



Rôle des fibres de Purkinje dans le substrat arythmogénique et la mort subite

Marine Martinez

► To cite this version:

Marine Martinez. Rôle des fibres de Purkinje dans le substrat arythmogénique et la mort subite. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0368 . tel-01948672

HAL Id: tel-01948672

<https://theses.hal.science/tel-01948672>

Submitted on 8 Dec 2018

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

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

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Rôle des fibres de Purkinje dans le substrat arythmogénique et la mort subite

Présentée par

Marine MARTINEZ

Sous la direction du Docteur Mélèze HOCINI

Soutenue le 7 décembre 2016

Membres du jury :

M. AMÉDÉE Thierry	Directeur de recherche, Université de Bordeaux	Président
M ^{me} MAUPOIL Véronique	Professeur, Université de Tours	Rapporteur
M. MAURY Philippe	Praticien hospitalier, CHU de Toulouse	Rapporteur
M. SALLÉ Laurent	Maître de conférences, Université de Caen	Examineur
M. BERNUS Olivier	Professeur, Université de Bordeaux	Examineur
M ^{me} HOCINI Mélèze	Maître de conférences Praticien hospitalier, CHU de Bordeaux	Directrice de thèse

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit, financés par l'ERC («European Research Council») dans le cadre du projet Symphony, ont été réalisés au Centre Cardio-Thoracique de Bordeaux (CRCTB), dans l'unité 1045 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) dirigée par le Professeur Roger Marthan, au sein du groupe 3 «Electrophysiologie cardiaque», sous la direction du Professeur Michel Haïssaguerre à L'Institut de RYthmologie et de modélisation Cardiaque (LIRYC).

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Roger Marthan et au Professeur Michel Haïssaguerre pour m'avoir permis de réaliser ce doctorat dans un cadre agréable au sein du LIRYC.

Ce travail de thèse a été effectué sous la supervision du Docteur Mélèze Hocini. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour la confiance qu'elle m'a accordée, son investissement dans la mise en place de ce projet ainsi que le suivi réalisé tout au long de ce travail.

Je remercie infiniment le Professeur Olivier Bernus pour l'accueil au sein de son équipe «Electrophysiologie tissulaire», pour l'encadrement et les connaissances scientifiques dont j'ai bénéficié tout au long de mon parcours. Je le remercie également pour sa confiance, sa patience, sa disponibilité, ses conseils et critiques avisés et plus particulièrement pour avoir orienté mon travail de recherche tout en me laissant une grande autonomie. Je le remercie aussi de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie respectueusement le Professeur Véronique Maupoil et le Docteur Philippe Maury qui m'ont fait l'honneur de juger ce manuscrit en acceptant d'en être les rapporteurs. J'associe à ces remerciements le Docteur Thierry Amédée et le Docteur Laurent Sallé pour avoir accepté de faire partie des membres du jury respectivement en tant que président et examinateur.

Je suis reconnaissante envers le Professeur Bruce Smaill et Prashanna Khwaounjoo pour m'avoir permis, dans le cadre d'un projet de collaboration internationale avec l'Université d'Auckland («Auckland Bioengineering Institute»), de me former sur la technique de clarification optique.

Je suis également très reconnaissante envers le Professeur Igor Efimov et Katherine Holzem, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire dans l'Université de Washington à Saint-Louis (« Department of Biomedical Engineering ») et permis d'acquérir la technique de microélectrode.

J'adresse bien évidemment un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe « Electrophysiologie tissulaire ».

Je remercie tout particulièrement le Docteur Richard Walton pour son investissement, sa disponibilité, son soutien et ses encouragements tout au long de ce projet. Je voudrais également le remercier pour avoir partagé ses connaissances scientifiques et sa passion pour la recherche. Merci aussi pour tous les bons moments passés en dehors du laboratoire : « c'était pas terrible » mais je pense me souvenir longtemps de « la danse de Rick ».

Je remercie chaleureusement le Docteur Caroline Pascarel-Auclerc, le Docteur Caroline Cros et le Docteur Fabien Brette pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail de recherche de par leur disponibilité, leur aide, leur soutien et surtout leurs précieux conseils. Je leur suis très reconnaissante pour tous les agréables moments partagés qui m'ont permis à la fois de découvrir leur expérience professionnelle et leur humour (« If it between ! »).

J'adresse également toute ma reconnaissance au Docteur Rokhaya Faye non seulement pour sa présence, son aide, ses encouragements et son soutien sans faille (sans mauvais jeu de mot) mais surtout pour sa bonne humeur et son humour qui m'ont permis d'avancer plus sereinement tout particulièrement durant la rédaction de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier Marion Constantin pour m'avoir formée, guidée et conseillée aux différentes techniques d'histologie. Je remercie Quentin Voglimacci-Stephanopoli pour son aide et son partage de connaissances lors des expériences de cartographie optique sur la fibrillation ventriculaire. J'en profite également pour remercier les membres du CIC-IT pour leur gentillesse et leurs conseils.

Je souhaite remercier vivement Delphine Vieillot et Virginie Loyer, pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur disponibilité pour la préparation des animaux indispensable à ce travail de thèse.

Merci également à l'ensemble des membres du LIRYC, aux équipes de recherche, administratives et informatiques, mais aussi à tous ceux que j'oublie et qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à ce projet de recherche.

De manière plus personnelle, j'aimerais adresser des remerciements à toute ma famille. Je souhaite dédier cette thèse à mes grands-parents, qui ont toujours cru en moi en m'apportant leur soutien tout au long de mes années d'études. J'adresse un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue, encouragée et suivie dans tout ce que j'ai entrepris tout en supportant mon mauvais caractère ! Je remercie ma sœur pour sa présence et son soutien inconditionnel à chaque étape, merci d'avoir été là tout simplement. Je souhaite également remercier Antoine pour m'avoir épaulée, soutenue et encouragée, mais aussi supportée durant cette longue aventure. Je n'oublie pas de remercier mes correcteurs notamment Maryse, Jean et Robin pour le temps qu'ils m'ont consacré. Merci à vous tous sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Résumé

Rôle des fibres de Purkinje dans le substrat arythmogénique et la mort subite

Les arythmies ventriculaires conduisant à la mort subite ont été précédemment associées à un type de cellules spécialisées, les fibres de Purkinje (FP). Elles font partie du système de conduction cardiaque, et possèdent un rôle majeur dans l'impulsion électrique et l'activation synchrone des ventricules. Néanmoins, elles peuvent être impliquées dans des phénomènes pro-arythmogéniques à l'origine de l'initiation ou du maintien de la fibrillation ventriculaire (FV) au sein de structures normales ou dans le cas d'un large spectre de maladies cardiaques.

Cependant, les caractéristiques électrophysiologiques et structurelles des FP et les mécanismes sous-jacents des arythmies liées au Purkinje restent inconnus. Le système Purkinje semblerait jouer un rôle important de substrat de l'arythmie en raison de son impact sur l'hétérogénéité transmurale de repolarisation.

Six études décrivant les propriétés électrophysiologiques et les propriétés macro/micro-structurelles de ventricules gauches de brebis et de ventricules gauches humains ont été développées en utilisant une combinaison de méthodes classiques et innovantes.

Les résultats ont permis de montrer que les FP, à travers leurs jonctions avec le myocarde, modulaient localement la durée du potentiel d'action et jouaient un rôle dans la dispersion de la repolarisation, révélant ainsi le rôle potentiel des FP dans le déclenchement et le maintien de la FV.

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement préventif de l'arythmie ventriculaire afin de lutter contre la mort subite d'origine cardiaque.

Mots clés : fibrillation ventriculaire, fibres de Purkinje, ventricule gauche de brebis et ventricule gauche humain, hétérogénéité de repolarisation, jonction Purkinje-muscle, substrat arythmique, cartographie optique, histologie.

Abstract

Role of Purkinje fibers in arrhythmogenic substrate and sudden death

Arrhythmias that lead to sudden death have previously been associated with a specialized cell type, the Purkinje fibers (PF). They form the cardiac conduction system, and have a major role in the electrical impulse and synchronous activation of the ventricles. However, they may be involved in pro-arrhythmic phenomena causing the initiation or maintenance of ventricular fibrillation (VF) in structurally normal and a broad spectrum of cardiac diseases.

Nevertheless, electrophysiological and structural characteristics of PF and mechanisms underlying Purkinje-related arrhythmias are poorly understood. It is hypothesized that the Purkinje system plays an important role as a substrate for arrhythmias due to, in part, its impact on transmural repolarization heterogeneity.

Here within are six studies describing electrophysiological and macro/micro structural properties of sheep and human left ventricles using a combination of conventional and innovative methods.

Results showed that PF, through junctions with the myocardium, locally modulated the action potential duration and played a role in the dispersion of repolarization. Therefore, revealing a potential role for PF in both, trigger and maintenance of VF.

This work opens new therapeutic perspectives in preventive treatment of ventricular arrhythmia to fight against sudden cardiac death.

Keywords: ventricular fibrillation, Purkinje fibers, left ventricle of sheep or human, heterogeneity of repolarization, Purkinje-muscle junctions, arrhythmic substrate, optical mapping, histology.

**L'Institut de RYthmologie et de modélisation Cardiaque - INSERM U 1045
Site Hôpital Xavier Arnozan - Avenue du Haut Lévêque - 33604 Pessac**

Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé.....	5
Table des matières	7
Abréviations	10
Introduction	14
1. Le cœur	14
1.1. Anatomie et fonction générale.....	14
1.2. Structure et fonction de la paroi cardiaque.....	15
1.3. Propriétés contractiles des cardiomyocytes.....	16
2. Activité électrique du cœur	18
2.1. Conduction de l'activité électrique et système cardionecteur	18
2.2. Potentiel d'action.....	20
2.3. Couplage excitation-contraction.....	22
2.4. Propagation du potentiel d'action.....	23
3. Les pathologies d'arythmies ventriculaires.....	25
3.1. Mécanismes à l'origine des arythmies	25
3.1.1. Les évènements déclencheurs	25
3.1.2. Les substrats arythmogéniques.....	27
3.1.3. Le facteur modulateur.....	30
3.2. Les arythmies ventriculaires.....	31
3.3. La mort subite cardiaque	32
4. Les fibres de Purkinje	33
4.1. Structure et fonction complexes	34
4.2. Electrophysiologie des cellules de Purkinje	36
4.3. Mécanismes pro-arythmogéniques.....	38
4.4. Rôle dans les arythmies ventriculaires	42
4.4.1. Déclenchement de l'arythmie	42
4.4.2. Maintien de l'arythmie	43
4.4.3. Thérapie clinique	44
5. Contexte et objectif du travail de recherche	46
Méthodes	49
1. Modèle animal.....	49
1.1. Préparation de l'animal	49
1.2. Prélèvement du cœur	49
1.3. Dissection du ventricule gauche.....	51
2. Technique de la cartographie optique.....	51
2.1. Principe de la technique	51
2.1.1. Principe de fluorescence.....	52
2.1.2. Mécanisme d'électrochromisme	53
2.1.3. Potentiels d'action optiques	53
2.2. Perfusion du ventricule gauche	54

2.3. Système de perfusion de Langendorff	54
2.3.1 Découplage de l'excitation-contraction	56
2.3.2 Sonde potentiométrique	56
2.4. Système d'imagerie	56
2.5. Protocole expérimental	58
2.6. Traitement des données	58
3. Technique de microélectrode.....	59
3.1. Principe de la technique	59
3.2. Système d'enregistrement	59
3.3. Protocole expérimental et traitement des données	61
4. Technique d'histologie	61
4.1. Principe de la technique	61
4.2. Fixation et inclusion en paraffine.....	61
4.3. Coupes microscopiques	63
4.4. Coloration au trichrome de Masson	63
4.5. Montage des lames	64
5. Technique de clarification optique.....	64
5.1. Principe de la technique	64
5.2. Fixation et marquage fluorescent	66
5.3. Clarification optique et acquisition des données	67
6. Cœurs humains	68
7. Analyse statistique.....	68
Résultats	72
1. Influence de la jonction Purkinje-muscle sur l'hétérogénéité transmurale de repolarisation	73
1.1. Contexte et objectif	73
1.2. Article 1 : Influence of the Purkinje-muscle junction on transmural repolarization heterogeneity	74
1.3. Conclusion.....	99
2. Influence de la séquence d'activation sur l'hétérogénéité transmurale de la durée du potentiel d'action dans le myocarde sain et ischémiq de brebis.....	100
2.1. Contexte et objectif	100
2.2. Article 2 : Influence of the activation sequence on the transmural action potential duration heterogeneity in the healthy and ischemic sheep myocardium	101
2.3. Conclusion.....	124
3. Implication des jonctions Purkinje-muscle lors de la fibrillation ventriculaire	125
3.1. Contexte et objectif	125
3.2. Résultats préliminaires	126
3.2.1. Localisation des jonctions Purkinje-muscle	126
3.2.2. Influence des jonctions Purkinje-muscle sur la fibrillation ventriculaire	127
3.2.3. Impact de l'ablation des jonctions Purkinje-muscle sur la fibrillation ventriculaire.....	129
3.2.4. Fibrillation ventriculaire avant et après ablation des jonctions Purkinje-muscle	132
3.2.5. Analyse de l'activité focale et des « rotors » de la fibrillation ventriculaire avant et après ablation	132
3.3. Discussion et conclusion	134

4. Structure compartimentée de la bande modératrice fournissant un substrat de macro-réentrée pour la tachycardie ventriculaire	135
4.1. Contexte et objectif	135
4.2. Article 3 : Compartmentalized structure of the moderator band provides a substrate for macroreentrant ventricular tachycardia	136
4.3. Résultats complémentaires	164
4.3.1. <i>Différence de structure entre le ventricule gauche de brebis et le ventricule gauche humain</i>	164
4.3.2. <i>Résultats préliminaires de la reconstruction en trois dimensions de la paroi libre du ventricule gauche de brebis et du ventricule gauche humain</i>	167
4.4. Conclusion	169
5. Modulation de l'hétérogénéité transmurale de la durée du potentiel d'action par la flécaïnide chez l'homme	170
5.1. Contexte et objectif	170
5.2. Résultats préliminaires	171
5.2.1. <i>Données cliniques des donneurs</i>	171
5.2.2. <i>Donneur n°1 : femme de 67 ans</i>	172
5.2.3. <i>Donneur n°2 : homme de 74 ans</i>	172
5.2.4. <i>Donneur n°3 : homme de 70 ans</i>	175
5.2.5. <i>Gradients transmuraux des trois donneurs</i>	175
5.3. Discussion et conclusion	176
6. Substrat électrophysiologique du syndrome de repolarisation précoce chez l'homme	177
6.1. Contexte et objectif	177
6.2. Résultats	178
6.2.1. <i>Données cliniques des donneurs</i>	178
6.2.2. <i>Différence d'expression des ARNs transmuraux</i>	179
6.2.3. <i>Facteurs de repolarisation précoce</i>	181
6.2.4. <i>Facteurs d'activation tardive</i>	182
6.2.5. <i>Absence de remodelage structurel</i>	183
6.3. Discussion et conclusion	186
7. Résultats en cours	187
7.1. Contexte et objectif	187
7.2. Résultats préliminaires	187
7.3. Conclusion	189
Discussion et perspectives	191
4.1. Résumé des travaux	191
4.2. Discussion	192
4.3. Limites et perspectives	195
4.4. Conclusion générale	198
Références bibliographiques	200
Annexes	207
Annexe 1 : Données supplémentaires de l'article 1	207
Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article 2	225
Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article 3	235

Abréviations

- A -

aA	après ablation
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
APD	durée de potentiel d'action
ARN	acide ribonucléique
AT	temps d'activation
ATPase	adénosine triphosphatase

- B -

BM	bande modératrice
Bpm	battements par minutes
BU	bloc unidirectionnel

- C -

CaCl₂	chlorure de calcium
Cav(L)	canaux calciques voltage-dépendants de type L
Cav(T)	canaux calciques voltage-dépendants de type T
CP	cellules de Purkinje
CTL	contrôle
CV	cellules ventriculaires
Cx	connexines

- D -

DAD	post-dépolarisation tardive
ΔF	changement de la fluorescence
$\Delta F/F_0$	changement d'intensité de la fluorescence normalisée
DS	donneur sain

- E -

EAD	post-dépolarisation précoce
ECG	électrocardiogramme
ERS	syndrome de repolarisation précoce

- F -

FD	fréquence dominante
FLECA	flécaïnide
FP	fibres de Purkinje
FV	fibrillation ventriculaire

- I -

I_{Na}	courant sodique entrant
I_{to}	courant potassique transitoire sortant
$I_{Ca(L)}$	courant calcique de type L entrant
I_K	courant potassique retardé sortant
I_{K1}	courant potassique à rectification entrante
I_f	courant funny
IP_3R	récepteurs à l'inositol triphosphate
IR	indice de régularité
IV	intraveineuse

- K -

KCl	chlorure de potassium
Kv	canaux potassiques voltage-dépendants

- L -

LA	activation tardive
-----------	--------------------

- M -

MgCl₂	chlorure de magnésium
-------------------------	-----------------------

- N -

NaCl	chlorure de sodium
NaHCO₃	bicarbonate de sodium
NaH₂PO₄	dihydrogénophosphate de sodium
NAV	nœud auriculo-ventriculaire
Nav	canaux sodiques voltage-dépendants
NS	nœud sinusal

- P -

PA	potentiel d'action
PAE	potentiel d'action électrique
PAO	potentiel d'action optique
PBS	tampon phosphate salin
PBST	tampon phosphate salin et 0,3 % de triton X-100
PM	potentiel membranaire
PMJ	jonction Purkinje-muscle

- R -

RyR₂	récepteurs à la ryanodine de type 2
RyR₃	récepteurs à la ryanodine de type 3
RS	réticulum sarcoplasmique

- S -

SCC	système de conduction cardiaque
SCD	mort subite cardiaque
SD	écart-type
SERCA	réticulum sarco/endoplasmique calcium-ATPase
SL	sarcolemme

- T -

Tubules T	tubules transverses
TV	tachycardie ventriculaire

- V -

VD	ventricule droit
V_F	amplitude normalisée de la dérivée maximale de la dépolarisation du potentiel d'action
VG	ventricule gauche
V_{max}	dépolarisation maximale du potentiel d'action

Introduction

Introduction

1. Le cœur

Le cœur est un organe musculaire creux qui permet la circulation du sang à travers l'ensemble de l'organisme afin d'assurer un apport permanent en oxygène, nutriments et hormones indispensables à la vie.

