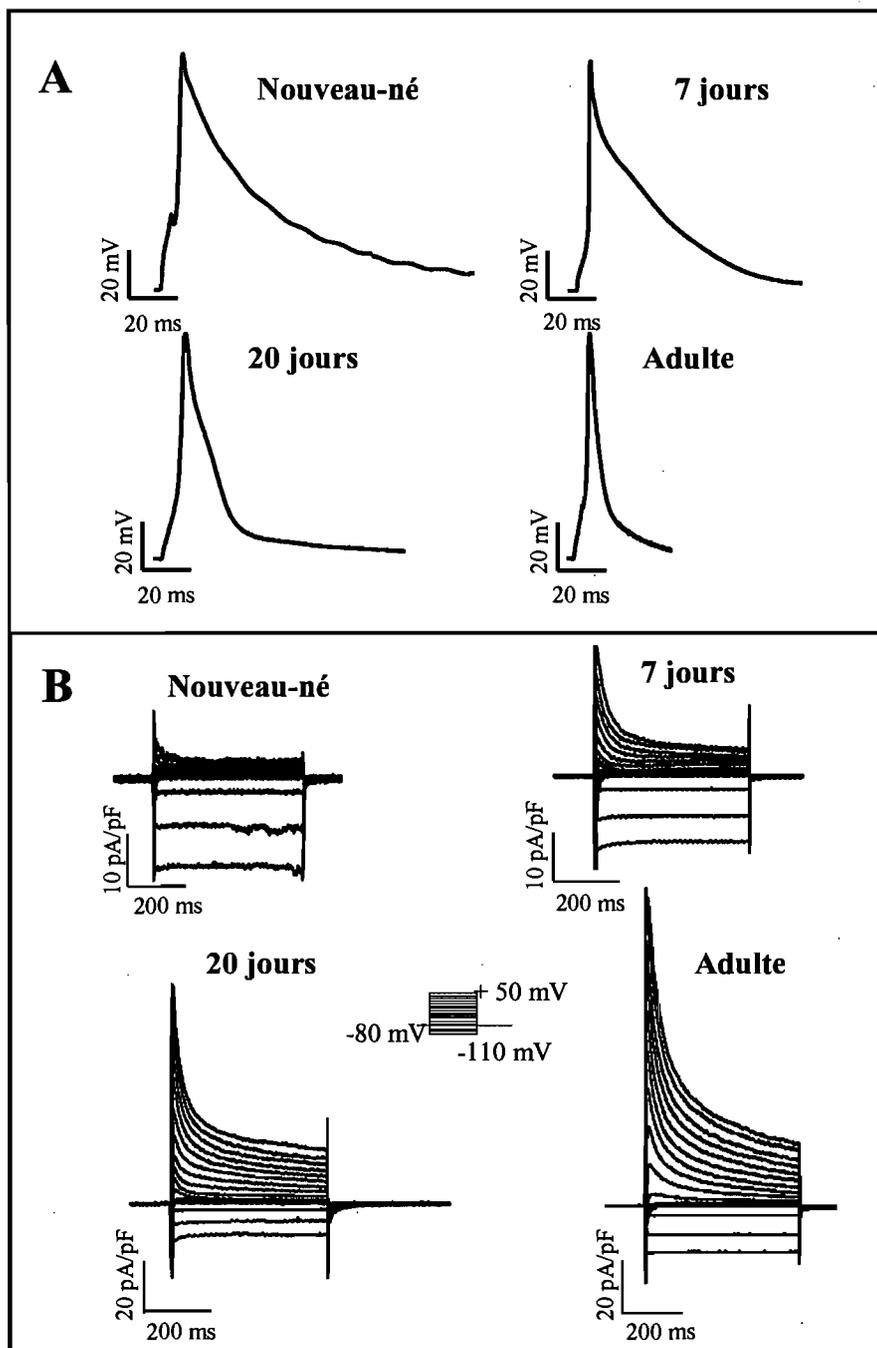


Figure 3.13 Changements du décours des potentiels d'action en fonction du développement postnatal dans les myocytes ventriculaires de souris. A) Des potentiels d'action typiques enregistrés chez des cellules de souris nouveau-nées, de 7 jours, de 20 jours et adultes. B) Des exemples de traces de courants superposés des courant potassiques totaux (I_{peak}) enregistrés à partir des différents groupes d'âge.(adapté de Grandy *et al.*)⁴⁶

3.4.2 La co-localisation pendant le développement postnatal au niveau ventriculaire chez la souris

D'autres études de co-localisation ont été faites, cette fois sur des cellules de nouveau-nées. Comme les courants potassiques des souris nouveau-nées sont de plus faible amplitude et que cette amplitude correspond à celle des cellules détubulées, une absence de co-localisation entre les tubules T et les canaux potassiques semblait possible. La figure 3.14 montre bien qu'il n'y a pas de co-localisation pour aucun des canaux potassiques fonctionnels. Puisque, comparativement aux figures précédentes (3.6 à 3.10), il n'y a pas de pixel jaune dans la superposition des deux images. Encore une fois le marquage en rouge représente les canaux potassiques tandis que le vert est pour la WGA. Il est évident que le marquage de la WGA n'est pas situé aux mêmes endroits. À ce stade, seulement la membrane plasmique est marquée avec le noyau. Il n'y a pas de marquage cytoplasmique, encore moins de stries qui sont observées. La localisation des canaux potassiques aussi diffère par rapport à l'adulte. Il n'y a pas de marquage à la membrane. La totalité du marquage est cytoplasmique. Il n'y a pas de structure définie dans le cytoplasme comme les stries observées chez l'adulte. Au stade de 7 jours, un autre patron de marquage est observé, aussi bien pour les canaux potassiques que pour la WGA. La WGA donne maintenant un signal plus important dans le cytoplasme malgré qu'il n'y ait pas encore de structures t-tubulaires clairement définies. Les canaux potassiques se localisent maintenant au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans le cytoplasme. Une co-localisation est maintenant observée à ces deux endroits comme le montre le marquage jaune dans la figure 3.14.