1.1. Anatomie et fonction générale

Le cœur se trouve dans la cage thoracique, derrière le sternum entre les poumons et au-dessus du diaphragme. Sa taille correspond à environ 1,5 fois la taille d'un poing et son poids est d'environ 250-300 g (Arnold 1899).

Le cœur est composé de quatre cavités, deux oreillettes dans sa partie supérieure et deux ventricules dans sa partie inférieure, respectivement séparés par des septums inter-auriculaire et inter-ventriculaire (figure 1).

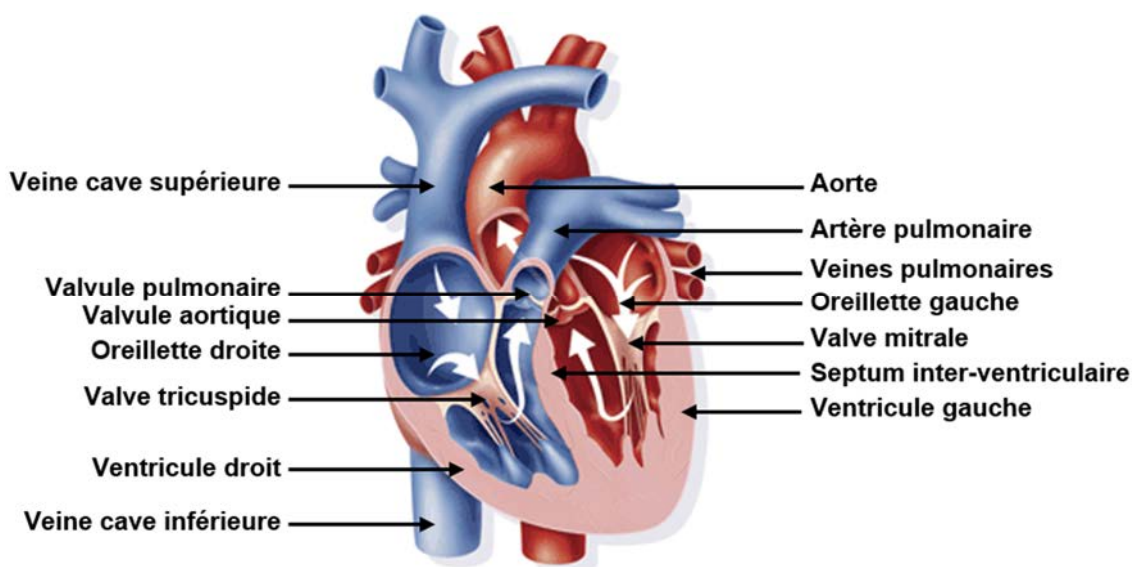


Figure 1 : Coupe transversale de la face antérieure du cœur avec la circulation systémique en rouge et la circulation pulmonaire en bleu. Le sens de la circulation est indiqué par les flèches.

Adapté de <http://recap-ide.blogspot.fr/2013/11/anatomie-cardio-vasculaire.html>.

La communication entre les oreillettes et les ventricules est également contrôlée par un système de valves : la valve mitrale qui se situe entre l'oreillette et le ventricule gauche, constituant le « cœur gauche », et la valve tricuspide qui sépare l'oreillette et le ventricule droit, formant le « cœur droit ». De plus, les communications du ventricule gauche avec l'aorte et du ventricule droit avec l'artère pulmonaire se font, respectivement, par les valvules aortique et pulmonaire (figure 1). Le rôle de ces valves et valvules est d'empêcher le reflux du sang pour lui permettre de circuler à sens unique dans le cœur (Bell 1811).

Le cœur fonctionne comme une pompe cardiovasculaire générant une phase de contraction, la systole, et une phase de relaxation, la diastole, permettant la circulation du sang dans tout l'organisme. Le cœur gauche est responsable de la circulation systémique, ou grande circulation, dont la fonction est de recueillir le sang riche en oxygène, sortant des poumons par les veines pulmonaires, et de le transporter à tous les organes du corps, par l'intermédiaire de l'aorte. La circulation pulmonaire ou petite circulation est assurée par le cœur droit dont le rôle est de recevoir le sang pauvre en oxygène de l'ensemble de l'organisme, entrant par les veines caves, et de l'amener au contact des alvéoles pulmonaires, par l'intermédiaire de l'artère pulmonaire (figure 1). Une fois ré-oxygéné, le sang retourne dans la circulation systémique.

La pression artérielle est nettement plus élevée dans la circulation systémique expliquant ainsi une plus grande épaisseur de la paroi libre du ventricule gauche comparée à celle du ventricule droit.

1.2. Structure et fonction de la paroi cardiaque

La paroi du cœur est composée de trois différentes couches : l'épicarde, le myocarde et l'endocarde (figure 2). L'épicarde, couche externe, est constitué d'un mésothélium et d'un tissu conjonctif. Il est au contact du liquide péricardique qui permet de diminuer les forces de frottement lors de la contraction cardiaque. Le myocarde, couche moyenne la plus épaisse, est essentiellement formé de cellules musculaires cardiaques, les cardiomyocytes, entourées d'un tissu conjonctif. Il s'agit de la partie active du cœur qui va permettre la contraction. L'endocarde, couche interne, est composé d'un endothélium reposant sur du tissu conjonctif. Il est au contact direct avec le sang et permet son passage à travers les cavités cardiaques avec peu de résistance.

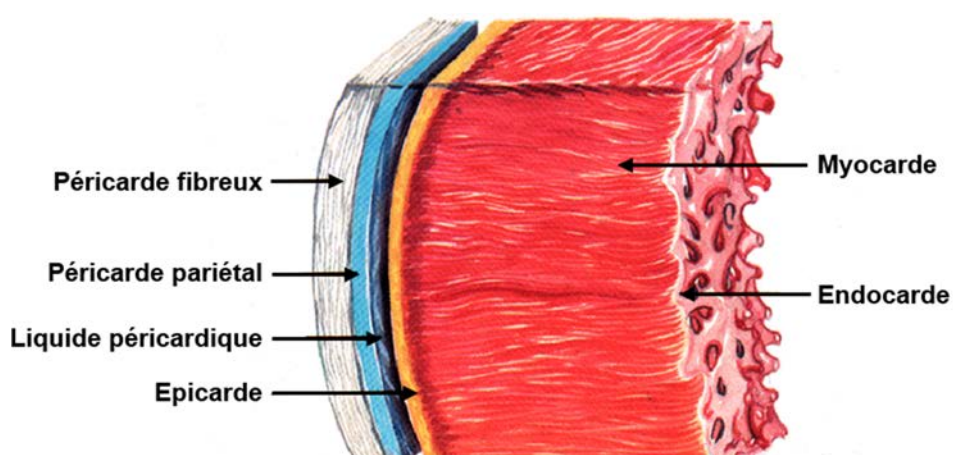


Figure 2 : Composition de la paroi du cœur.

Adapté de <http://biologyonline.us/Online%20A&P/AP%201/Northland/AP1lab/Lab%2010/63.htm>.

Un autre type de tissu est en relation avec la paroi du cœur, le tissu vasculaire. Essentiellement composé d'un endothélium, il constitue son propre réseau d'artères coronaires dont la fonction est d'alimenter le myocarde en oxygène et nutriments (Baroldi et al 1956).

1.3. Propriétés contractiles des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont des cellules rectangulaires mesurant environ 100-150 μm de long et 20-35 μm de large. Ces cellules forment des fibres musculaires en se liant les unes aux autres par l'intermédiaire des disques intercalaires. Ces disques sont composés de jonctions spécialisées, les desmosomes qui permettent de maintenir les cellules attachées durant la contraction et, les jonctions communicantes permettant le passage d'ions et de petites molécules. Les cardiomyocytes contiennent un ou deux noyaux en leur centre, de nombreuses mitochondries et surtout des myofibrilles (figure 3) (Forbes & Sperelakis 1985). Le sarcomère, segment entre deux bandes Z successives, est l'unité de base des myofibrilles, il est composé de protéines contractiles, l'actine et la myosine, organisées respectivement en filaments fin et épais (figure 3). L'agencement des filaments de myosine et d'actine est responsable de l'aspect strié du muscle cardiaque (Gordon et al 2000, Huxley 1969).

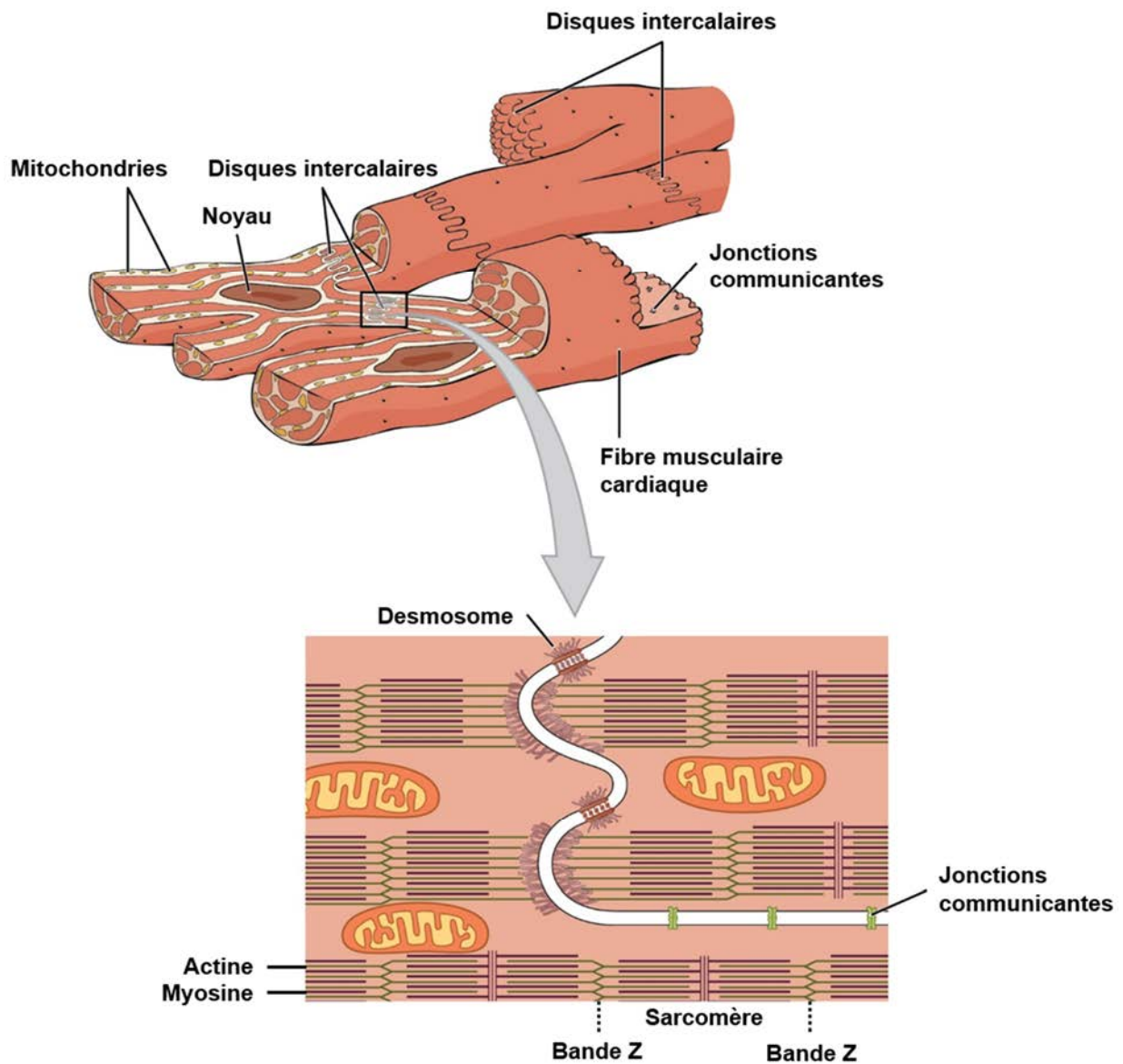


Figure 3 : Organisation du muscle cardiaque.

Adapté de <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/19-2-cardiac-muscle-and-electrical-activity/>.

Le glissement des filaments de myosine par rapport aux filaments d'actine entraîne le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction. Ce glissement est dépendant d'une augmentation de calcium intracellulaire (d'un facteur 50) qui va permettre de lever l'inhibition de la liaison actine-myosine en libérant les sites actifs de l'actine.

Plus précisément, le calcium va venir se lier à la troponine C de l'actine, générant un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine, ce qui va activer l'adénosine triphosphatase (ATPase) des têtes de myosine et permettre ainsi la libération d'énergie nécessaire au glissement de la myosine sur l'actine (figure 4) (Gordon et al 2000, Huxley 1969). Cette augmentation de calcium est dépendante de l'activité électrique du cœur.

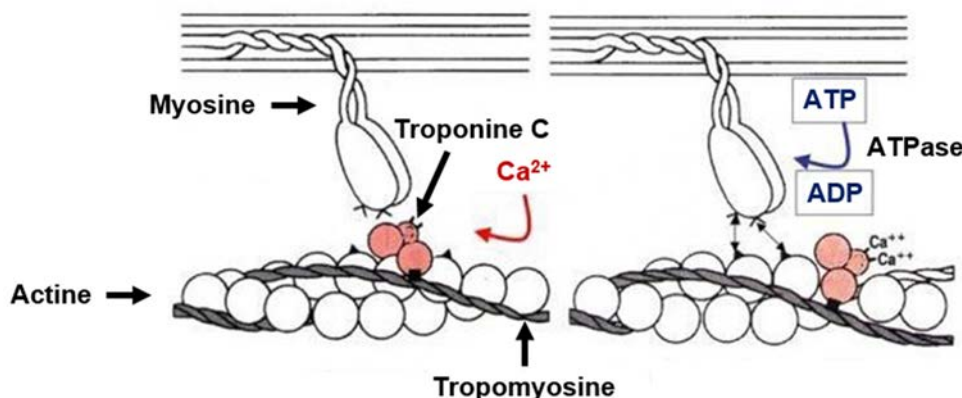


Figure 4 : Interaction entre les filaments d'actine et de myosine dépendante de la libération de calcium pour la contraction. Adapté de <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie--2008->.

2. Activité électrique du cœur

2.1. Conduction de l'activité électrique et système cardionecteur

Avant toute contraction cardiaque, le cœur génère un influx électrique qui va se propager selon un trajet précis afin d'avoir une contraction synchronisée.

L'onde électrique est initiée au sein du nœud sinusal (NS), situé dans la partie supérieure de l'oreillette droite, et se propage à l'ensemble des oreillettes avant de converger vers le nœud auriculo-ventriculaire (NAV), localisé dans le septum auriculo-ventriculaire et faisant le lien entre les oreillettes et les ventricules. L'activité électrique est ensuite conduite à l'apex des ventricules par le faisceau de His, situé dans le septum inter-ventriculaire, qui se sépare en deux branches, droite et gauche, avant de se diviser en un réseau très dense de fibres de Purkinje. Ces fibres insérées dans le myocarde ventriculaire transmettent l'onde électrique à l'ensemble des ventricules (figure 5) (Nerbonne & Kass 2005).

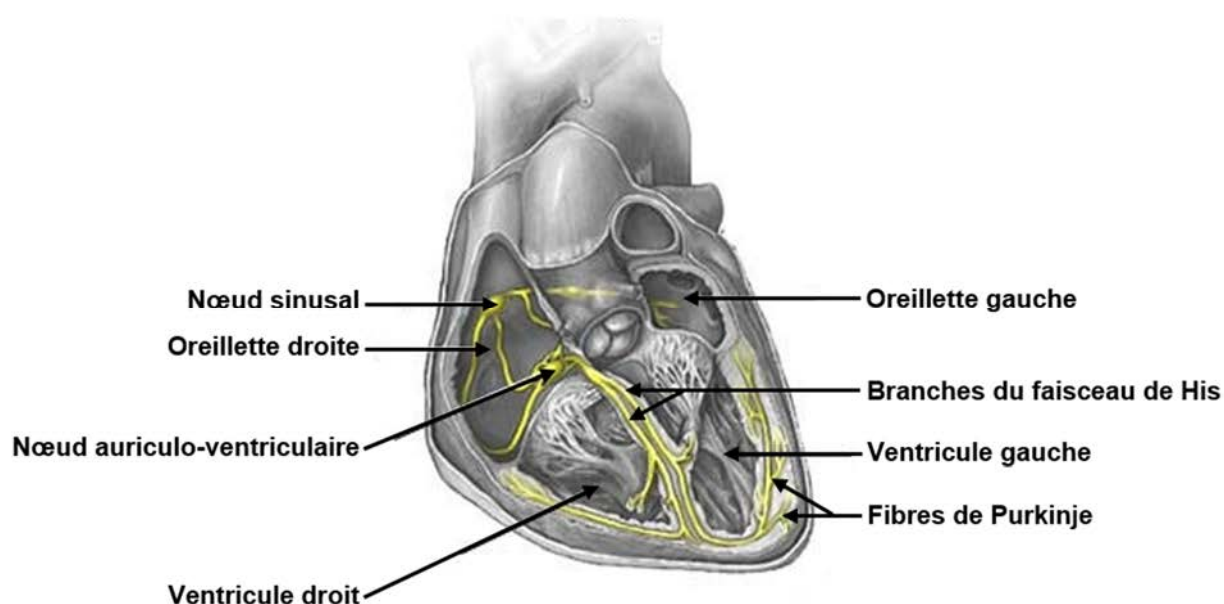


Figure 5 : *Système de conduction du cœur.*

Adapté de <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/18052.htm>.

Le système cardionecteur nécessaire à l'initiation et à la conduction de l'activité électrique est composé de cellules nodales (dans le NS, le NAV et le tronc du faisceau de His) et de cellules de Purkinje (dans les branches du faisceau de His et le réseau de Purkinje). Les cellules nodales organisées en amas et les cellules de Purkinje en ligne, sont riches en glycogène, elles contiennent un noyau central et un cytoplasme pauvre en myofibrille. Leur taille diffère de celle des cardiomyocytes, par exemple, les cellules de Purkinje possèdent un diamètre de 30-40 μm contre 15-25 μm pour les myocytes ventriculaires (Ter Keurs & Boyden 2007).

Ces cellules sont également responsables de la contraction rythmique du cœur grâce à leur capacité à générer spontanément l'activité électrique aussi appelé potentiel d'action. Le NS possède la fréquence intrinsèque la plus élevée (60-100 battements par minutes (bpm)) du système de conduction, lui donnant ainsi un rôle de pacemaker (Ter Keurs & Boyden 2007, Tse 2016).

2.2. Potentiel d'action

Le potentiel membranaire (PM) d'une cellule cardiaque est déterminé par l'ensemble des courants ioniques au travers de la membrane cellulaire. Les canaux ioniques, protéines transmembranaires à travers la membrane plasmique, sont responsables du passage des différents ions comme le sodium, le potassium, le calcium ou encore le chlore. Le PM peut être défini en deux états principaux : le potentiel de repos (PR) et le potentiel d'action (PA) qui alternent au cours du cycle cardiaque. Le PR correspond à un équilibre des courants ioniques et possède une valeur d'environ - 80 mV.

Le PA d'un cardiomyocyte ventriculaire se décompose en cinq phases successives. La phase 0 représente une phase rapide de dépolarisation (~ 1 ms) où le PM, suite à une activation externe, atteint le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants qui vont générer un courant entrant I_{Na} . La phase 1 est une phase de repolarisation précoce où les canaux sodiques vont être inactivés et les canaux potassiques voltage-dépendants vont être activés et produire un courant transitoire sortant I_{to} . La phase 2 correspond à une phase de plateau avec activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L ($Cav_{(L)}$) créant un courant entrant $I_{Ca(L)}$ qui va maintenir une phase de dépolarisation. La phase 3 correspond à la repolarisation terminale avec activation des canaux potassiques voltage-dépendants générant un courant retardé sortant I_K . La phase 4 correspond au PR avec activation des canaux potassiques à rectification entrante (responsable du courant entrant I_{K1}) pour un retour à un PM entre - 60 et - 90 mV. Pour les cardiomyocytes cette phase est stable contrairement aux cellules nodales qui vont présenter une phase lente de dépolarisation diastolique spontanée liée à l'activation d'un courant I_f (médié par des canaux HCN (activés par l'hyperpolarisation, modulés par les nucléotides cycliques et non sélectifs aux cations)) (figure 6 A) (Nerbonne & Kass 2005).

Contrairement aux cardiomyocytes ventriculaires, les PAs des cellules nodales ne présentent pas de phase 1 et 2 et leur phase 0 résulte de l'entrée de calcium ($I_{Ca(L)}$). Cela correspond à l'activité automatique de ces cellules pacemakers qui se traduit par le déclenchement d'un nouveau PA (Nerbonne & Kass 2005, Tse 2016) (figure 6 A). Les canaux calciques voltage-dépendants de type T ($Cav_{(T)}$) sont également présents dans les cellules nodales et participent avec le courant I_f à la phase de dépolarisation spontanée (Nerbonne & Kass 2005).

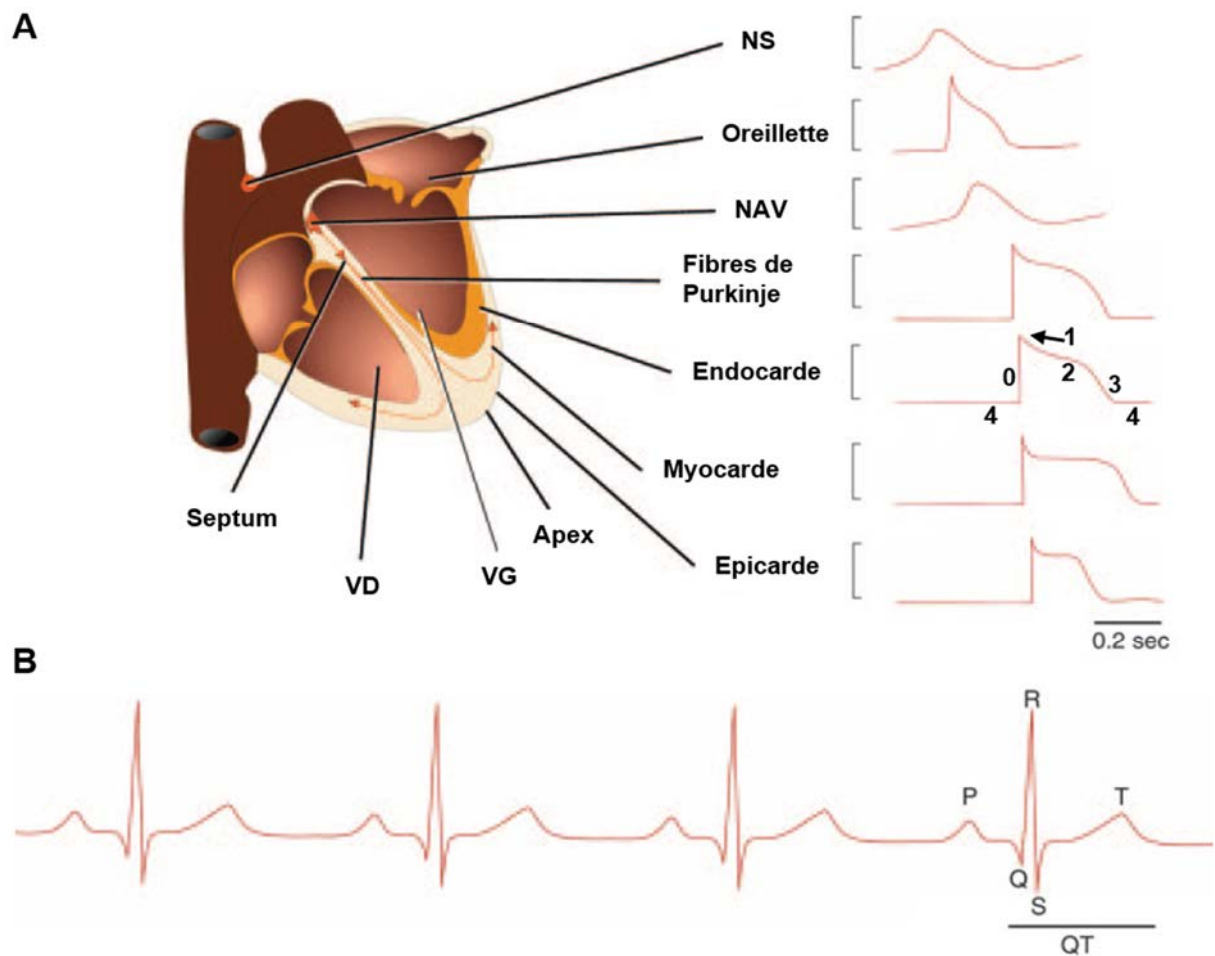


Figure 6 : A. Potentiels d'action dans les différentes régions du cœur. Les différentes phases du potentiel d'action sont numérotées de 0 à 4. VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche.

B. Electrocardiogramme de surface. D'après Nerbonne & Kass 2005.

La forme et la durée du PA varient en fonction des régions du cœur car l'expression des canaux ioniques y est différente (Nerbonne & Kass 2005) (figure 6 A).

LE TRACE ELECTROCARDIOGRAPHIQUE

La propagation de l'activité électrique au sein du cœur peut être enregistrée à l'aide d'un électrocardiogramme (ECG) qui utilise des électrodes placées à la surface de l'organisme. Le tracé électrocardiographique se décompose en différentes ondes et intervalles, qui sont caractéristiques de l'activité électrique des différentes régions du cœur (figure 6 B).

L'onde P correspond à la dépolarisation et la contraction des oreillettes (la repolarisation n'étant pas visible), l'intervalle PR représente le temps de conduction auriculo-ventriculaire plus précisément, la dépolarisation du NAV et du faisceau de His et ses branches. Le complexe QRS correspond à la dépolarisation et la contraction des ventricules, le segment ST représente la phase 2 de plateau du PA et, l'onde T correspond à la repolarisation et la relaxation des ventricules. L'intervalle QT (dépolarisation et repolarisation des ventricules) représente la durée moyenne du PA ventriculaire (figure 6 B). En clinique, l'ECG est utilisé dans le diagnostic des troubles du rythme cardiaque.

2.3. Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction cellulaire est initié en réponse à la propagation du PA le long des tubules transverses (tubules T) des cardiomyocytes. Les tubules T correspondent à des invaginations de la membrane plasmique ou sarcolemme des cellules cardiaques et permettent au PA de se propager rapidement à l'intérieur de la cellule. La propagation du PA entraîne une dépolarisation membranaire qui va activer les $\text{Cav}_{(L)}$ (phase 2 du potentiel d'action) et permettre ainsi l'influx de calcium extracellulaire à l'intérieur de la cellule (figure 7) (Kleber & Rudy 2004, Ter Keurs & Boyden 2007).

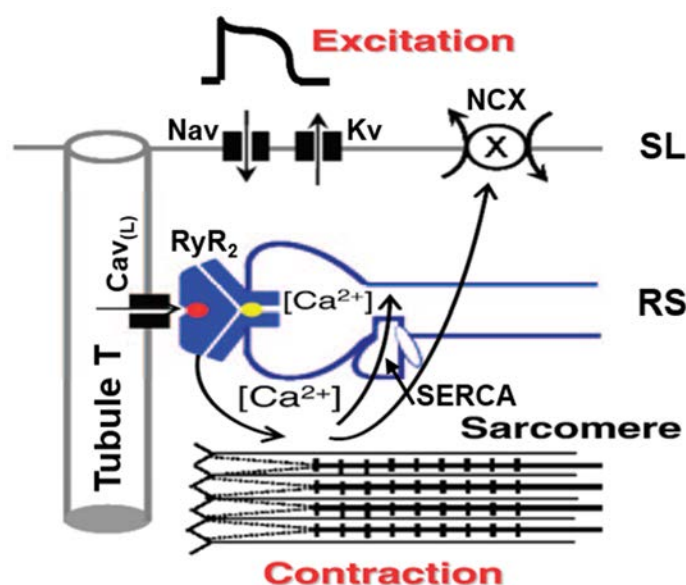


Figure 7 : Couplage excitation-contraction.

SL : sarcolemme. Adapté de Ter Keurs & Boyden 2007.

Cet influx entraîne la libération de calcium intracellulaire contenu sous forme de réserve dans le réticulum sarcoplasmique (RS), via l'activation de récepteurs à la ryanodine de type 2 (RyR₂). Il se produit alors une augmentation du calcium cytosolique, ce phénomène est connu sous le nom de « calcium-induced calcium release ». Le calcium ainsi libéré va permettre de lever l'inhibition de la liaison actine-myosine entraînant le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction (figure 7) (*Cf. Introduction 1.3*) (Kleber & Rudy 2004, Ter Keurs & Boyden 2007).

La relaxation se produit lorsque la concentration en calcium intracellulaire diminue. Cette diminution est générée en majorité via l'activation d'une pompe calcique SERCA (réticulum sarco/endoplasmique calcium-ATPase) qui va permettre la recapture du calcium du cytoplasme vers le RS. Le reste du calcium intracellulaire est extrudé de la cellule essentiellement par l'échangeur sodium/calcium (NCX) (figure 7) (Ter Keurs & Boyden 2007).

2.4. Propagation du potentiel d'action

L'activité électrique qui prend naissance dans les cellules pacemakers du NS va être transmise à l'ensemble du myocarde grâce aux jonctions communicantes des cellules cardiaques permettant le couplage des cellules entre elles. Ces jonctions communicantes ou encore appelées jonctions Gap sont composées de six protéines transmembranaires, les connexines, constituant le connexon et qui en s'associant aux connexines voisines vont former des pores à travers les membranes plasmiques afin d'assurer la continuité électrique entre les cellules (figure 8 A). La composition en connexines (Cx) est différente suivant la région cardiaque considérée, entraînant ainsi des différences de vitesse de propagation de l'activité électrique dans l'ensemble du cœur. Par exemple, les oreillettes (0,6 m/s) sont essentiellement composées de Cx40 et de Cx43, contrairement au NS (0,03 m/s) et au NAV (0,05 m/s) seulement composés de Cx45 (figure 8 B) (Desplantez et al 2007, Kleber & Rudy 2004, Severs 2000).

A l'échelle cellulaire la transmission du PA s'effectue de manière linéaire alors qu'au niveau tissulaire, les cellules possèdent deux types de conduction : longitudinale et transversale. Ces conductions résultent de la forme allongée des cellules qui leur confèrent une architecture anisotrope. Par ailleurs, la propagation de l'activité électrique s'effectue deux à trois fois plus vite dans le sens longitudinal que dans le sens transversal, car c'est aux extrémités des cellules que l'on retrouve préférentiellement localisées les jonctions Gap (Kleber & Rudy 2004).

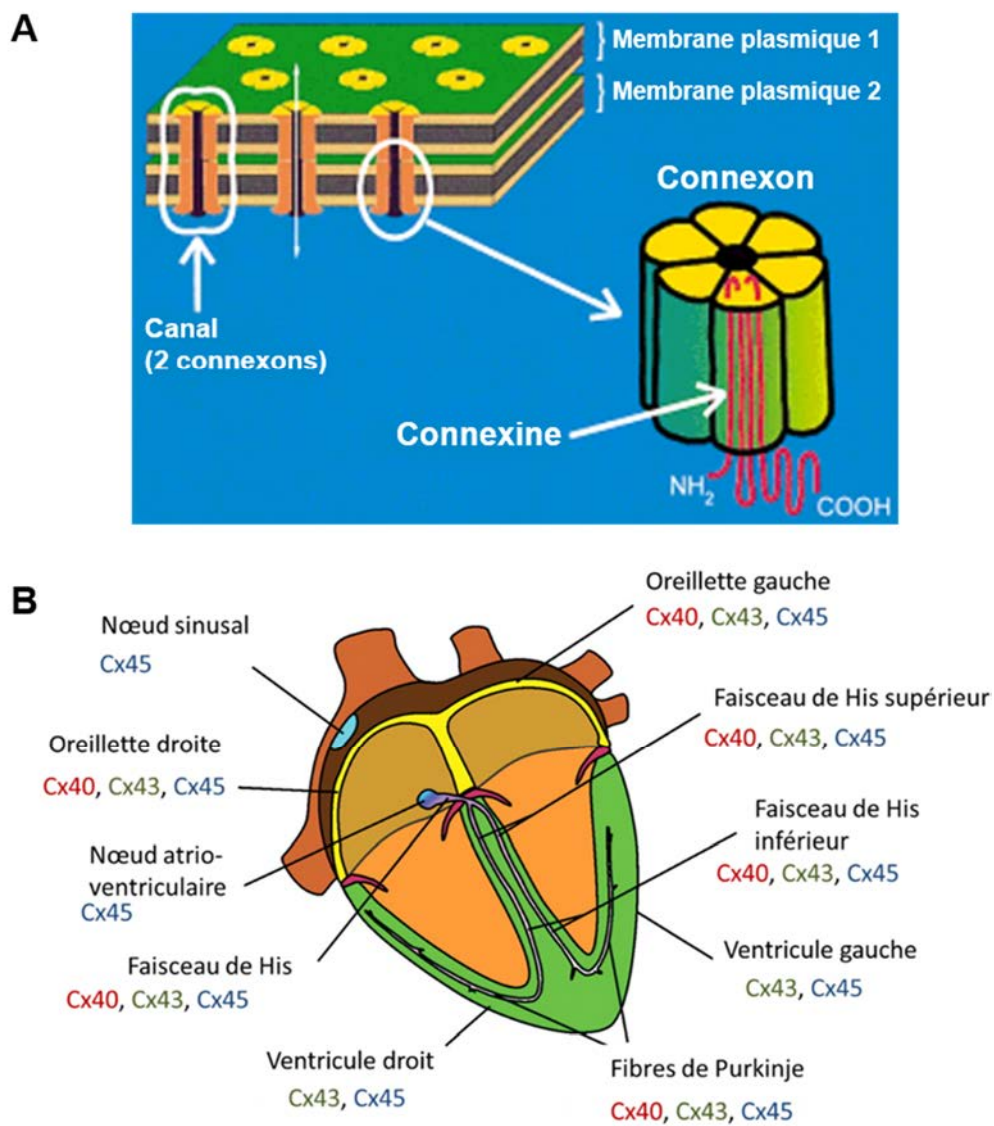


Figure 8 : A. Jonctions Gap au niveau d'un disque intercalaire. D'après Severs 2000.