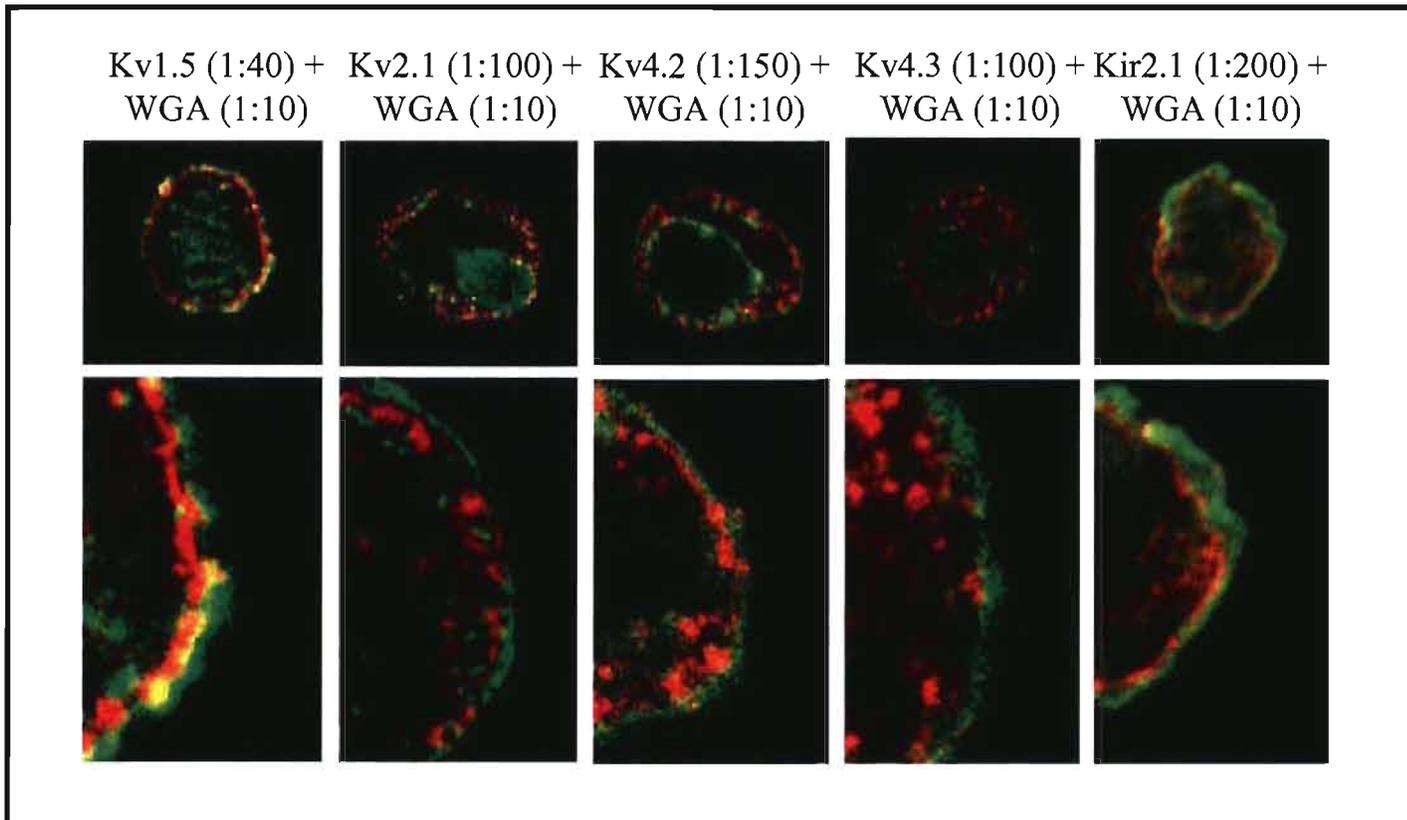


Figure 3.14 Marquage immunofluorescent des canaux K⁺ fonctionnels et à la WGA dans les myocytes ventriculaires de souris nouveau-nées. Le signal rouge indique la présence des canaux K⁺ fonctionnels tandis que la coloration verte correspond au marquage membranaire de la WGA. Peu ou pas de co-localisation (jaune) n'est observée. Données acquises par Louis Villeneuve et Véronique Trépanier-Boulay

3.5 Les modèles pathologiques chez la souris

3.5.1 Le modèle de souris transgénique surexprimant le récepteur adrénergique α_{1B}

Puisqu'il a déjà été rapporté dans la littérature que la structure des tubules T pouvaient se modifier avec certaines pathologies, entre autres, dans l'insuffisance cardiaque, une évaluation des tubules T dans un modèle d'insuffisance cardiaque a été effectué¹⁹. Premièrement, la caractérisation du modèle était nécessaire. La figure 3.15A (adapté de Lemire *et al.*) montre des échocardiographies réalisées chez les souris contrôles et transgéniques à l'âge de 9 mois. Il est possible d'observer une augmentation de l'aire télésystolique et télédiastolique du ventricule gauche chez les souris transgéniques, ce qui indique une dilatation du ventricule gauche. Lors des échocardiographies, le changement d'aire fractionnel a aussi été évalué puisqu'il représente la fonction systolique ventriculaire gauche. Une diminution d'environ 20% dans le groupe des souris transgéniques a été mesuré indiquant ainsi une insuffisance cardiaque.² Ensuite, afin de vérifier si l'insuffisance cardiaque était hypertrophique, des mesures de ratio masse du ventricule gauche/longueur de tibia ainsi que de capacitance cellulaire ont été faites dans les groupes contrôles et transgéniques (données acquises par Katy Rivard). Comme montré dans la figure 3.15B, aucune différence significative n'a été observée dans le ratio masse du ventricule gauche/longueur du tibia ni dans les capacitances cellulaires. Cela indique qu'il s'agit d'une insuffisance cardiaque dilatée. Ensuite, des mesures des courants potassiques en patch-clamp ont été réalisées sur des souris transgéniques ainsi que sur des souris contrôles (nées de la même portée qui n'ont pas reçu le transgène). Il est possible d'observer que I_{peak} est diminué chez les souris transgéniques, par rapport aux contrôles, comme le montre les exemples typiques dans la figure 3.16A ainsi que les courbes I-V moyennes (Figure 3.16B). Puisque les courants potassiques sont diminués de façon significative et que ceux-ci dépendent des tubules T, la vérification des tubules T a été faite