B. Expression des connexines cardiaques. D'après Severs et al 2008.

3. Les pathologies d'arythmies ventriculaires

Notre étude ne concernant que les ventricules, seuls les troubles du rythme ventriculaire vont être détaillés.

3.1. Mécanismes à l'origine des arythmies

D'après le triangle de Coumel, il y a toujours trois principaux composants nécessaires pour la génération d'une arythmie : le facteur déclencheur, le substrat arythmogénique, et le facteur modulateur dont le plus commun est le système nerveux autonome (figure 9) (Farre & Wellens 2004).

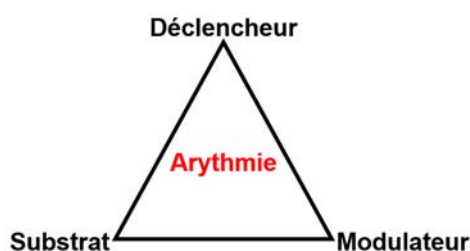


Figure 9 : Triangle de Coumel.

3.1.1. Les événements déclencheurs

L'AUTOMATISME ANORMAL

En condition normale, l'automatisme du cœur est généré par les cellules nodales du NS. Cependant, un dérèglement de l'activité spontanée de l'ensemble du réseau de conduction, à savoir, le NS, le NAV, le His et le Purkinje, peut survenir et être à l'origine d'un automatisme anormal pouvant induire l'émergence d'arythmies (figure 10). Ce dérèglement peut se produire en condition physiologique par le système sympathique mais également en condition pathologique comme l'ischémie. En effet, une réduction ou une augmentation des courants ioniques tels que le courant I_f ou le courant $I_{Ca(T)}$, peut avoir pour conséquence de venir moduler la pente de dépolarisation spontanée des cellules pacemakers et engendrer des changements de la fréquence cardiaque (Ter Keurs & Boyden 2007, Tse 2016).

LES POST-DEPOLARISATIONS PRECOCES ET TARDIVES

Les post-dépolarisations précoces (ou EADs pour « Early After Depolarisations ») et tardives (ou DADs pour « Delayed After Depolarisations ») dépendent du PA précédent pour leur génération et correspondent à des oscillations du PM. Les EADs sont générées durant le PA et correspondent à des oscillations du PM durant la phase 2 de plateau ou la phase 3 de repolarisation, tandis que, les DADs se produisent après la repolarisation du PA (figure 10).

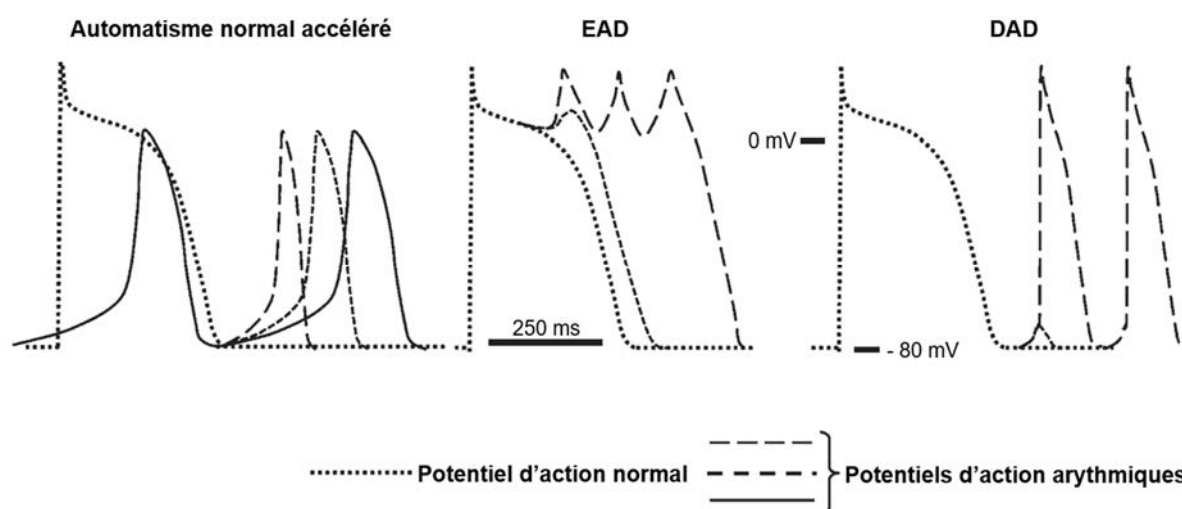


Figure 10 : Phénomènes déclencheurs de l'arythmie. D'après Schmitt et al 2014.

Les EADs sont observées lors de prolongement de la durée du PA et sont générées lors de fréquences de stimulation lentes. Les EADs correspondent à une re-dépolarisation de la membrane au lieu de la repolarisation attendue et sont principalement dues à une réactivation des $Cav(L)$.

Les DADs se déclenchent après repolarisation de la membrane et sont générées lors de fréquences de stimulations rapides. Les DADs correspondent à une surcharge calcique intracellulaire qui va entraîner l'extrusion de calcium et l'entrée d'un courant dépolarisant sodique (I_{ti}) par l'échangeur NCX (Ter Keurs & Boyden 2007, Tse 2016).

Pour qu'une arythmie persiste et soit soutenue, l'évènement déclencheur doit également initier l'auto-entretien de la propagation du PA arythmique. Un changement dans les propriétés de conduction du tissu cardiaque est donc une condition obligatoire pour qu'un tel évènement se produise, aussi connu sous le nom de substrat.

3.1.2. Les substrats arythmogéniques

LA REENTREE

La réentrée est caractérisée par le fait qu'une impulsion électrique ne s'éteint pas après une première activation complète, mais persiste et réactive le tissu cardiaque précédemment excité.

Deux substrats sont nécessaires à la réentrée : un bloc unidirectionnel (BU) de conduction et une zone de conduction suffisamment lente. Le BU correspond à un bloc de la conduction transitoire dans une direction, le long d'un groupe de fibres myocardiques. La présence d'un BU fonctionnel est liée à l'hétérogénéité des périodes réfractaires des fibres voisines (phase de repolarisation de la cellule au cours de laquelle la cellule ne peut pas réagir à une nouvelle stimulation) : certaines sont capables de conduire des dépolarisations prématurées alors que d'autres non. Prenons par exemple, dans un tissu normal la propagation des signaux électriques à vitesse égale le long de deux branches. Si ces deux branches sont connectées, les signaux vont rencontrer le tissu réfractaire dans la branche commune et ne progresseront pas (figure 11 A) (Kleber & Rudy 2004, Tse 2016).

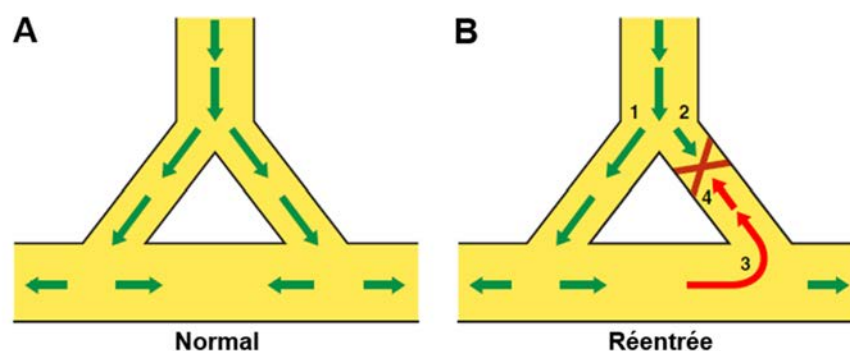


Figure 11 : Propagation du signal électrique en condition normale (A) et en condition de réentrée (B).

D'après Schmitt et al 2014.

Cependant, dans le cas d'un BU au sein de la branche 2, le signal ne peut se propager que dans la branche 1. Si la branche commune n'est pas réfractaire, le signal peut alors se propager de manière rétrograde au sein de la branche 2 et venir ré-exciter la branche 1 (figure 11 B). Il en résulte ainsi une conduction asymétrique en forme de boucle à travers laquelle la même activité électrique peut à nouveau se propager et ré-exciter les zones qu'elle vient juste de traverser (Kleber & Rudy 2004, Tse 2016).

Une condition supplémentaire pour l'apparition d'une réentrée est la présence d'une conduction lente. L'influx doit être suffisamment retardé pour permettre à des régions situées en aval de l'activation de récupérer leur excitabilité (Kleber & Rudy 2004, Tse 2016). Les périodes réfractaires courtes favorisent donc le phénomène et permettent des réentrées plus rapides.

La réentrée peut être unique et ne générer qu'un battement réciproque ou se pérenniser et déclencher ainsi une arythmie.

L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE REPOLARISATION

L'hétérogénéité électrique au sein du myocarde ventriculaire a été décrite dans plusieurs espèces animales et est considérée comme un facteur important des propriétés électriques intrinsèques du cœur (Antzelevitch et al 1991, Clark et al 1993, Fedida & Giles 1991). Les variations régionales de la durée du PA (ou APD pour « action potential duration ») sont peut-être la meilleure forme de caractérisation de l'hétérogénéité électrophysiologique dans le cœur. En effet, il a été démontré qu'il existait des différences d'APD au travers de l'épaisseur ventriculaire (Antzelevitch & Fish 2001, McIntosh et al 2000, Nabauer et al 1996). De telles variations de l'APD sont dues à une différence d'expression des canaux ioniques (Nerbonne & Kass 2005) et servent à coordonner le temps de repolarisation homogène du tissu afin de maintenir un fonctionnement normal du cœur.

Cependant, au niveau tissulaire cette hétérogénéité intrinsèque de l'APD peut être modulée par des interactions électrotoniques entre les cellules (Laurita et al 1996). En effet, chaque cellule peut être influencée par la charge électrotonique des cellules avoisinantes. De telle sorte que, les cellules qui vont se repolariser de manière plus tardive vont pouvoir générer un courant électrotonique entrant aux cellules voisines qui se repolarisent plus tôt.

Dans un tissu homogène, cela se traduit par un prolongement de l'APD au niveau des cellules activées en premier puis par une diminution graduelle de l'APD en s'éloignant du site de stimulation (figure 12) (Boukens et al 2015, Cherry & Fenton 2011, Myles et al 2010).

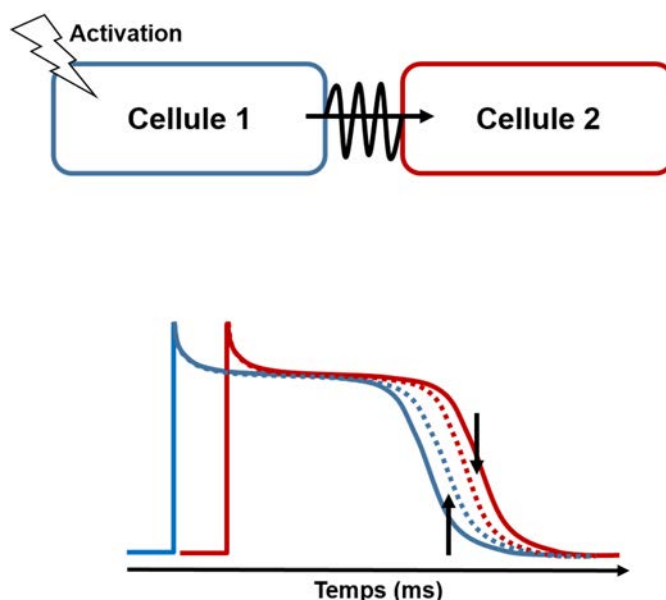


Figure 12 : Interactions électrotoniques entre les cellules modulant la durée du potentiel d'action au sein du tissu (traits en pointillés). Les traits pleins représentent le profil cellulaire intrinsèque.

De telles interactions électrotoniques peuvent conduire à une modulation aiguë des gradients d'APD, il a notamment été démontré que chez certaines espèces, les interactions électrotoniques pouvaient complètement masquer le gradient intrinsèque transmural de l'APD (Walton et al 2013). Ainsi, l'effet électrotonique est cardioprotecteur car il homogénéise la repolarisation et peut contribuer à une hétérogénéité normale de repolarisation. Cependant, lors de l'absence de cet effet, une activité anormale durant l'activation par le NS peut survenir et peut être à l'origine d'une hétérogénéité anormale de repolarisation. Cette dispersion de repolarisation peut être une source potentielle d'arythmogénèse (Glukhov et al 2010, Kuo et al 1983) pouvant servir de base pour un BU.

3.1.3. Le facteur modulateur

Le système nerveux autonome possède un rôle important dans le maintien de la performance cardiovasculaire car il régule la fréquence cardiaque (effet chronotrope), la force de contraction (effet inotrope), la vitesse de conduction (effet dromotrope) et l'excitabilité (effet bathmotrope) du cœur, et ce, via le système sympathique et le système parasympathique.

L'innervation du système sympathique trouve son origine le long des structures vasculaires de l'épicaire puis pénètre dans le myocarde sous-jacent proche des vaisseaux coronaires pour se terminer à l'endocarde. Il existe un gradient dans l'innervation sympathique entre les oreillettes et les ventricules et, de la base au sommet du cœur : les oreillettes sont plus densément innervées que les ventricules qui possèdent malgré tout un réseau sympathique, le plus important à la base (Vaseghi & Shivkumar 2008). Le système sympathique génère une stimulation excitatrice via ses récepteurs α et β (majoritairement β_1). Ses médiateurs sont la norépinéphrine et l'épinéphrine. La stimulation sympathique entraîne des effets chronotropes, inotropes, dromotropes et bathmotropes positifs via l'activation des Cav(L) augmentant le calcium cytosolique et via l'augmentation de la pente de dépolarisation diastolique des cellules pacemakers, pouvant donner naissance à des automatismes anormaux.

L'innervation du système parasympathique forme un plexus de nerfs à la base du cœur, connu sous le nom de plexus cardiaque. Après avoir croisé le NAV le long de la surface du cœur, les fibres parasympathiques plongent à travers la paroi ventriculaire dans l'endocarde avant de se terminer dans le myocarde. Les neurones parasympathiques sont distribués de manière plus hétérogène à travers le cœur que les neurones sympathiques. La densité de l'innervation parasympathique dans le NS et le NAV est considérablement plus élevée que dans le tissu auriculaire ou ventriculaire. L'innervation parasympathique du ventricule est rare, tandis que les fibres parasympathiques auriculaires se situent au niveau supérieur et postérieur de l'oreillette (Vaseghi & Shivkumar 2008). Le système parasympathique entraîne des effets chronotropes, inotropes, dromotropes et bathmotropes négatifs en tentant de s'opposer aux effets du système sympathique. Cependant, il reste sans effet en absence de stimulation sympathique. Son médiateur est l'acétylcholine et ses récepteurs sont muscariniques (M_2).

3.2. Les arythmies ventriculaires

Au sens le plus large, l'arythmie décrit tous les types de rythmes cardiaques anormaux allant de la simple palpitation transitoire aux fibrillations dévastatrices. Les arythmies ventriculaires se distinguent en trois groupes.

L'EXTRASYSTOLE VENTRICULAIRE

L'extrasystole ventriculaire est une contraction prématurée, ponctuelle et non entretenue de l'un des deux ventricules (figure 13). Elle est provoquée par une activation électrique ectopique naissant en-dessous de la bifurcation du faisceau de His, au niveau du myocarde ventriculaire ou du système His-Purkinje. Elle peut être bénigne, elle est reportée chez 27% des individus en bonne santé, ou pathologique et peut dégénérer en tachycardie ou fibrillation ventriculaire. Sa prévalence augmente avec l'âge et les maladies cardiaques (John et al 2012, Sadek & Marchlinski 2014).

LA TACHYCARDIE VENTRICULAIRE

La tachycardie ventriculaire (TV) correspond à un rythme cardiaque rapide supérieur à 100 bpm. Elle est, pour le plus souvent, la conséquence de certaines pathologies, telles que l'ischémie aiguë du myocarde, les cardiomyopathies ou encore les syndromes génétiques d'arythmie. La TV peut être monomorphe ou polymorphe selon la morphologie simple ou multiple du QRS (figure 13).

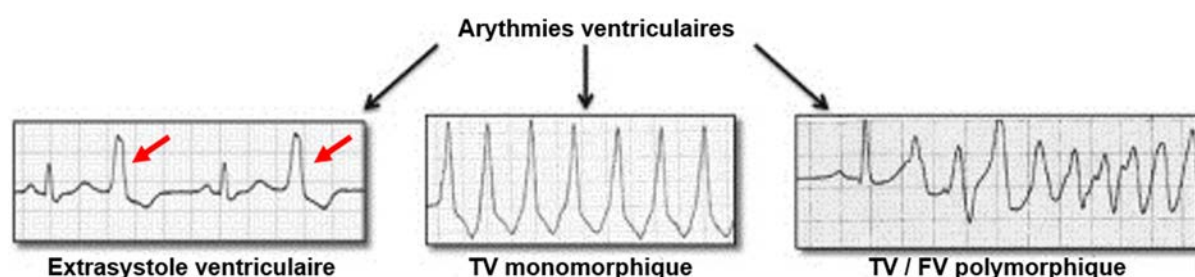


Figure 13 : Arythmies ventriculaires sur des tracés électrocardiographiques.
Les flèches rouges identifient l'extrasystole. D'après Sadek & Marchlinski 2014.

Les torsades de pointes sont une forme particulière de la TV, le plus souvent associées à un intervalle QT long. Elles sont caractérisées sur l'ECG, par des complexes ventriculaires rapides et polymorphes, tournant autour de la ligne de base (John et al 2012, Sadek & Marchlinski 2014). La TV peut également être soutenue ou non soutenue suivant sa durée. Au-delà de 30 secondes, elle est considérée comme soutenue, la contraction du ventricule devient alors désorganisée et inefficace, pouvant aboutir à une fibrillation ventriculaire avec un risque important de mort subite (John et al 2012, Sadek & Marchlinski 2014).

LA FIBRILLATION VENTRICULAIRE

La fibrillation ventriculaire (FV) est un évènement rare mais de plus grave conséquence car elle est mortelle au-delà de quelques minutes. Il s'agit d'un orage électrique qui va engendrer une contraction rapide, chaotique et désorganisée des ventricules (figure 13). Le cœur ne va plus être capable de pomper le sang à travers les ventricules, il s'en suit une chute rapide de la pression sanguine, accompagnée d'une perte de conscience immédiate pouvant mener à la mort de l'individu. La FV est le plus souvent la conséquence de pathologies cardiaques comme l'infarctus aigu du myocarde, l'hypertrophie du myocarde, l'insuffisance cardiaque ou encore les syndromes génétiques d'arythmie (Chan & Sy 2016, Sadek & Marchlinski 2014).

3.3. La mort subite cardiaque

La mort subite cardiaque (ou SCD pour « sudden cardiac death ») représente un problème majeur de santé publique, affectant environ 350 000 personnes en Europe et 350 000 personnes aux Etats-Unis chaque année. Son taux de mortalité représente environ 20% de la mortalité totale et est supérieur à celui du cancer du sein, du poumon et du colon-rectum réunis. Les décès par SCD sont liés aux maladies cardiovasculaires avec notamment une prévalence de plus de 50% pour les pathologies coronaires sachant que 50 à 85% de ces décès sont attribués à des troubles du rythme tels que la TV et la FV. Ce type de décès peut également survenir dans le cas de TV ou FV idiopathiques, à savoir, sans pathologie cardiaque connue (Marsman et al 2014, Tung & Albert 2013). Néanmoins, l'incidence de la SCD a légèrement diminué au cours de ces dix dernières années grâce à l'utilisation de médicaments anti-arythmiques et l'implantation de défibrillateurs cardiaques. Il est important de noter que la SCD constitue souvent le premier symptôme et que peu de patients y survivent, ce qui rend son étude très compliquée tout comme son dépistage.

Ainsi, l'étude des mécanismes sous-jacents à ces troubles du rythme représente un véritable enjeu pour l'identification des patients à risque et pour le développement de thérapies cliniques afin de lutter contre la SCD.

Ces arythmies conduisant à la SCD ont, par ailleurs, été précédemment associées aux fibres de Purkinje (Boyden et al 2010, Dosdall et al 2008, Haissaguerre et al 2002a, Scheinman 2009).

4. Les fibres de Purkinje

Johannes Evangelista Purkinje, un anatomiste et physiopathologiste tchèque, est le premier dans le milieu du XIX^{ème} siècle à avoir scrupuleusement décrit ces désormais bien connues fibres de Purkinje, qu'il a identifié tout d'abord comme des fibres cartilagineuses (Silverman et al 2006). Il faudra attendre soixante ans pour que le lien soit fait avec la fonction de conduction dans le cœur par Sunao Tawara, qui étudiait le NAV. Il a décrit le système de conduction cardiaque ressemblant à un arbre, avec des branches et des racines, qui se connectent au muscle ventriculaire par le biais de ramifications terminales (figure 14). Il a ainsi prouvé que les fibres de Purkinje étaient en réalité ces ramifications terminales (Boyden et al 2010, Scheinman 2009, Silverman et al 2006).

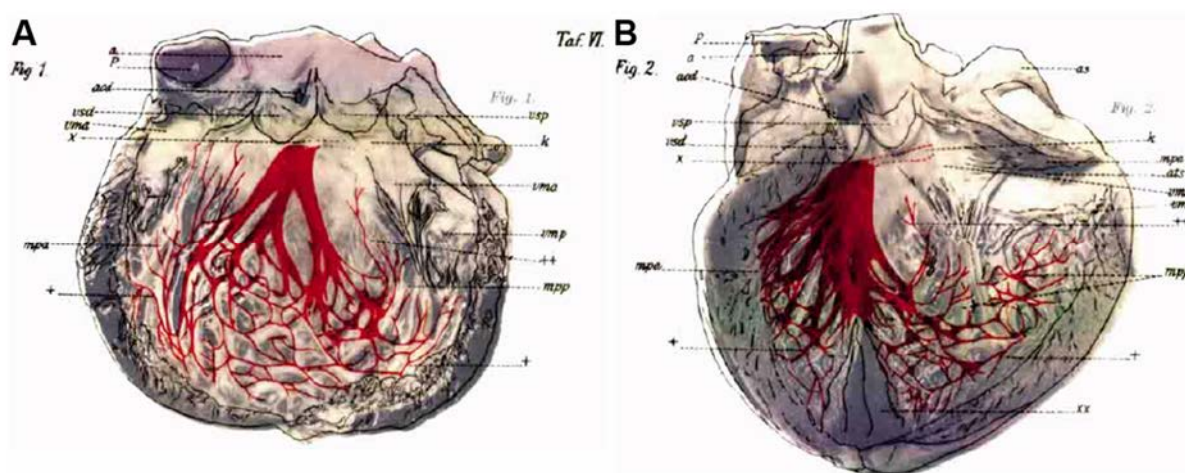


Figure 14 : Branches et ramifications terminales du système de conduction (en rouge) de l'endocarde du ventricule gauche (A) et du ventricule droit (B). D'après Tanaka et al 2005.

4.1. Structure et fonction complexes

Pour permettre la connexion des branches du faisceau de His avec le myocarde ventriculaire, les fibres de Purkinje vont ainsi former une arborisation distale. Ce système complexe représente 2% de la masse totale du ventricule. Il s'agit d'un réseau très vaste avec une architecture très variée en trois dimensions. Les fibres de Purkinje sont localisées au niveau sous endocardique mais également au sein de la cavité ventriculaire sous forme de fibres libres (ou « free-running ») en dehors du myocarde et au contact direct du sang. Par ailleurs, l'architecture du réseau de Purkinje varie selon les espèces, les fibres sont localisées essentiellement sous l'endocarde chez l'homme, le lapin et le chien alors que chez le mouton et le cochon elles traversent toute l'épaisseur du myocarde. Cependant, pour toutes les espèces les fibres de Purkinje possèdent un rôle vital dans la conduction de l'activité du NAV à l'ensemble du muscle ventriculaire (Ono et al 2009).

Au niveau cellulaire, les fibres de Purkinje correspondent à un long assemblage de cellules isolées des autres myocytes par du tissu conjonctif constitué de fibres de réticuline (figure 15).

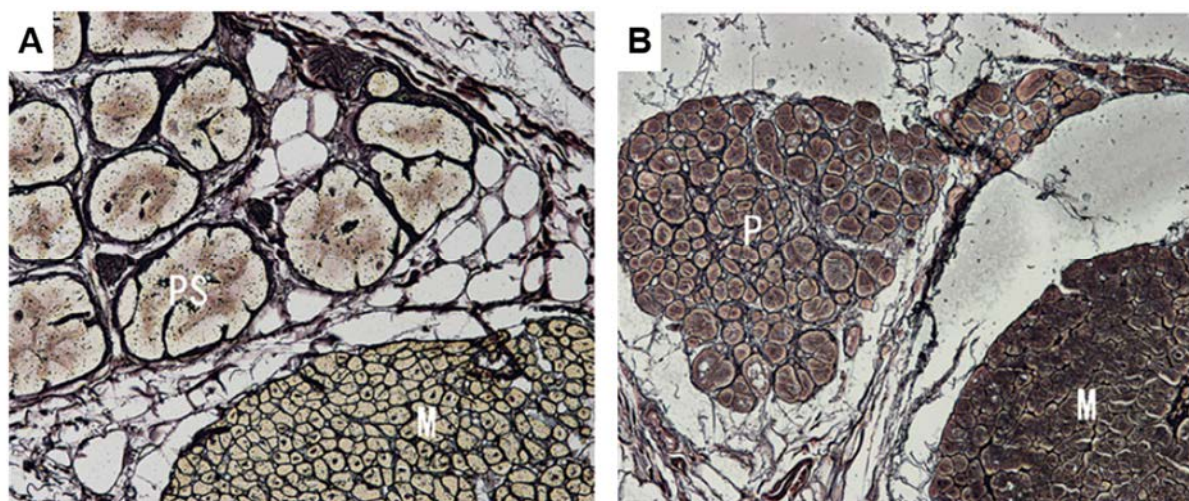


Figure 15 : Microphotographies à la lumière blanche de la région de l'endocarde ventriculaire chez le mouton (A) et l'homme (B) imprégnée dans de l'argent pour l'identification des fibres de réticuline. M : myocytes ventriculaires, PS ou P : cellules de Purkinje. D'après Ono et al 2009.

L'architecture de ces cellules diffère selon les espèces, elles sont de forme ovale et connectées entre elles sur leur longueur (disques intercalaires) et leur largeur chez le mouton et le cochon (figure 15 A) alors qu'elles sont de forme cylindrique et connectées seulement sur leur longueur chez l'homme et le chien (figure 15 B). Chez le mouton, les cellules de Purkinje sont plus larges que les myocytes ventriculaires alors que cela reste moins évident chez l'homme (figure 15) (Ono et al 2009). Par ailleurs, ces cellules possèdent des myofibrilles, reflétant leurs propriétés contractiles, mais en quantité plus faible que les myocytes ventriculaires. Les principales caractéristiques utilisées pour les différencier de ces derniers sont l'absence de tubules T (invagination du sarcolemme) permettant la propagation du PA jusqu'au cœur de la cellule, (Cf. *Introduction 2.3*) et une densité importante en glycogène leur permettant ainsi de résister à l'ischémie (Ono et al 2009, Tanaka et al 2005).

De nombreux marqueurs moléculaires ont été mis en évidence pour l'identification des cellules de Purkinje et plus généralement du système de conduction cardiaque (SCC) (figure 16).

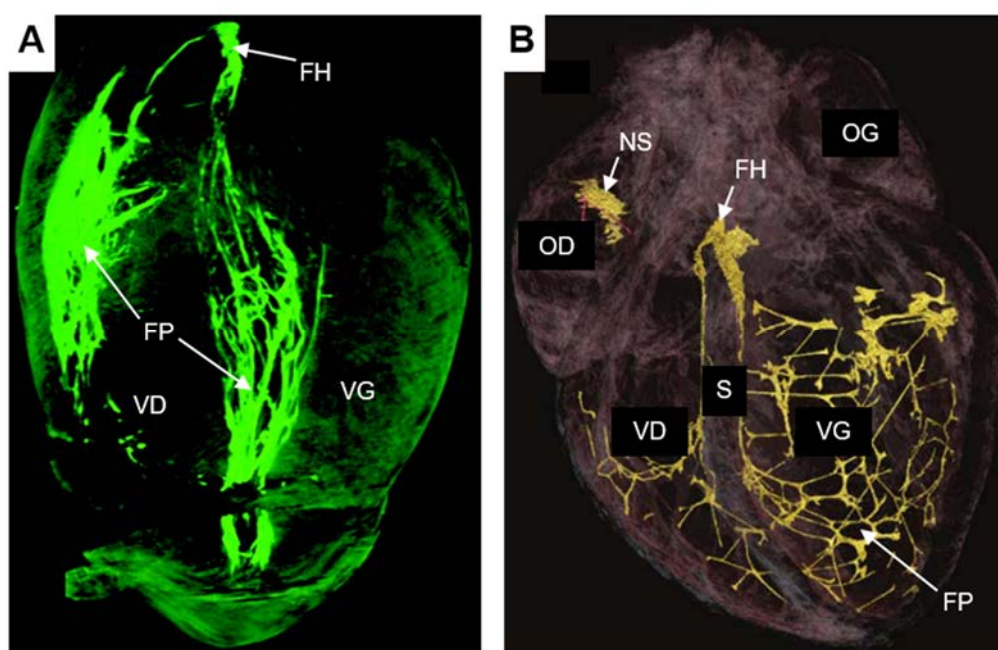


Figure 16 : Reconstitution tridimensionnelle du système de conduction. **A.** Tomographie à projection optique d'un cœur de souris. Adapté de Miquerol et al 2010. **B.** Microtomographie aux rayons X d'un cœur de lapin. D'après Stephenson et al 2012. FH : faisceau de His, FP : fibres de Purkinje, S : septum.

Notamment par la création de souris transgéniques à travers lesquelles l'ensemble du SCC ventriculaire peut être visualisé par immunomarquage de la connexine 40 couplée à l'activité d'un gène rapporteur à la GFP (protéine fluorescente verte) (figure 16 A) (Miquerol et al 2010). L'utilisation d'agents de contraste comme l'iodure de potassium (qui possède une forte affinité pour le glycogène des fibres de Purkinje) associée à la technique de microtomographie aux rayons X permet également de visualiser spécifiquement le SCC tout en préservant la structure anatomique du cœur (figure 16 B) (Stephenson et al 2012).

Cependant, l'étude des propriétés électriques des cellules de Purkinje constitue une meilleure distinction (Boyden et al 2010, Ono et al 2009, Scheinman 2009, Ter Keurs & Boyden 2007).

4.2. Electrophysiologie des cellules de Purkinje

La propagation du PA au sein des cellules de Purkinje est environ trois fois plus rapide que dans les myocytes ventriculaires (2,3 m/s contre 0,75 m/s), conférant ainsi au Purkinje ses propriétés de système cardionecteur. Cette différence de vitesse de conduction est due à une différence d'expression des connexines (Cx) au niveau des jonctions Gap. Contrairement aux myocytes ventriculaires, les cellules de Purkinje possèdent en plus de la Cx43, la Cx40 qui génère une plus grande conductance (Boyden et al 2010, Desplantez et al 2007, Scheinman 2009).

Le PA des cellules de Purkinje présente également des caractéristiques différentes du PA ventriculaire (figure 17).

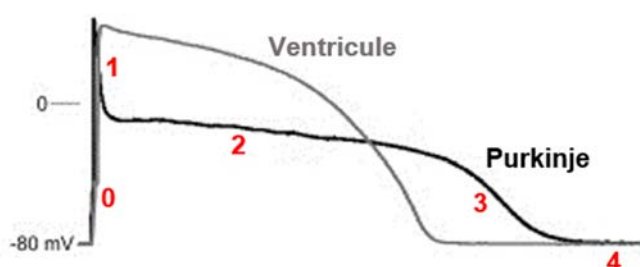


Figure 17 : Potentiels d'action d'une cellule de Purkinje et d'un myocyte ventriculaire chez le lapin.

Les différentes phases du potentiel d'action sont numérotées en rouge.

D'après Dumaine & Cordeiro 2007.

En effet, il possède une phase 0 de dépolarisation plus rapide, une phase 1 de repolarisation précoce plus prononcée, une phase 2 de plateau plus négative, une durée de PA bien plus longue ainsi qu'une amplitude de PA plus importante (figure 17). Cette différence de PA peut s'expliquer par une expression différente des canaux et courants ioniques entre ces deux types cellulaires. Les courants I_{Na} et I_{to} sont notamment plus importants chez les cellules de Purkinje que chez les myocytes ventriculaires, contrairement aux courants I_{K1} et $I_{Ca(L)}$ qui sont moins présents (Boyden et al 2010, Nerbonne & Kass 2005, Scheinman 2009).