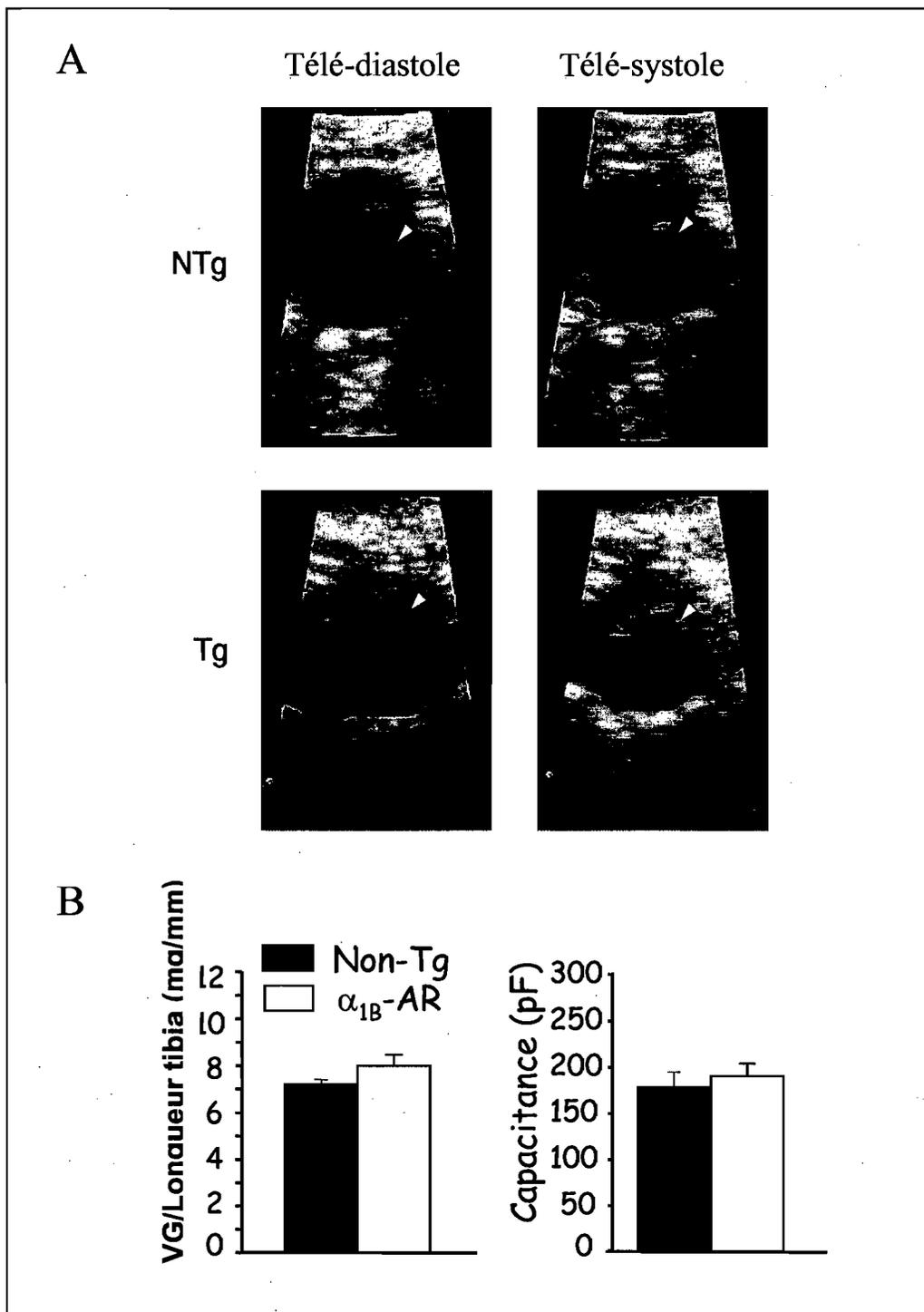


Figure 3.15 Phénotype pathologique cardiaque des souris α_{1B} -AR A) Échocardiographies représentative pour chaque groupe d'animal montrant une dilatation ventriculaire gauche.² B) Comparaison de la masse ventriculaire gauche et de la longueur du tibia ensuite de la capacitance cellulaire entre les groupes transgéniques et contrôle montrant qu'il n'y a pas d'hypertrophie. Données de Katy Rivard.

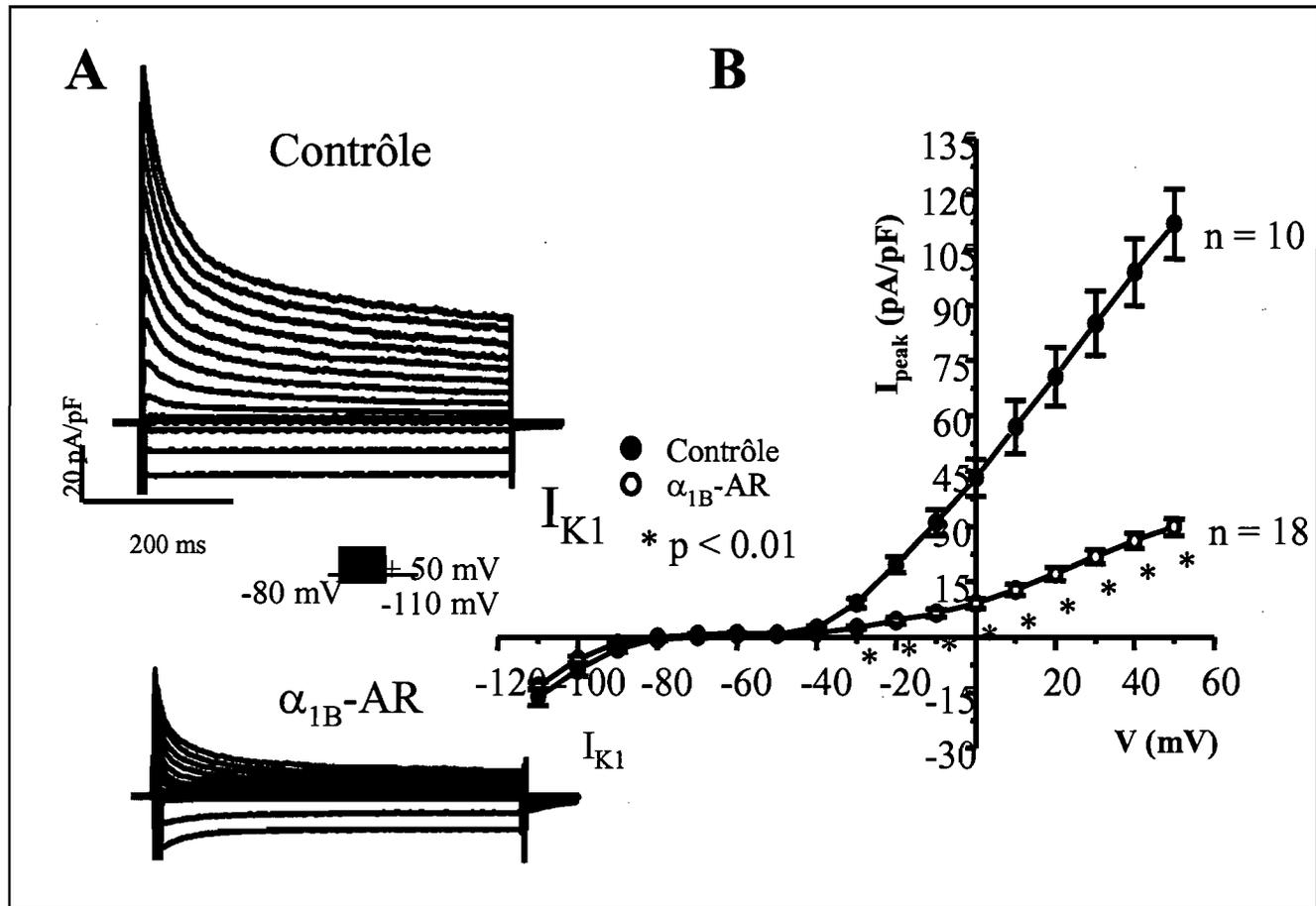


Figure 3.16 Comparaison de I_{peak} au niveau des myocytes ventriculaires de souris contrôles et de souris transgéniques surexprimant les récepteurs adrénergiques α_{1B} . **A)** Exemple typique de familles de courants K^+ en fonction du voltage appliqué, provenant de myocytes ventriculaires de souris contrôles et transgéniques. (fréquence de 0.1 Hz) **B)** Des courbes I-V moyennes pour le courant K^+ total (I_{peak}) mesuré pour l'ensemble des cellules dans les deux groupes présentés en A. Données acquises par Véronique Trépanier-Boulay

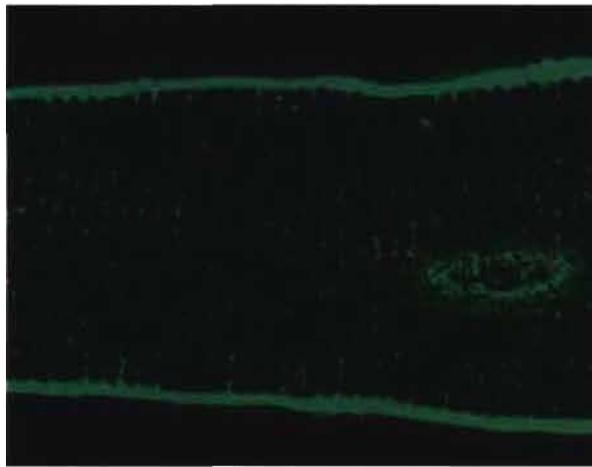
dans les deux types de souris. Mais aucune différence n'a été observée quand à la quantité de tubules T ou à la structure du réseau (résultats non montrés).

3.5.2 Le modèle infarctus par ligature de l'interventriculaire antérieure

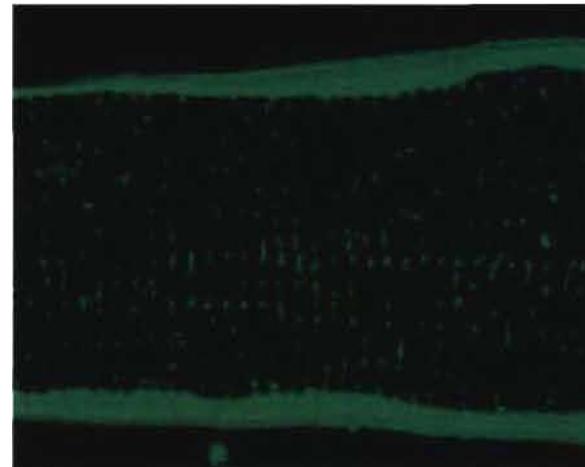
Louch et al, ont rapporté que quatre semaines après l'infarctus, une diminution et une désorganisation du réseau de tubules T étaient observables chez la souris. La même expérience a donc été tentée.³² Comme le montre la figure 3.17, il n'y a aucune différence dans le réseau de tubules T des souris ayant subi un infarctus par rapport aux souris contrôles. Que ce la soit pour la quantité de tubules ou l'organisation du réseau aucun changement n'a été observé dans nos expériences.

3.6 Autres réalisations pendant ma maîtrise

Outre les résultats présentés dans cette section, j'ai utilisé d'autres techniques dans ma maîtrise pour des vérifications de résultats ou pour aider certains collègues avec leurs projets. Plusieurs immunobuvardages de type Western ont été faits pour vérifier les anticorps, mais aussi pour valider les résultats obtenus auparavant sur les souris surexprimant le récepteur adrénergique α_{1B} . Des essais de quantification d'ARN par RNase protection assay ont aussi été faits pour ces mêmes souris. C'est donc une autre technique que j'ai apprise au cours de ma maîtrise. Ensuite, toujours pour les souris transgéniques α_{1B} -AR, des ECG sur cœurs isolés ont été réalisés, afin de revalider certaines données. Ma participation à ce projet m'a d'ailleurs valu une place comme co-auteur sur un article portant sur la caractérisation de la repolarisation cardiaque chez la souris surexprimant le récepteur adrénergique α_{1B} qui est présentement en évaluation dans la revue « The Journal of Physiology ».



Opéré sans ligature



4 semaines post-infarctus

Figure 3.17 Comparaison des tubules T entre les myocytes ventriculaires de souris ayant subi un infarctus et les contrôles. Un marquage à la WGA a été effectué sur des myocytes de souris ayant subi un infarctus par la ligature de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (à droite) et sur des souris opérées sans ligature (à gauche). Aucune différence significative n'est observable entre les deux groupes au niveau du réseau de tubules T.

4 Discussion et conclusion

4.1 Résumé des résultats

Jusqu'à maintenant, il a été démontré que les canaux fonctionnels dans les myocytes de ventricules adultes sont situés dans les tubules T ainsi que dans la membrane sarcolemmale. Cela a été démontré de plusieurs façons, premièrement par l'immunofluorescence. Des doubles marquages à la WGA couplé à un fluorophore et des anticorps contre les canaux potassiques fonctionnels ont montrés de la co-localisation entre les tubules T, représentée par le signal jaune observé dans les figures 3.6 à 3.10. De plus, le traitement au formamide, qui cause un bris des liens entre la membrane plasmique et les tubules T entraîne aussi une diminution de la densité des courants potassiques. Cela suggère, de façon indirecte que les canaux potassiques fonctionnels sont localisés dans les tubules T. Les canaux potassiques non-fonctionnels deviennent des points de comparaison intéressants. Puisque les canaux fonctionnels sont dans les tubules T, il est tentant d'extrapoler que les canaux non-fonctionnels ne devraient pas y être. KvLQT1, qui est un des canaux potassiques non-fonctionnels dans les myocytes de souris adultes, est localisé dans les tubules T comme le montre la figure 3.11. Cela peut paraître surprenant, mais pour être fonctionnel KvLQT1 nécessite la présence de sa sous-unité minK. Évidemment la localisation de minK a ensuite été évaluée. La figure 3.12 montre que minK n'est pas localisé dans les tubules T donc que KvLQT1 ne devrait pas générer un courant fonctionnel malgré sa présence dans les tubules T. Ensuite, le développement des courants potassiques a été évalué, puisque les cellules ventriculaires de souris nouveau-nées sont un autre modèle de cellules sans tubule T. Les densités de courants potassiques dans les myocytes ventriculaires de nouveau-nées avaient déjà été mesurées dans le laboratoire. Elles étaient plus faibles que les densités de courants potassiques chez les adultes. Suite aux résultats des densités, des potentiels d'action plus longs dans les cellules de souris nouveau-nées étaient attendus. Les résultats d'immunofluorescence corroborent ce qui a été obtenu en électrophysiologie. C'est-à-dire que le réseau de tubules T observé n'est pas formé, aucune strie n'est observée, de plus aucune co-localisation entre les tubules T et les canaux

potassiques fonctionnels n'est observée. Puisque certains groupes ont rapporté une modification des tubules T dans certaines pathologies, deux modèles d'insuffisance cardiaque ont été évalués. Dans le modèle de surexpression des récepteurs adrénérgiques α_{1B} , aucune modification au niveau des tubules T n'a été observée. Le même constat est fait pour le modèle d'infarctus causé par la ligature de coronaire.