Par ailleurs, la libération de calcium est différente chez les cellules de Purkinje. Ces dernières étant dépourvues de tubules T, le relargage de calcium ne se fait pas seulement par les RyR₂. Il a été démontré chez le chien que cette libération se fait par diffusion et qu'elle est gouvernée par un système à trois couches utilisant trois canaux différents sensibles au calcium (figure 18).

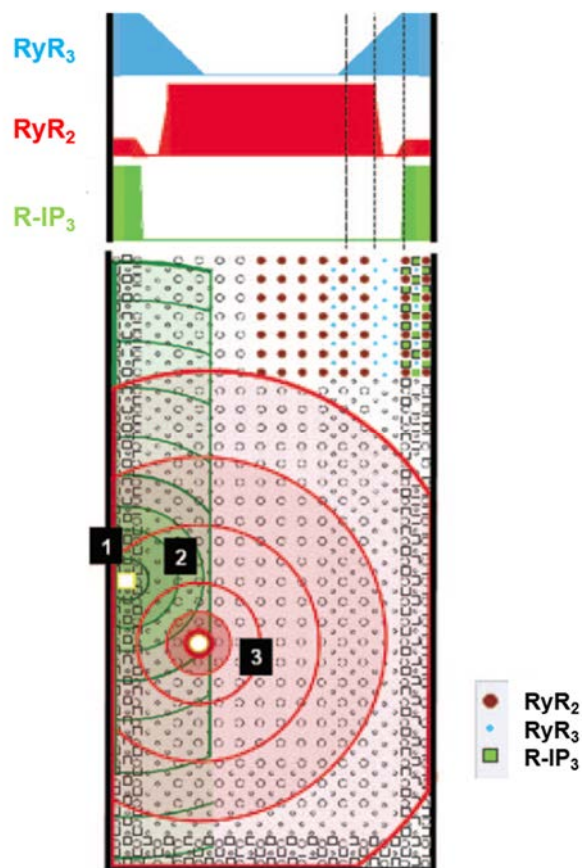


Figure 18 : Mécanisme de la libération du calcium chez une cellule de Purkinje de chien.

D'après Stuyvers et al 2005.

La première couche contient les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP₃R), elle est localisée directement sous le sarcolemme et chevauche la frontière extérieure de la seconde couche, elle-même composée de RyR₃ et plus éloignée du sarcolemme. Le centre de la cellule contient très peu d'IP₃R et pratiquement pas de RyR₃. La troisième couche de libération du calcium contient les RyR₂. La densité de RyR₂ est la plus élevée dans le centre de la cellule. La combinaison IP₃R-RyR₃ génère une libération locale de calcium (1) sous le sarcolemme qui va déclencher la libération de calcium par d'autres RyR₃ (2). Cette libération par les RyR₃ va se propager jusqu'aux RyR₂ puis va les activer. Les RyR₂ vont alors libérer une grande quantité de calcium activant à la fois les RyR₂, les RyR₃ et les IP₃R, générant ainsi une vague calcique à l'intérieur de la cellule (3) (figure 18) (Stuyvers et al 2005, Ter Keurs & Boyden 2007). Le mécanisme de propagation du PA chez les cellules de Purkinje rend donc ces cellules bien plus sensibles aux variations de calcium.

Ainsi, les différentes caractéristiques du PA ou encore les différents mécanismes de libération du calcium font que ces cellules peuvent être le lieu de phénomènes pro-arythmogéniques.

4.3. Mécanismes pro-arythmogéniques

Les fibres de Purkinje faisant partie du SCC, possèdent elles aussi un automatisme normal. Ce dernier étant supprimé par celui du NS car la pente de dépolarisation diastolique spontanée est plus faible chez les cellules de Purkinje. Cependant, ces cellules peuvent également présenter un automatisme anormal lié à un dysfonctionnement de la libération de calcium par le RS pouvant conduire à une surcharge calcique et générant une activité ectopique (Boyden et al 2010, Dobrzynski et al 2013, Ter Keurs & Boyden 2007).

Les post-dépolarisations précoces (EADs) et tardives (DADs) sont aussi très répandues chez les cellules de Purkinje. Cependant, les EADs se produisent plus souvent car elles sont plus facilement induites par des agents pharmacologiques qui prolongent la durée de leur PA, qui est déjà intrinsèquement long, ce qui permet la réactivation des Cav(L) (Deo et al 2010, Dobrzynski et al 2013, Ter Keurs & Boyden 2007). A l'inverse, les myocytes ventriculaires couplés aux cellules de Purkinje, possèdent un PA plus court et deviennent ré-excitables plus tôt. Ainsi, les cellules de Purkinje qui se trouvent toujours en phase de repolarisation sont susceptibles de développer des EADs qui peuvent se propager au muscle ventriculaire et déclencher des extrasystoles (Dobrzynski et al 2013).

Une synchronisation de plusieurs cellules de Purkinje présentant des EADs est nécessaire pour la génération d'arythmie à l'échelle de l'organe. Des études sur des souris transgéniques ont par ailleurs démontré que le système de Purkinje était une source importante d'arythmies focales dans la TV polymorphe catécholaminergique, suggérant ainsi, que le Purkinje pourrait être à l'origine des DADs générées par une surcharge calcique de RyR₂ défectueux lors de la stimulation adrénergique (Cerrone et al 2007).

Le système de Purkinje joue également un rôle dans la réentrée, il est essentiel à sa mise en place mais peut également conduire à la création de réentrées intra-myocardiques (Berenfeld & Jalife 1998).

LES JONCTIONS PURKINJE-MUSCLE

Les jonctions des fibres de Purkinje avec le myocarde ventriculaire (ou PMJs pour « Purkinje-muscle junctions ») ont été bien identifiées visuellement et électrophysiologiquement mais n'ont jamais pu être isolées. Il s'agit de cellules de transition possédant des propriétés électriques communes aux cellules de Purkinje et aux myocytes (figures 19).

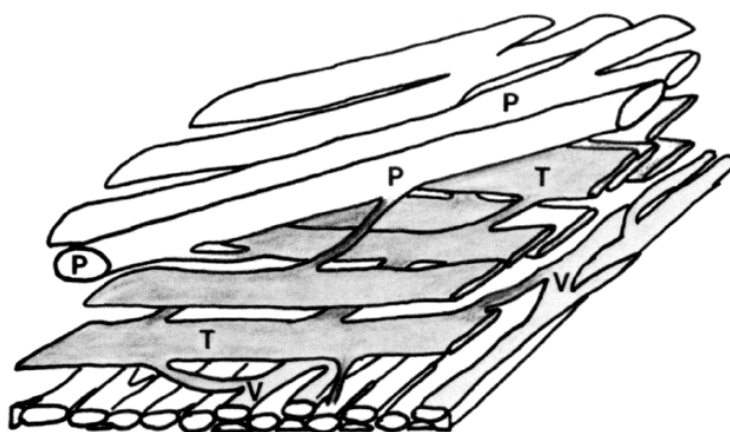


Figure 19 : *Jonction d'une fibre de Purkinje (P) avec le muscle ventriculaire (V) chez le lapin.*

T : cellules de transition. D'après Tr anum-Jensen et al 1991.

En histologie, ces cellules sont plus petites que les cellules de Purkinje et possèdent plus de glycogène que les cellules ventriculaires (Martinez-Palomo et al 1970, Tranum-Jensen et al 1991). Ces jonctions se situent au niveau de sites sous-endocardiques où il y a activation du ventricule avec un certain délai. Le rôle des PMJs est d'activer le myocarde ventriculaire tout en le protégeant d'une activation rétrograde (en sens inverse) grâce au PA long des cellules de Purkinje. Cependant, le délai de conduction compris entre 3 et 12 ms ne prévient pas parfaitement de la conduction rétrograde de durée plus courte de 1 ms (Tranum-Jensen et al 1991). Cette asymétrie de conduction couplée à une excitation exacerbée de la jonction peut donc générer des blocs unidirectionnels antérogrades permettant seulement la conduction rétrograde et prédisposant ainsi à la formation de réentrées (Myerburg et al 1972, Tranum-Jensen et al 1991).

Myerburg et al ont très bien décrit ce phénomène à travers un modèle théorique du mécanisme de déclenchement (figure 20).

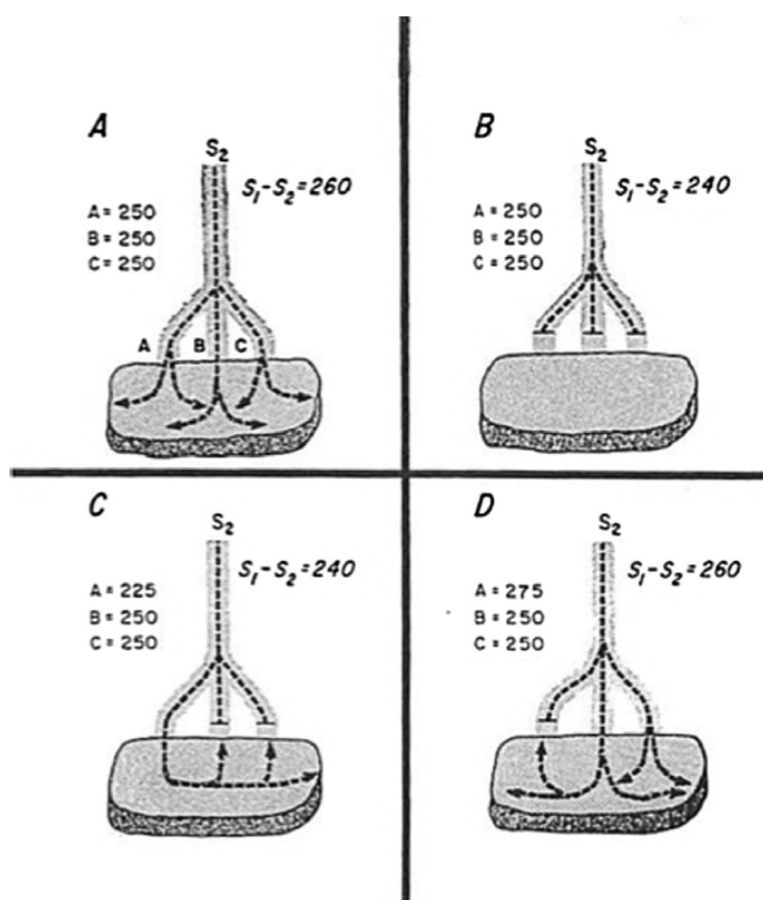


Figure 20 : Modèles théoriques de fonctionnement normal et anormal du mécanisme de déclenchement. D'après Myerburg et al 1970.

Trois fibres distales de Purkinje y sont représentées (notées A, B et C) et sont connectées au myocarde ventriculaire. Les lignes et flèches discontinues représentent la propagation d'une impulsion électrique prématurée à travers le système de conduction et le muscle. Au cours d'une situation normale où les jonctions des trois fibres possèdent la même période réfractaire de 250 ms, soit l'impulsion prématurée se produit après l'impulsion normale à 260 ms et toutes les jonctions peuvent conduire l'impulsion (A), soit l'impulsion prématurée se produit trop tôt durant les périodes réfractaires des jonctions et la conduction de l'impulsion ne peut se faire (B). Cependant, si les fibres B et C se trouvent dans leur période réfractaire durant l'impulsion à 240 ms, elles vont créer un bloc de la conduction (C) mais la fibre A qui possède une période réfractaire plus courte va pouvoir contourner ce bloc et venir dépolariser le myocarde. Enfin, il y a la situation où la fibre A se trouve dans une période réfractaire anormalement longue, l'empêchant d'être traversée par l'impulsion prématurée (D) (Myerburg et al 1970).

Myerburg et al ont également démontré une augmentation progressive de la durée du potentiel d'action (APD) du Purkinje jusqu'à la partie distale de la fibre avant de diminuer à nouveau dans les sites d'insertion avec le muscle (Myerburg et al 1970). Ce changement brutal d'APD peut s'expliquer par un chargement électrotonique de la masse ventriculaire. La fibre de Purkinje représente un câble de conduction en deux dimensions qui doit délivrer son courant dans le muscle ventriculaire qui est une structure en trois dimensions. Ainsi, au sein de la jonction, la résistance membranaire doit être suffisamment importante pour permettre l'activation du muscle ventriculaire (Scheinman 2009, Trandum-Jensen et al 1991). Cette différence d'APD au niveau de la jonction va augmenter l'hétérogénéité de repolarisation ce qui peut être suffisant dans certaines pathologies pour induire un bloc de conduction.

Par ailleurs, un découplage du myocarde peut se produire dans certaines maladies cardiaques telles que l'infarctus du myocarde ou l'ischémie. Ce découplage peut être à l'origine de la propagation de l'activation à travers des jonctions qui sont normalement quiescentes et peut alors venir générer des réentrées (Morley et al 2005).

4.4. Rôle dans les arythmies ventriculaires

4.4.1. Déclenchement de l'arythmie

Les premières études utilisant un modèle de tachycardie ventriculaire (TV) après un infarctus chez le chien, ont permis de démontrer que les fibres de Purkinje survivaient à une ischémie aiguë et se trouvaient impliquées à la fois dans le déclenchement et dans la réentrée de la TV (Friedman et al 1973, Scheinman 2009).

Les études cliniques ont également pu démontrer que l'origine des ectopies lors de la fibrillation ventriculaire (FV) provenait du réseau Purkinje et constituait un déclencheur important des arythmies ventriculaires chez l'homme et ce, dans un large spectre de pathologies cardiaques. La cartographie clinique est difficile en raison de la nature létale de ces arythmies. Cependant, un premier rapport par Haïssaguerre et al, a démontré que le battement d'initiation de la FV (ici de la torsade de pointe) était identique aux battements précédents prématurés provenant du réseau de Purkinje du ventricule droit ou du ventricule gauche (figure 21).

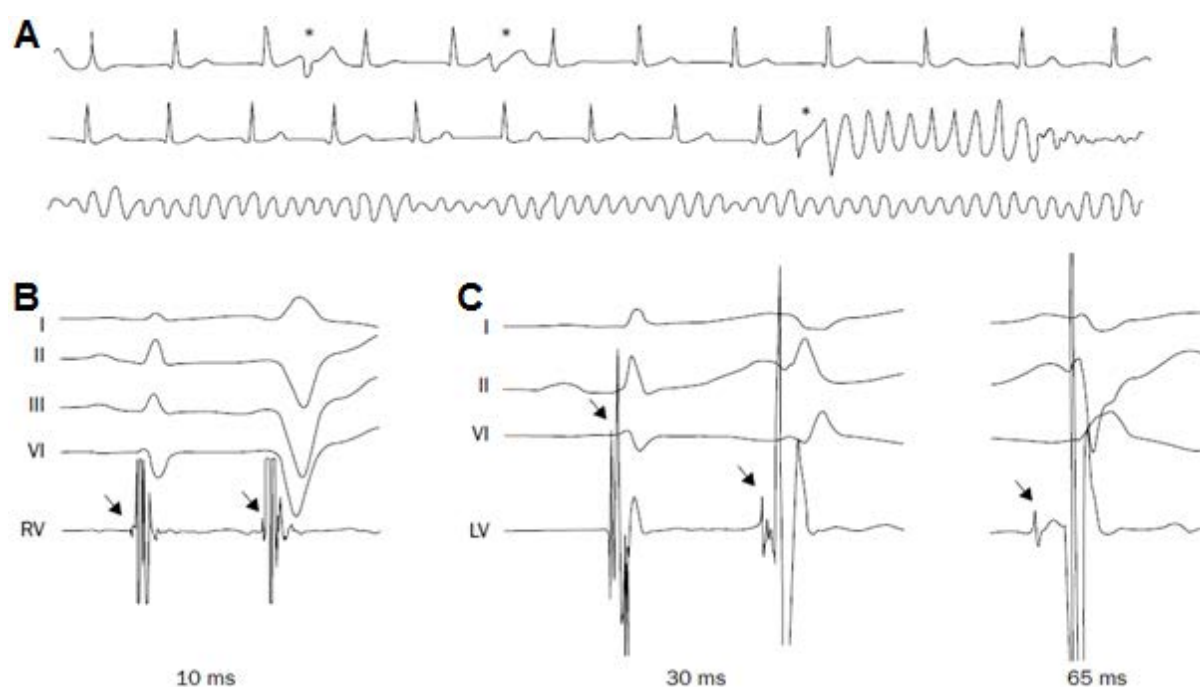


Figure 21 : A. Initiation de la fibrillation ventriculaire. B-C. Electrogrammes endocavitaires des ventricules droit (B) et gauche (C) au niveau de la source de déclenchement des extrasystoles.

* et flèches : battements prématurés. D'après Haïssaguerre et al 2002a.

Cela a ainsi permis de localiser les sources de déclenchement comme étant les sites où se trouvait l'activation électrique la plus précoce, mais aussi de montrer que la plupart d'entre eux provenaient du réseau de Purkinje (93% contre 7% du muscle ventriculaire) et plus précisément des fibres distales (Haissaguerre et al 2002a, Haissaguerre et al 2002b). Dans des pathologies telles que l'infarctus du myocarde, les Purkinje ont aussi pu être identifiées comme étant la source à l'origine de l'initiation des TVs/FVs chez presque tous les patients. Les cellules de Purkinje responsables se trouvaient dans la zone bordante de l'infarctus (Marrouche et al 2004, Szumowski et al 2004).