4.2 Les canaux fonctionnels et les tubules T au niveau des ventricules de souris adultes

Comme il a été démontré dans la section précédente, les canaux potassiques fonctionnels sont localisés dans les tubules T des myocytes ventriculaires de souris adultes. Ce constat, malgré qu'il n'avait jamais été démontré, n'est pas surprenant. Notre laboratoire avait déjà montré que le canal Kir2.1 semblait localisé dans les tubules T et que cette localisation pourrait avoir un lien dans l'accumulation de potassium ainsi que la mesure d'un courant de queue.²⁵ Un autre groupe avait déjà démontré que le canal Kv4.2 est dans les tubules T au niveau du myocyte ventriculaire de rat adulte.²³ Puisque ce canal génère en partie le courant I_{to} qui est un courant fonctionnel dans les myocytes ventriculaires de rats adultes, il était plausible de penser que les canaux potassiques fonctionnels seraient localisés dans les tubules T au niveau des myocytes ventriculaires de souris. Mais les canaux potassiques ne sont pas les seules structures importantes qui sont localisées dans les tubules T. Le groupe de Orchard a démontré que les canaux calciques de type L, qui sont impliqués de façon majoritaire dans le couplage excitation-contraction, sont présents au niveau des tubules T.³³ En plus d'être présents, ils sont concentrés dans ce réseau de membranes spécialisées en regard à la membrane sarcolemmale. Les récepteurs à la ryanodine, qui sont les deuxièmes structures nécessaires à l'amorce du CICR, avec les canaux calciques de type L, sont localisés dans les réticulum sarcoplasmique jonctionnel, tout près des tubules T.³³ Les structures impliquées dans le transport du sodium tel l'échangeur sodium-calcium, l'échangeur $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ ainsi que les canaux sodiques voltage-

dépendant, sont aussi localisés dans les tubules T au niveau des myocytes ventriculaires de rats adultes.²⁸ Il semble donc que toutes les structures impliquées dans le potentiel d'action soient localisées dans les tubules T ou à grande proximité de ceux-ci. Il est donc logique de penser que cette structure est nécessaire pour que le potentiel d'action soit propagé de la façon la plus efficace possible. Pour des animaux comme les souris, qui ont des battements cardiaques dans les environs de 600 par minutes, les tubules T prennent beaucoup d'importance. Donc plus les battements cardiaques sont élevés plus les tubules T semblent importants. Cela pourrait être une des raisons pourquoi le rat et la souris, deux petits rongeurs donc les cœurs battent à des rythmes très élevés, possèdent un système de tubules T si développé par comparaison avec d'autres mammifères plus grand comme le porc et l'humain. Par contre, comme le montrent des changements possibles dans le réseau des tubules T lors de pathologies, cette structure membranaire spécialisée aurait aussi une importance non négligeable au niveau des myocytes qui battent à des rythmes moins élevés, comme ceux de l'humain.⁵⁷ Lorsque traité au formamide, les cellules de ventricules de souris adultes, perdent une grande partie de leur réseau de tubules T. Il a déjà été mentionné que cela provoque une diminution importante des courants potassiques. Si les courants potassiques diminuent, cela entraîne automatiquement l'allongement des potentiels d'action. Cette perte d'efficacité au niveau de la phase de repolarisation empêcherait la cellule de battre à des rythmes physiologiques pour qu'elle soit aux environs de 600 par minute. Ce changement n'affecte pas seulement la repolarisation, mais puisque beaucoup de structures sont dans les tubules T, toutes les phases du potentiel d'action sont touchées. C'est donc une modification de tout le couplage excitation-contraction qui est observée. En effet, la relâche de calcium, qui est habituellement synchrone dans le temps et l'espace de la cellule, débute à la surface de la cellule pour ensuite se propager vers le centre. Tandis que dans les myocytes ventriculaires de rats adultes traités au formamide une relâche de calcium asynchrone est observée. Cette libération transitoire de calcium dans le cytoplasme est plus petite et plus longue que celle enregistrée dans les myocytes contrôles, malgré que le contenu en calcium du réticulum sarcoplasmique soit identique.⁵⁸

Il semblerait que la détubulation ait aussi des effets sur les adaptations causées par le changement de rythme. Puisque l'échangeur sodium-calcium est localisé majoritairement dans les tubules T, et que celui-ci serait le principal facteur d'adaptation aux changements de rythme⁵⁸, la perte des tubules T cause une diminution de l'effet de l'échangeur sodium-calcium. En effet la fonction de l'échangeur sodium-calcium est d'échanger un ion sodium contre un ion calcium en suivant le gradient présent dans les cellules. Donc, plus la charge en sodium est importante plus les ions calciques pourront entrer dans la cellule. Ce changement de l'influx sodique en influx calcique provoquerait une charge en calcium plus importante dans la cellule, permettant la contraction lors de situation où l'influx calcique provenant des canaux calciques de type L n'est plus suffisant, entre autres lors de l'augmentation du rythme.⁵⁸

4.3 Les tubules T et le développement post-natal au niveau du ventricule de souris

Il était déjà connu que les tubules T ne sont pas formés dans les cellules ventriculaires de rats néonatales. Donc, les résultats de microspectrofluorimétrie confocal qui ne montrent aucune co-localisation entre les canaux potassiques et les tubules T ne sont pas surprenants. Par contre, une comparaison intéressante peut être faite entre les cellules de nouveau-nées, qui ne possèdent pas de tubules T et les cellules traitées au formamide, dont le réseau de tubules T a été remodelé pour se sceller à l'intérieur de la cellule suite au choc osmotique. Lorsque les courants potassiques des myocytes ventriculaires de souris de 1 jour sont mesurés, les amplitudes obtenues correspondent aux valeurs observées dans les cellules traitées au formamide. Il est donc possible de dire que le traitement au formamide ramène la cellule ventriculaire de souris adultes à un état qui était présent avant le développement du réseau de tubules T. Le groupe de Glen Tibbits travaille sur le développement du couplage excitation-contraction au niveau du myocyte ventriculaire de lapin.²⁷ Comme chez tous les autres mammifères, le couplage excitation-contraction du

myocyte ventriculaire de lapin adulte dépend majoritairement des canaux calciques de type L par le CICR.⁵⁹ Les canaux calciques de type L sont majoritairement situés dans les tubules T. Ils doivent co-localiser avec les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique jonctionnel pour former la dyade et les triades afin de provoquer le CICR et ainsi amorcer le couplage excitation-contraction. Mais il n'y a pas de tubules T au niveau des myocytes ventriculaires de lapins nouveau-nés. Plus encore, Sedarat *et al* ont montré qu'il n'y avait pas de co-localisation entre les canaux calciques de type L et les récepteurs à la ryanodine. Les myocytes ventriculaires de lapins nouveau-nés se contractent quand même. Alors comment font-ils pour y arriver s'ils n'ont pas tous les éléments du CICR? En fait l'influx calcique des cellules de lapins nouveau-nés dépendrait majoritairement du transport rétrograde de la part de l'échangeur sodium-calcium.⁶⁰ L'échangeur sodium-calcium va habituellement expulser du calcium du cytoplasme en faisant entrer du sodium. Lorsque les gradients se renversent, il peut faire entrer du calcium en expulsant du sodium. La cellule de nouveau-né est faite pour ce type de couplage excitation-contraction, puisque l'échangeur sodium-calcium est très abondant dans la membrane sarcolemmale et son activité est plus grande que celle de l'échangeur sodium-calcium adulte.²⁷ Alors ce pourrait-il que la cellule ayant subi une détubulation se tourne vers le mode de couplage excitation-contraction qu'elle utilisait avant le développement de son réseau de tubules T? C'est possible, puisque toutes les structures nécessaires au mode de couplage excitation-contraction qui était utilisé avant le développement des tubules T sont présentes dans la cellule adulte malgré que la densité de l'échangeur sodium-calcium soit beaucoup plus faible chez l'adulte. Mais qu'en ait-il de la repolarisation dans les cellules ayant subi un traitement au formamide, soit les cellules détubulées. Pourraient-elles revenir à des mécanismes néonataux? Dans le cas des canaux potassiques c'est moins probable. Il faut se rappeler que la repolarisation dans les myocytes ventriculaires de souris nouveau-nées ne dépendent pas des mêmes canaux potassiques, et que comme démontrés dans la partie résultat, le canal KvLQT1 ne co-localise pas avec sa sous-unité minK dans la cellule adulte que ce soit au niveau des tubules T ou de la membrane plasmique. Donc le courant I_{K_S} ne

peut pas redevenir fonctionnel suite à une détubulation à moins que la détubulation entraîne un changement au niveau des protéines afin que minK co-localise avec KvLQT1. Peut-être que I_{Kr} pourrait le redevenir, pour le savoir une vérification de hERG et de sa sous-unité accessoire (MIRP1) devraient être faite afin de vérifier s'il y a co-localisation entre ces deux structures. Ce qui est plus probable dans le cas du changement de la repolarisation suite à la détubulation, c'est que le myocyte se repolarise en utilisant seulement les canaux disponibles sur la membrane sarcolemmale. La perte de courant potassique enregistré suite à la détubulation correspond à un peu plus de 50% lors d'essais de patch-clamp fait dans notre laboratoire. Cette perte de courant potassique est plus importante que la perte de capacitance moyenne mesurée dans la littérature soit environ 25%.³³ Cette observation suggère que les courants potassiques restant, correspondent aux courants potassiques de la membrane plasmique. Cette différence entre la perte de capacitance et la perte de courant potassique suggère que, tout comme les canaux calciques de type L, les canaux potassiques pourraient être plus concentrés dans les tubules T que dans la membrane plasmique. Si cette différence de densité des canaux potassiques est réelle, les tubules T deviennent encore plus importants au niveau du potentiel d'action et du couplage excitation-contraction en conditions physiologiques. Cette différence pourrait même avoir un impact dans des conditions pathologiques où une perte, même partielle, de tubules T entraînerait une perte encore plus importante de canaux potassiques donc une modification plus importante du potentiel d'action et du couplage excitation-contraction.

4.4 Les tubules T dans les modèles pathologiques chez la souris

Deux groupes ont rapporté une perte de tubules T ou bien un changement de l'architecture du réseau de tubules T, dans deux modèles différents d'insuffisance cardiaque un induit par tachycardie et l'autre par infarctus suite à la ligature d'une coronaire.^{19, 32} La suite logique était donc de vérifier si dans le modèle d'insuffisance cardiaque, par surexpression du récepteur adrénergique α_{1B} , des changements au niveau des tubules T étaient observés. Ce modèle a été choisi puisqu'il représente une forme d'insuffisance

cardiaque sans hypertrophie. La rationnelle de la perte de tubules T dans l'insuffisance cardiaque était basée sur les observations de Fowler *et al.*⁵⁸ Dans leurs expériences, les conséquences de la détubulation sur le couplage excitation-contraction avaient été évaluées. Leurs conclusions sont que les transients calciques, enregistrés sur les myocytes ventriculaires de rats adultes traités au formamide, sont plus petits, durent plus longtemps et ne sont pas synchronisés à travers toute la cellule. En fait, ils commencent en bordure et finissent vers le centre, contrairement à ceux observés dans les cellules contrôles qui sont synchrones. Ces résultats peuvent ressembler à ce qui a été observé sur des myocytes de cœurs insuffisants. En effet, O'Rourke *et al.* sont arrivés aux mêmes conclusions sur un modèle de myocytes ventriculaires de chiens adultes devenus insuffisants suite à une tachycardie prolongée.⁶¹ Tandis qu'un autre groupe a observé que les transients de calciques étaient plus petits et disparaissaient moins rapidement dans les myocytes ventriculaires insuffisants que dans les contrôles chez l'humain.⁵⁶ Par contre, dans les deux derniers articles, aucune observation sur les tubules T n'avait été faite. He *et al.* ont démontré par la suite que les tubules T étaient affectés dans les myocytes ventriculaires de chiens insuffisants suite à une tachycardie.¹⁹ Tandis que pour les myocytes ventriculaires d'humains, les observations des tubules T avaient déjà été faites par Schaper *et al* en 1991. Par contre, leurs conclusions étaient totalement différentes de celles de He *et al.* Ils avaient observé une dilatation des tubules T ainsi qu'une prolifération de cette structure.⁵⁷ Tandis que nos observations, tel que décrites dans les résultats section 3.5, ne sont pas concluantes. En fait, aucune différence n'a été observé entre les myocytes ventriculaires de souris adultes surexprimant le récepteur adrénergique α_{1B} et les contrôles. Pourtant, lorsque les courants potassiques sont mesurés, une diminution est observée tout comme dans les cellules détubulées (Figure 3.16). Lemire *et al.* ont démontré que ce modèle provoque bien une insuffisance cardiaque avec dilatation de toutes les chambres cardiaques et une prolongation des potentiels d'action(voir figure3.15).² Nos résultats étaient surprenants puisque les autres groupes avaient rapporté des changements de tubules T dans l'insuffisance cardiaque. Ensuite, le modèle d'insuffisance cardiaque par induction

d'infarctus par ligation de l'interventriculaire antérieure utilisé par Louch *et al.*³² a été utilisé. Les résultats obtenus étaient les mêmes que dans le modèle précédent c'est-à-dire qu'ils n'observaient aucun changement quant à la morphologie des tubules T ou de la quantité de tubules T (Figure 3.17). Cela était encore plus surprenant puisque la même méthode avait été utilisée, les résultats attendus auraient du être semblables à ceux obtenus par leur groupe. Pour le modèle α_{1B} , peut être que l'explication se trouve dans le modèle d'insuffisance cardiaque. Le modèle α_{1B} provoque une insuffisance cardiaque sans hypertrophie contrairement aux deux autres modèles soit la tachycardie et la ligation des coronaires. Donc, les changements de tubules T pourraient découler non pas de l'insuffisance mais de l'hypertrophie. Quant à nos résultats dans le modèle de ligation des coronaires, peut être que nos traitements n'ont pas induit une vraie insuffisance cardiaque, si par exemple l'infarctus n'était pas assez important. Il faut mentionner aussi que les myocytes utilisés étaient différents puisque nous avons utilisés des myocytes de la paroi libre antérieure du ventricule gauche qui sont des myocytes faisant parti de l'épicaarde tandis que Louch *et al.* avaient utilisé des myocytes provenant du septum qui sont plutôt des myocytes de l'endocarde. Il est connu que les propriétés électrophysiologiques des cellules de l'épicaarde sont différentes de celles des cellules de l'endocarde.⁶ Par exemple Kv1.4 est présent dans l'endocarde mais pas dans l'épicaarde.⁶² Cela pourrait contribuer à expliquer les différences entre nos résultats et les leurs.