4.4.2. Maintien de l'arythmie

Le rôle des fibres de Purkinje dans le maintien de l'arythmie est peu documenté. Cependant, des expériences d'ablations chimiques des cellules de Purkinje par application d'une solution de Lugol (composée de diiode et de iodure de potassium ayant une forte affinité pour le glycogène des fibres de Purkinje) ont montré une augmentation du seuil d'induction de la FV, un ralentissement de la FV ou encore un arrêt prématuré de la FV (Tabereaux et al 2007). Il a également été montré, durant la FV, la présence d'un gradient de vitesse d'activation avec l'endocarde qui s'active plus rapidement que l'épicarde en condition contrôle, alors que pour un cœur traité avec le Lugol, ce gradient est perdu (Doddall et al 2008) (figure 22). Des études récentes sur des cœurs isolés de chien ont également pu démontrer que l'activité du Purkinje était présente dans 84% des FVs induites, avec une fréquence de fibrillation significativement plus élevée au début de l'expérimentation lorsque l'activité du Purkinje était présente (Huang et al 2014).

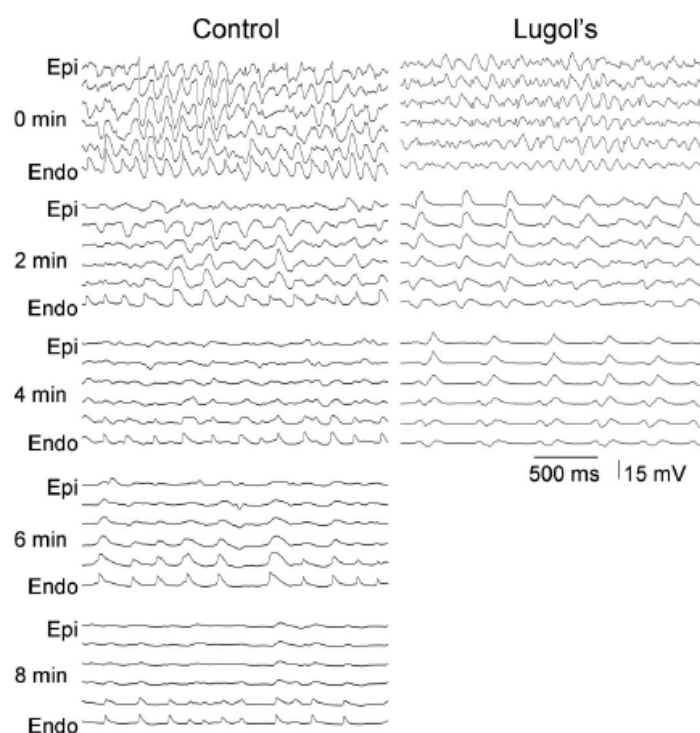


Figure 22 : Enregistrements à partir de six électrodes d'une aiguille plongée dans un cœur de chien contrôle ou traité toutes les 2 minutes au Lugol durant la fibrillation ventriculaire.

Endo : endocarde, *Epi* : épicarde. D'après Dosdall et al 2008.

4.4.3. Thérapie clinique

Les médicaments qui réduisent l'APD ou qui limitent la dépolarisation spontanée (comme le vérapamil ou la lidocaïne) peuvent être utilisés dans le traitement des arythmies liées au réseau de Purkinje (Harken et al 1987, Tsuchiya et al 2001).

Actuellement, l'implantation d'un défibrillateur constitue la première indication dans le traitement des arythmies potentiellement mortelles, alors que, l'ablation par radiofréquence est réservée aux patients résistants aux médicaments et aux multiples chocs par défibrillateur, sans ignorer que seuls les patients ayant peu de sources arythmogènes ont une forte probabilité de réussite au niveau de l'ablation. L'ablation s'effectue dans les zones de conduction lente ou au niveau des premiers sites d'activation par le Purkinje (Chan & Sy 2016, Dobrzynski et al 2013, Haissaguerre et al 2002b, Knecht et al 2009, Marrouche et al 2004, Szumowski et al 2004).

Potentiel d'action	Courants	Protéines	Expression génique / protéique		Effet sur les propriétés électriques du Purkinje	Rôle dans l'arythmie médiée par le Purkinje
			Myocytes ventriculaires	Cellules de Purkinje		
Phase 0	I_{Na}	Na_v	+	+	Dépolarisation rapide	Oui
	$I_{Ca(T)}$	Ca_v	-	+	Activité pacemaker	Non
Phase 1	I_{to}	K_v	+	+	Inconnu	Oui
Phase 2	$I_{Ca(L)}$	Ca_v	+	+	APD long	Oui
Phase 3	I_K	HERG, K_vLQT , KCNE	+	+	APD long	Oui
Phase 4	I_{K1}	K_{ir}	+	+	APD long	Oui
	I_f	HCN	-	+	Automatisme normal	Oui
Courant dépolarisant	I_{ti}	NCX	+	+	Automatisme anormal	Oui
Couplage électrique	NA	Cx40	-	+	Conduction rapide	Oui
	NA	Cx43	+	+	Inconnu	Oui
Transport calcique intracellulaire	NA	RyR ₂	+	+	Mobilisation hétérogène de calcium	Oui
	NA	RyR ₃	-	+	Mobilisation hétérogène de calcium	Non
	NA	IP ₃ R	-	+	Mobilisation hétérogène de calcium	Non
	NA	SERCA	+	+	Mobilisation hétérogène de calcium	Non

Tableau 1 : Principaux courants ioniques et protéines impliqués dans la modulation du potentiel membranaire des fibres de Purkinje.

La description des nombreuses protéines responsables de l'activité électrique du cœur, ne faisant pas l'objet de cette étude, n'a pas été traitée mais elle est illustrée dans Nerbonne & Kass 2005. NA : non applicable.

5. Contexte et objectif du travail de recherche

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde industrialisé. Chaque année, en Europe tout comme aux Etats-Unis, 350 000 décès par mort subite sont dénombrés, avec un taux de mortalité représentant 20% de la mortalité totale. Ce type de décès peut survenir chez des patients avec ou sans pathologies cardiaques connues. Cependant, les maladies cardiovasculaires, et notamment, les pathologies coronaires augmentent la prédisposition à un arrêt cardiaque, avec une prévalence de plus de 50%, en favorisant l'apparition de troubles du rythme. En effet, 50 à 85% des décès par mort subite sont attribués à des troubles du rythme tels que la TV et la FV (Marsman et al 2014, Tung & Albert 2013). Ces dernières correspondent à un rythme cardiaque rapide pouvant s'établir dans le temps voir même dégénérer pour la FV, engendrant ainsi une contraction rapide et désorganisée des ventricules mortelle au-delà de quelques minutes (Chan & Sy 2016, John et al 2012).

Les arythmies ventriculaires conduisant à la mort subite ont été précédemment associées à un type de cellules spécialisées, les fibres de Purkinje. Ces fibres font partie du système de conduction cardiaque, et possèdent un rôle majeur dans l'impulsion électrique et l'activation synchrone du muscle ventriculaire (Boyden et al 2010, Scheinman 2009, Silverman et al 2006). Néanmoins, dans certains cas, ces cellules peuvent être le lieu de phénomènes pro-arythmogéniques (Boyden et al 2010, Dobrzynski et al 2013, Ter Keurs & Boyden 2007) et participent à l'initiation et au maintien de la TV et de la FV (Dodd et al 2008, Haissaguerre et al 2002a). Cependant, les propriétés électrophysiologiques du réseau de Purkinje dans le muscle intact, et les mécanismes et sources arythmogéniques au sein du système de Purkinje, restent inconnus.

Par conséquent, l'objectif de ce travail de thèse était de déterminer à la fois les caractéristiques électrophysiologiques et structurelles des fibres de Purkinje, mais également, de déterminer la fonction du réseau de Purkinje lors des arythmies ventriculaires, et ce, dans le cœur sain ou pathologique. L'hypothèse de recherche étant que le système de Purkinje constitue un véritable substrat de l'arythmie en jouant un rôle important dans la modulation de l'hétérogénéité transmurale de repolarisation.

Pour répondre à cette hypothèse, six études complémentaires ont été développées au cours de cette thèse. Les trois premières études ont fait appel à une technique de cartographie optique permettant d'obtenir des informations électriques sur du tissu cardiaque *ex vivo*. La première étude consistait à caractériser le modèle des fibres de Purkinje sur des ventricules de grand mammifère afin de définir le potentiel pro-arythmogénique des jonctions du Purkinje avec le myocarde. En ce qui concerne la seconde étude, il s'agissait de définir l'hétérogénéité transmurale qui existe entre l'endocarde et l'épicarde selon une activation normale ou ectopique sur des ventricules en condition contrôle et pathologique. La troisième étude consistait à déterminer l'implication des jonctions Purkinje-muscle lors de la fibrillation ventriculaire. Pour la quatrième étude, il s'agissait d'études tissulaires via des techniques d'histologie classiques ou plus novatrices dans le but de caractériser l'organisation du réseau de Purkinje au sein du myocarde ventriculaire. La cinquième et la sixième étude consistaient à reprendre l'ensemble des études précédentes mais cette fois-ci chez l'homme, afin d'obtenir des données translationnelles comparables au modèle de grand mammifère.

Ces travaux de thèse ont ainsi permis d'améliorer les connaissances électrophysiologiques et structurelles des fibres de Purkinje à l'échelle tissulaire, mais également, d'approfondir l'implication du réseau de Purkinje dans les phénomènes d'arythmies ventriculaires. L'objectif étant d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement préventif des troubles du rythme ventriculaire afin de lutter contre la mort subite cardiaque.

Méthodes

Méthodes

1. Modèle animal

Nos études ont été réalisées sur des brebis adultes conformément à la directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, et au comité d'éthique local. Le cœur de brebis constitue un modèle d'étude proche du cœur humain, de par ses propriétés électrophysiologiques et structurelles similaires.

1.1. Préparation de l'animal

Une prémédication des brebis a tout d'abord été réalisée via une injection intramusculaire de kétamine (20 mg/kg) et d'acepromazine (1 mL/50 kg, Calmivet). Les animaux ont ensuite été anesthésiés par injection intraveineuse (IV) de pentobarbital sodique (10 mg/kg) puis maintenus sous isoflurane 2%, 100% O₂, via une intubation trachéale et une ventilation mécanique avec une fréquence de 10-15 mouvements/minutes (10 mL/kg, Hallowell 2000, TEM-SEGA). Afin de prévenir la coagulation du sang, une injection d'héparine en IV (2 mg/kg) a également été réalisée. Enfin, une sternotomie médiane a été pratiquée sur ces brebis de manière à faciliter le prélèvement du cœur avant qu'elles ne soient euthanasiées par administration, en IV, d'une dose létale de pentobarbital sodique (40 mL/ à partir d'une solution stock de 50 mg/ml).

1.2. Prélèvement du cœur

Par la suite, le cœur a rapidement été excisé, canulé au niveau de l'aorte et perfusé avec une solution de cardioplégie froide (4°C), composée de (en mM) 110 NaCl, 1,2 CaCl₂, 16 KCl, 16 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 10 glucose. De l'héparine (0,5 mL/L) a également été ajoutée à cette solution. La cardioplégie froide permet de stopper les contractions du cœur via une sur-dépolarisation du tissu, générée par un excès de potassium, le rendant ainsi inexcitable. Plusieurs lavages avec cette solution ont été réalisés afin de prévenir la formation de caillot et de préserver le tissu.

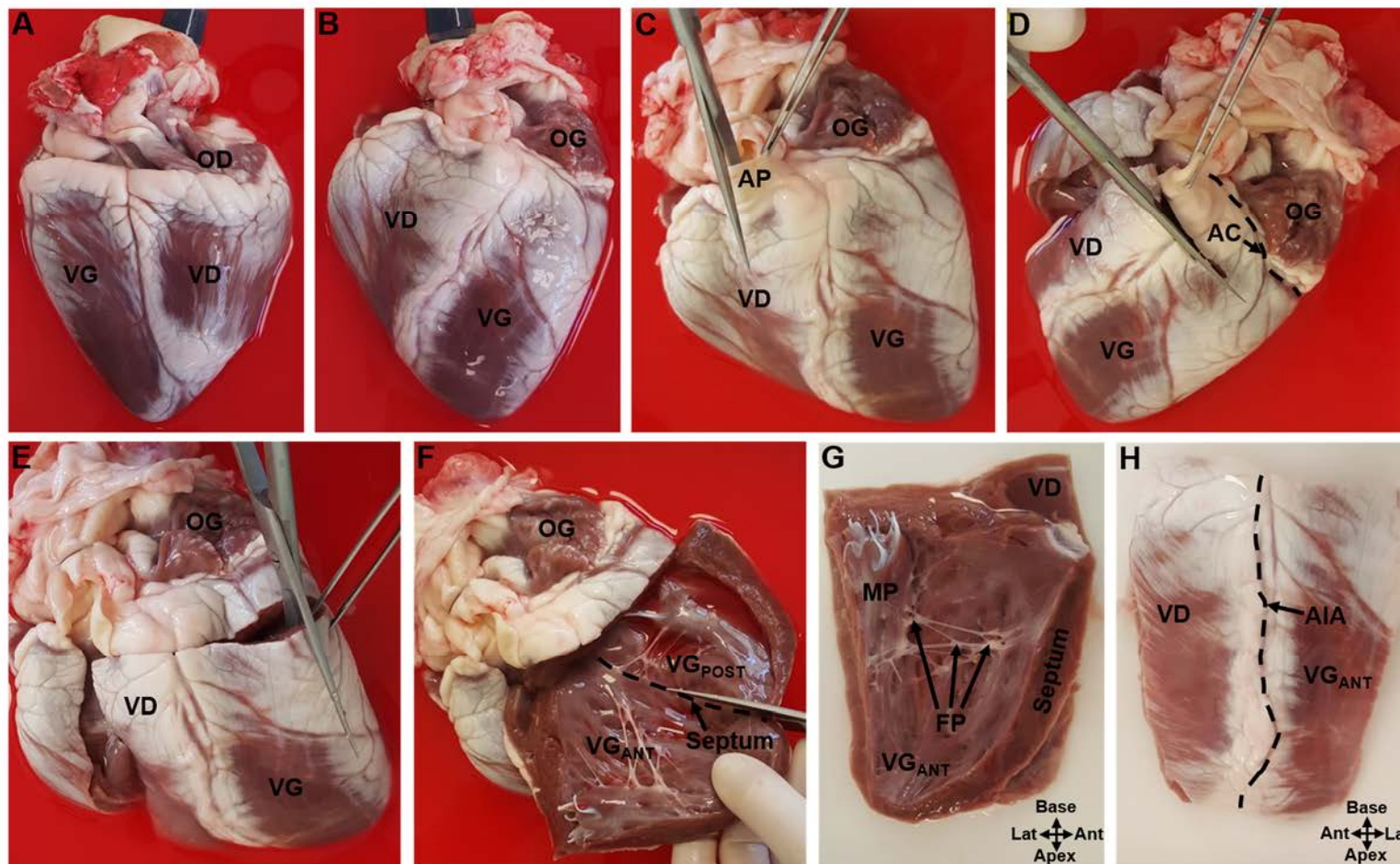


Figure 23 : Dissection du ventricule gauche (VG) de brebis. Cœur entier canulé par l'aorte, face postérieure (A) et face antérieure (B). C. Incision de l'artère pulmonaire (AP) jusqu'à l'apex. D-E. Incision sous l'artère circonflexe (AC) jusqu'à l'apex. F. Section du septum ventriculaire. G-H. Préparation expérimentale du VG antérieur (VG_{ANT}) coté endocardique (G) et épicaudique (H). AIA : artère interventriculaire antérieure utilisée pour la canulation, FP : fibres de Purkinje, MP : muscle papillaire, VG_{POST} : VG postérieur.

1.3. Dissection du ventricule gauche

Une première incision a été réalisée au niveau de l'artère pulmonaire descendant le long du ventricule droit (proche du septum et passant par la valve pulmonaire) jusqu'à l'apex du cœur (figure 23 C). Une seconde incision a ensuite été effectuée le long de l'oreillette gauche au niveau de la base du cœur (proche du septum et suivant l'artère circonflexe), puis descendant le long du muscle papillaire antérieur (lieu d'insertion des cordages de la valve mitrale) jusqu'à l'apex du cœur (figure 23 D-E). Le septum ventriculaire a ensuite été sectionné laissant ainsi une préparation typique de la partie antérieure du ventricule gauche (VG) (11x6 cm, épaisseur de 1,5 cm) (figure 23 F-H).

L'étude du VG représente un véritable enjeu de santé publique. Ce dernier étant impliqué dans la circulation systémique (*Cf. Introduction 1.1*), il constitue un risque plus élevé au développement de pathologies cardiaques graves telles que l'infarctus du myocarde. Son étude représente donc un réel impact pour la thérapie clinique. De plus, l'étude de la partie antérieure du VG a été privilégiée à celle du VG postérieur car c'est au niveau antérieur que se trouve le réseau le plus dense du Purkinje avec de nombreuses fibres libres accessibles (figure 23 F-G).