4.5 Perspectives futures

Ce projet a amené des ouvertures intéressantes par exemple l'implication possible de la perte de tubules T dans l'insuffisance cardiaque ainsi que la modification du couplage excitation-contraction dans les cellules traitées au formamide. D'autres expériences chez la souris devront être faites. Entre autres, il serait intéressant de traiter les cellules de nouveau-nées au formamide afin de voir les conséquences sur celles-ci, selon nos données il ne devrait y avoir aucun effet. Il pourrait aussi être pertinent d'ajouter d'autres moments du développement puisque seuls les états nouveau-nés et adultes ont été présentés ici.

Évidemment, les expériences en lien avec les ligatures de coronaire pour causer l'insuffisance cardiaque devraient être refaites en vérifiant si une insuffisance cardiaque est bien établie. Un autre modèle que celui utilisant la surexpression du récepteur adrénergique α_{1B} pourrait aussi être étudié. Par exemple, un modèle de surexpression du récepteur à l'angiotensine II de type I, qui provoque des conditions d'insuffisance semblable au modèle adrénergique, pourrait aider à vérifier si l'hypertrophie est nécessaire à la perte de tubules T puisque le modèle de surexpression du récepteur à l'Angiotensine II de type I provoque une insuffisance cardiaque accompagné d'une hypertrophie contrairement au modèle de surexpression du récepteur adrénergique α_{1B} . Ensuite, le même genre d'expériences pourrait être réalisé à nouveau mais sur d'autres modèles animaux tel le porc et le chien pour finalement le faire sur des cellules humaines.

4.6 Conclusion

En somme, ce projet de recherche nous a permis de mieux comprendre la repolarisation cardiaque des ventricules de souris. Il a été démontré que les canaux potassiques fonctionnels sont localisés au niveau des tubules T, ce qui n'avait jamais été fait jusqu'à présent dans les cellules cardiaques. Cette localisation semble avoir un rôle important à jouer dans leur fonction, comme indiqué par les résultats obtenus dans les essais au formamide qui provoque une détubulation de la cellule. Les courants mesurés dans les cellules ainsi traitées sont de plus faible amplitude, ce qui allonge le potentiel d'action, modifiant ainsi le couplage excitation-contraction. Le développement des tubules T a aussi été évalué, pour voir si les courants potassiques d'amplitude maximale étaient atteints lorsque les canaux potassiques fonctionnels co-localisaient avec les tubules T totalement développés. Finalement, des modèles d'insuffisance cardiaque ont été étudiés afin de voir l'impact de cette pathologie au niveau de l'architecture des tubules T. Aucune modification de cette structure de membrane spécialisée n'a été découverte à travers les expériences conduites. Nous avons montrés par ces expériences que les tubules T sont des structures très importantes pour le myocytes ventriculaires de souris puisqu'ils contribuent

à la contractilité cardiaque en condition physiologique de façon très importante particulièrement au niveau de la phase de repolarisation. Des modifications aux niveaux des tubules T entraîne des conséquences significatives dans le couplage excitation-contraction et en particulier sur la repolarisation et la relaxation. Les résultats que nous avons obtenus rejoignent bien ce qui avait déjà été publié surtout en ce qui a trait à la localisation des canaux potassiques dans les tubules T.

5 Bibliographie

- [1] Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C: Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *The Journal of physiology* 2004; 559:777-798.
- [2] Lemire I, Ducharme A, Tardif JC, Poulin F, Jones LR, Allen BG, Hebert TE, Rindt H: Cardiac-directed overexpression of wild-type alpha1B-adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy. *American journal of physiology* 2001; 281:H931-938.
- [3] Goldman Y, Morad M: Ionic membrane conductance during the time course of the cardiac action potential. *The Journal of physiology* 1977; 268:655-695.
- [4] Lilly LS, Harvard Medical School: *Pathophysiology of heart disease : a collaborative project of medical students and faculty*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, p. xiii, 445.
- [5] Bazett H: An analysis of the time relationship of electrocardiograms. *Heart* 1920; 7:353-380.
- [6] Goldberger AL: *Clinical electrocardiography : a simplified approach*. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006, p. x, 337.
- [7] Jackman WM, Friday KJ, Anderson JL, Aliot EM, Clark M, Lazzara R: The long QT syndromes: a critical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Progress in cardiovascular diseases* 1988; 31:115-172.
- [8] Dessertenne F: [Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 1966; 59:263-272.
- [9] Fabiato A: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* 1983; 245:C1-14.
- [10] Clark RB, Bouchard RA, Giles WR: Action potential duration modulates calcium influx, Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange, and intracellular calcium release in rat ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; 779:417-429.
- [11] Charuk JH, Howlett S, Michalak M: Subfractionation of cardiac sarcolemma with wheat-germ agglutinin. *The Biochemical journal* 1989; 264:885-892.
- [12] Guyton AC, Hall JE: *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, p. xxxv, 1116.

- [13] Bossen EH, Sommer JR: Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. *Tissue & cell* 1984; 16:173-178.
- [14] Bossen EH, Sommer JR, Waugh RA: Comparative stereology of the mouse and finch left ventricle. *Tissue & cell* 1978; 10:773-784.
- [15] Heinzl FR, Bito V, Volders PG, Antoons G, Mubagwa K, Sipido KR: Spatial and temporal inhomogeneities during Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in pig ventricular myocytes. *Circulation research* 2002; 91:1023-1030.
- [16] Soeller C, Cannell MB: Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circulation research* 1999; 84:266-275.
- [17] Haddock PS, Coetzee WA, Cho E, Porter L, Katoh H, Bers DM, Jafri MS, Artman M: Subcellular $[Ca^{2+}]_i$ gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circulation research* 1999; 85:415-427.
- [18] Forbes MS, van Neil EE: Membrane systems of guinea pig myocardium: ultrastructure and morphometric studies. *The Anatomical record* 1988; 222:362-379.
- [19] He J, Conklin MW, Foell JD, Wolff MR, Haworth RA, Coronado R, Kamp TJ: Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca^{2+} channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovascular research* 2001; 49:298-307.
- [20] Brette F, Orchard C: T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circulation research* 2003; 92:1182-1192.
- [21] Kirk MM, Izu LT, Chen-Izu Y, McCulle SL, Wier WG, Balke CW, Shorofsky SR: Role of the transverse-axial tubule system in generating calcium sparks and calcium transients in rat atrial myocytes. *The Journal of physiology* 2003; 547:441-451.
- [22] Huxley AF, Taylor RE: Local activation of striated muscle fibres. *The Journal of physiology* 1958; 144:426-441.
- [23] Takeuchi S, Takagishi Y, Yasui K, Murata Y, Toyama J, Kodama I: Voltage-gated K^{+} Channel, $Kv4.2$, localizes predominantly to the transverse-axial tubular system of the rat myocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000; 32:1361-1369.

- [24] Houser SR: Reduced abundance of transverse tubules and L-type calcium channels: another cause of defective contractility in failing ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 2001; 49:253-256.
- [25] Clark RB, Tremblay A, Melnyk P, Allen BG, Giles WR, Fiset C: T-tubule localization of the inward-rectifier K(+) channel in mouse ventricular myocytes: a role in K(+) accumulation. *The Journal of physiology* 2001; 537:979-992.
- [26] Evans AM, Cannell MB: The role of L-type Ca²⁺ current and Na⁺ current-stimulated Na/Ca exchange in triggering SR calcium release in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 1997; 35:294-302.
- [27] Sedarat F, Xu L, Moore ED, Tibbits GF: Colocalization of dihydropyridine and ryanodine receptors in neonate rabbit heart using confocal microscopy. *American journal of physiology* 2000; 279:H202-209.
- [28] Scriven DR, Dan P, Moore ED: Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal* 2000; 79:2682-2691.
- [29] Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ: Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflugers Arch* 1996; 431:814-827.
- [30] Christie G: Localization of K(+) channels in the tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance, IK(1) and IK(ATP) during culture and by delayed IK(1) response to barium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999; 31:2207-2213.
- [31] Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J: The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell and tissue research* 1998; 294:449-460.
- [32] Louch WE, Mork HK, Sexton J, Stromme TA, Laake P, Sjaastad I, Sejersted OM: T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *The Journal of physiology* 2006; 574:519-533.

- [33] Kawai M, Hussain M, Orchard CH: Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *The American journal of physiology* 1999; 277:H603-609.
- [34] Takagishi Y, Yasui K, Severs NJ, Murata Y: Species-specific difference in distribution of voltage-gated L-type Ca^{2+} channels of cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C1963-1969.
- [35] Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, Shrier A: Subcellular localization of the Na^+/H^+ exchanger NHE1 in rat myocardium. *The American journal of physiology* 1999; 276:H709-717.
- [36] McDonough AA, Zhang Y, Shin V, Frank JS: Subcellular distribution of sodium pump isoform subunits in mammalian cardiac myocytes. *The American journal of physiology* 1996; 270:C1221-1227.
- [37] Jones SA, Morton MJ, Hunter M, Boyett MR: Expression of TASK-1, a pH-sensitive twin-pore domain K^{+} channel, in rat myocytes. *American journal of physiology* 2002; 283:H181-185.
- [38] Puceat M, Korichneva I, Cassoly R, Vassort G: Identification of band 3-like proteins and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in isolated cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270:1315-1322.
- [39] Heiny JA, Vergara J: Optical signals from surface and T system membranes in skeletal muscle fibers. Experiments with the potentiometric dye NK2367. *The Journal of general physiology* 1982; 80:203-230.
- [40] Ashcroft FM, Heiny JA, Vergara J: Inward rectification in the transverse tubular system of frog skeletal muscle studied with potentiometric dyes. *The Journal of physiology* 1985; 359:269-291.
- [41] Shacklock PS, Wier WG, Balke CW: Local Ca^{2+} transients (Ca^{2+} sparks) originate at transverse tubules in rat heart cells. *The Journal of physiology* 1995; 487 (Pt 3):601-608.
- [42] Peters BP, Ebisu S, Goldstein IJ, Flashner M: Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 1979; 18:5505-5511.

- [43] Davey DF, Dulhunty AF, Fatkin D: Glycerol treatment in mammalian skeletal muscle. *The Journal of membrane biology* 1980; 53:223-233.
- [44] Brette F, Komukai K, Orchard CH: Validation of formamide as a detubulation agent in isolated rat cardiac cells. *American journal of physiology* 2002; 283:H1720-1728.
- [45] Fiset C, Clark RB, Shimoni Y, Giles WR: Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle. *The Journal of physiology* 1997; 500 (Pt 1):51-64.
- [46] Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM: Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circulation research* 1998; 83:560-567.
- [47] Fiset C, Clark RB, Larsen TS, Giles WR: A rapidly activating sustained K⁺ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *The Journal of physiology* 1997; 504 (Pt 3):557-563.
- [48] London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ, Logothetis DA, Nerbonne JM, Hill JA: Targeted replacement of KV1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of I(K,slow) and resistance to drug-induced qt prolongation. *Circulation research* 2001; 88:940-946.
- [49] Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL: The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *The Journal of physiology* 2001; 533:697-710.
- [50] Lomax AE, Kondo CS, Giles WR: Comparison of time- and voltage-dependent K⁺ currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *American journal of physiology* 2003; 285:H1837-1848.
- [51] Davies MP, An RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR, Kass RS: Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circulation research* 1996; 78:15-25.
- [52] Grandy SA, Trepanier-Boulay V, Fiset C: Postnatal Development has a Marked Effect on Ventricular Repolarization in Mice. *American journal of physiology* 2007.

- [53] Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK: Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *The Journal of general physiology* 1990; 96:195-215.
- [54] Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS, Duff HJ: Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circulation research* 1996; 79:79-85.
- [55] Forbes MS, Hawkey LA, Sperelakis N: The transverse-axial tubular system (TATS) of mouse myocardium: its morphology in the developing and adult animal. *The American journal of anatomy* 1984; 170:143-162.
- [56] Piacentino V, 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR: Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circulation research* 2003; 92:651-658.
- [57] Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N: Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991; 83:504-514.
- [58] Fowler MR, Dobson RS, Orchard CH, Harrison SM: Functional consequences of detubulation of isolated rat ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 2004; 62:529-537.
- [59] Fabiato A: Appraisal of the physiological relevance of two hypothesis for the mechanism of calcium release from the mammalian cardiac sarcoplasmic reticulum: calcium-induced release versus charge-coupled release. *Molecular and cellular biochemistry* 1989; 89:135-140.
- [60] Chen F, Mottino G, Klitzner TS, Philipson KD, Frank JS: Distribution of the Na⁺/Ca²⁺ exchange protein in developing rabbit myocytes. *The American journal of physiology* 1995; 268:C1126-1132.
- [61] O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E: Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circulation research* 1999; 84:562-570.

[62] Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM, Strauss HC: Distinct transient outward potassium current (I_{to}) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *The Journal of general physiology* 1999; 113:581-600.