2. Technique de la cartographie optique

2.1. Principe de la technique

La cartographie optique est une technique très utilisée depuis les années 90 (Herron et al 2012), qui permet d'enregistrer l'activité électrique d'un organe ou d'un tissu de manière non-invasive et ce, avec une très bonne résolution spatio-temporelle. Cette technique permet ainsi de contourner les limites de certaines méthodes cellulaires comme la microélectrode, à savoir, la difficulté d'obtenir des enregistrements en simultané de potentiels membranaires à différents sites (Attin & Clusin 2009, Efimov et al 2004). Le principe de la cartographie optique repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes dites potentiométriques, c'est-à-dire, sensibles aux changements de potentiel membranaire (PM) des cellules. En effet, ces sondes sont constituées d'une structure chimique particulière qui leur permet de s'insérer au sein de la membrane plasmique et le changement de leurs propriétés optiques (variation d'intensité de fluorescence) est modulé par les variations du PM.

En pratique ces sondes possèdent une réponse dynamique rapide et l'émission de fluorescence est modulée sur l'échelle de temps du potentiel d'action (~ 1 ms) (Attin & Clusin 2009, Di Diego et al 2013, Efimov et al 2004, Herron et al 2012).

2.1.1. Principe de fluorescence

Ce type de sonde possède les propriétés d'une molécule fluorescente, à savoir, qu'elle absorbe de l'énergie lumineuse (excitation) qu'elle restitue rapidement ($<10^{-8}$ s) sous forme de lumière fluorescente (émission). Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve alors généralement dans un état électroniquement excité. Le retour à l'état fondamental peut alors se faire sous forme de fluorescence qui se caractérise par l'émission d'un photon de manière très rapide (Figure 24 A). Cependant, l'énergie émise est plus faible que l'énergie excitatrice car une partie se perd sous forme de chaleur. Cela se traduit par un déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus élevées, aussi appelé déplacement de Stokes, facilitant ainsi la séparation et la détection du signal fluorescent (figure 24 B) (Loew 2015).

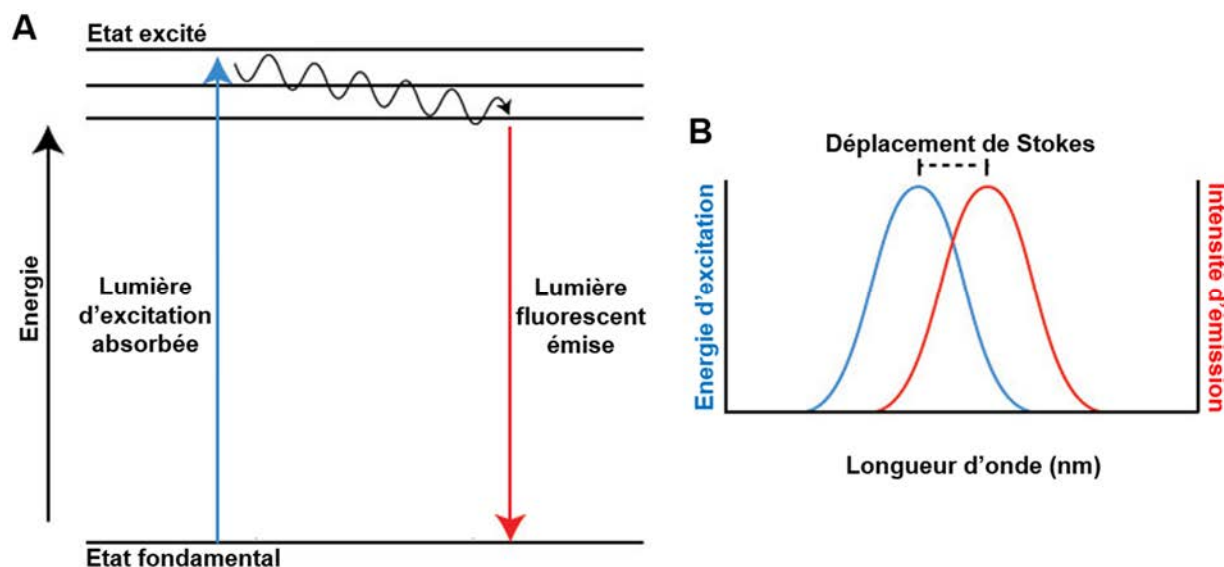


Figure 24 : A. Diagramme d'énergie de Jablonsky. B. Déplacement de Stokes.

Adapté de <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>.

2.1.2. Mécanisme d'électrochromisme

La plupart des sondes potentiométriques utilisées en cartographie optique reposent sur le mécanisme d'électrochromisme, c'est-à-dire que l'excitation de la sonde va induire une redistribution de ses charges parallèlement au champ électrique de la membrane. Plus précisément, lorsque la membrane est polarisée, les charges se déplacent dans la même direction que le champ électrique membranaire et lorsque la membrane est dépolarisée, elles se déplacent dans le sens inverse (figure 25 A). Il en résulte ainsi, un déplacement du spectre de fluorescence de la sonde qui est fonction de la variation de voltage de la membrane (figure 25 B). Ce déplacement correspond à une interaction directe entre le champ électrique de la membrane et l'état fondamental ou l'état excité de la sonde. Ce phénomène est également connu sous le nom d'effet Stark (Attin & Clusin 2009, Loew 2015).

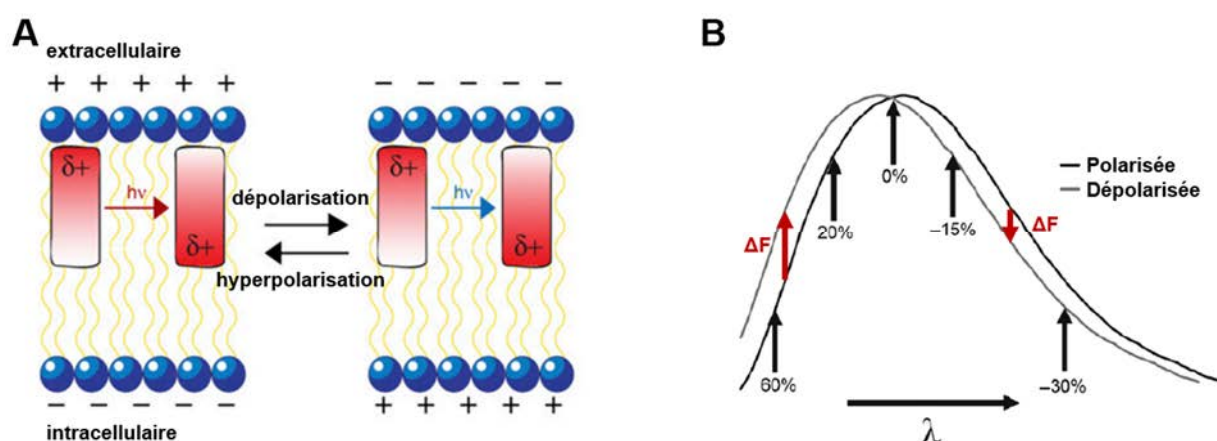


Figure 25 : A. Redistribution des charges de la sonde en fonction du champ électrique membranaire.

D'après Miller et al 2012. **B.** Variation relative de la fluorescence (ΔF) en pourcentage suivant une longueur d'onde donnée. D'après Loew 2015.

2.1.3. Potentiels d'action optiques

Les mesures optiques enregistrées correspondent donc à un changement de la fluorescence (ΔF) ou au changement d'intensité de la fluorescence normalisée ($\Delta F/F_0$) (figure 25 B) (Attin & Clusin 2009, Herron et al 2012). Le $\Delta F/F_0$ représente alors la dépolarisation du potentiel d'action (PA) durant son enregistrement.

Cependant, ce $\Delta F/F_0$ ne reflète pas la valeur absolue du PM de repos car la fluorescence peut être affectée par une auto-fluorescence du tissu, un photo-blanchiment ou encore une perte de son signal au cours du temps (Attin & Clusin 2009). La détection de ce changement de fluorescence va donc permettre d'enregistrer des PAs optiques (PAOs). Il est important de noter que le PAO possède des différences importantes avec le PA électrique (PAE) comme le temps de dépolarisation (PAO : ~ 10 ms, PAE ~ 2 ms) et la morphologie du PA (la phase 1 de repolarisation précoce disparaît pour le PAO) (Di Diego et al 2013). L'enregistrement de ces PAOs nécessite le maintien sous perfusion du tissu cardiaque étudié ainsi que l'utilisation d'un système d'imagerie optique performant.

2.2. Perfusion du ventricule gauche

Après dissection, le VG a rapidement été canulé par l'artère coronaire interventriculaire antérieure (figure 23 H). Les coronaires sectionnées ont été ligaturées avec du fil de suture (Vicryl Plus 2-0 70 cm, Ethicon) afin de maintenir une bonne perfusion et pression artérielle au sein de la préparation. Puis, la qualité de la perfusion a été vérifiée par injection d'un colorant, le bleu de méthylène (Sigma-Aldrich).

2.3. Système de perfusion de Langendorff

Le VG a ensuite été attaché sur un cadre afin de le placer dans une cuve transparente en plexiglass nécessaire aux expériences optiques. Puis, il a été immergé et perfusé dans un système de Langendorff à débit constant (20 mL/min), contrôlé par une pompe péristaltique (Minipuls® 3, Gilson), contenant une solution de bicarbonate pH 7,4 (composée de (en mM) 130 NaCl, 24 NaHCO₃, 1,2 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 5,6 glucose, 4 KCl et 1,8 CaCl₂, à 80 mmHg (95% O₂ et 5% CO₂) et 37°C). La solution de bicarbonate reproduit les concentrations ioniques physiologiques permettant ainsi au cœur de se contracter à nouveau. Un système de circuit fermé relié à un bain marie a permis de surveiller et de maintenir continuellement les températures de perfusion et de surperfusion à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Des électrodes ont été placées de part et d'autre du VG afin de contrôler le signal amplifié (DP-304A, Warner Instruments) de l'ECG sur un oscilloscope numérique (TDS 2022C, Tektronix). À l'aide d'un stimulateur (DG2A/DS3, Digitimer Ltd., UK), des stimulations basales entre 1 et 2 Hz ont été appliquées pour assurer la constance du rythme ventriculaire (figure 26).

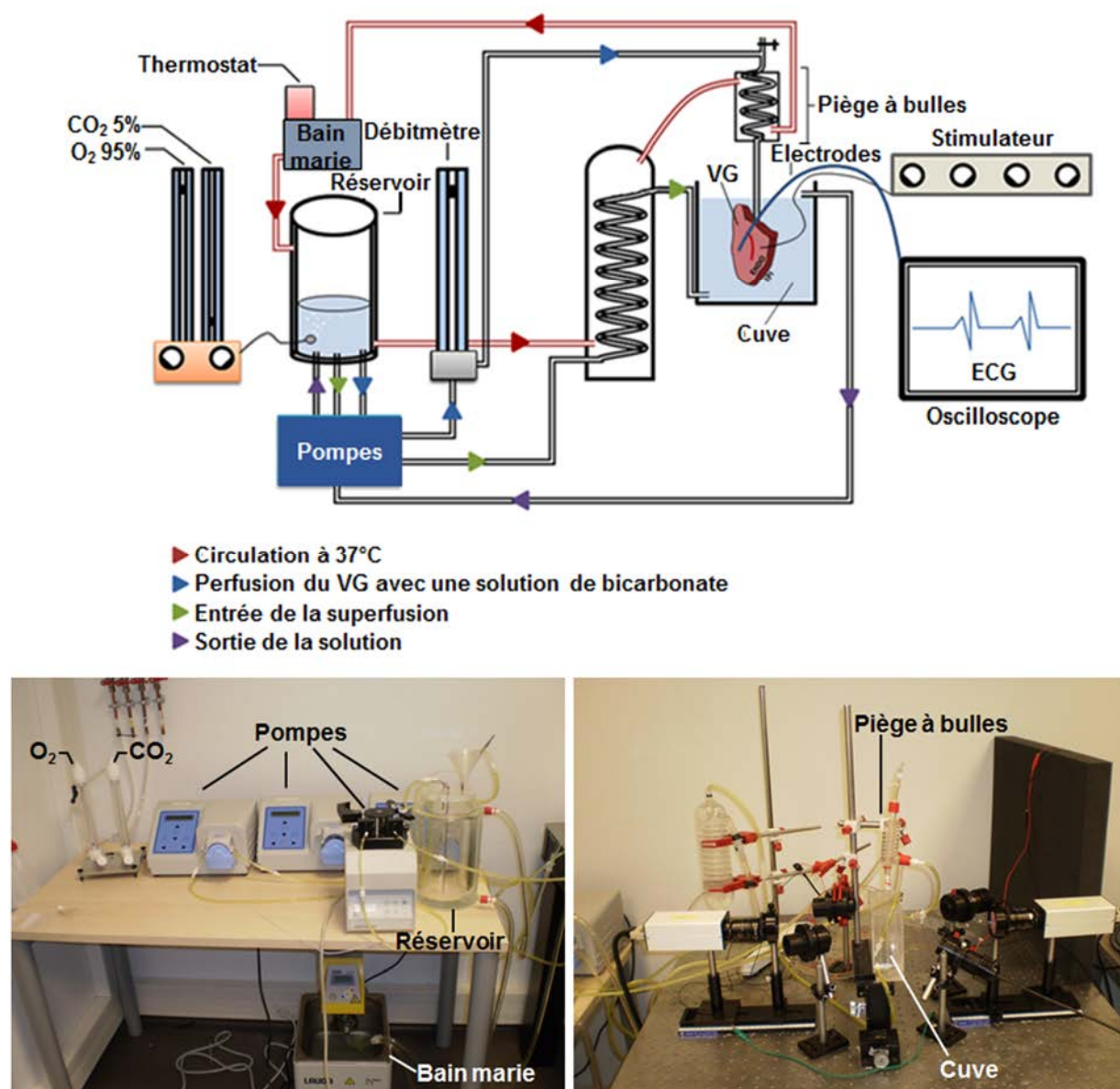


Figure 26 : Schéma et dispositif utilisé au laboratoire du système de Langendorff perfusant le ventricule gauche pour la cartographie optique.

2.3.1 Découplage de l'excitation-contraction

Après une période d'environ 20 minutes de récupération et de stabilisation du tissu, durant laquelle le débit de perfusion et l'ECG ont été contrôlés, un découpleur de l'excitation-contraction, blebbistatine (10 μ M, Enzo Life Science), a été ajouté à la solution de bicarbonate. En inhibant les ATPases associées à l'isoforme de myosine de type II (responsable de la contraction), la blébbistatine maintient la myosine dans un état détaché de l'actine et bloque ainsi la contraction du ventricule (Cf. Introduction 1.3), sans avoir d'effet sur son activité électrique (Fedorov et al 2007, Glukhov et al 2010). Ce découplage est nécessaire pour l'acquisition optique car les contractions du VG peuvent générer des artefacts.

2.3.2 Sonde potentiométrique

Une fois les contractions du VG abolies (environ 30 minutes sont nécessaires à l'action de la blébbistatine), une sonde fluorescente et sensible au voltage, le di-4-ANBDQBS (10 μ M, fournie par Leslie Lowe), a été ajoutée à la solution de bicarbonate. Son spectre d'excitation se trouve dans le rouge avec un pic à 660 nm et son émission se fait dans l'infrarouge (> 695 nm). Comparé à des sondes plus classiquement utilisées comme le di-4-ANEPPS (excitation : 532 nm, émission : 700 nm), le di-4-ANBDQBS, permet d'obtenir des informations sur une plus grande profondeur du tissu (3,9 mm contre 0,9 pour le di-4-ANEPPS) (Walton et al 2010, Walton et al 2009). Etant donné l'épaisseur du VG (Cf. *Méthodes* 1.3) cette propriété est importante pour nos études. De plus, cette sonde ne possède aucun effet électrophysiologique connu à ce jour et est de plus en plus utilisée dans les expériences de cartographie optique (Herron et al 2012, Walton et al 2014).

2.4. Système d'imagerie

Les enregistrements des PAOs ont été réalisés via un système à deux caméras Micam Ultima CMOS (SciMedia USA Ltd, CA, USA), avec une résolution spatiale de 100 x 100 pixels. Ce système permet d'obtenir des enregistrements simultanés et synchronisés à partir de la surface endocardique et épicaudique du VG, placé entre les deux caméras. Deux objectifs avec une distance focale de 25 mm et une ouverture maximale de 0,95 ont été disposés sur chaque caméra.

Deux LED de 660 nm (lumière d'excitation monochromatique) (Cairn Research Ltd, Kent, UK) ont été placées de chaque côté du VG pour illuminer les surfaces endocardiques et épiscopiques. Grâce à la sonde di-4-ANBDQBS, une émission de fluorescence à partir de ces surfaces a été produite et enregistrée avec un filtre passe haut de 715 nm par les caméras (figure 27). Les signaux optiques ont été amplifiés, numérisés et visualisés pendant l'expérience à l'aide d'un logiciel spécialisé (BV_Analyze, Brainvision). Les PAOs ont été ainsi enregistrés avec des résolutions spatiales et temporelles de l'ordre de 1000 images/s et 700 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ respectivement.

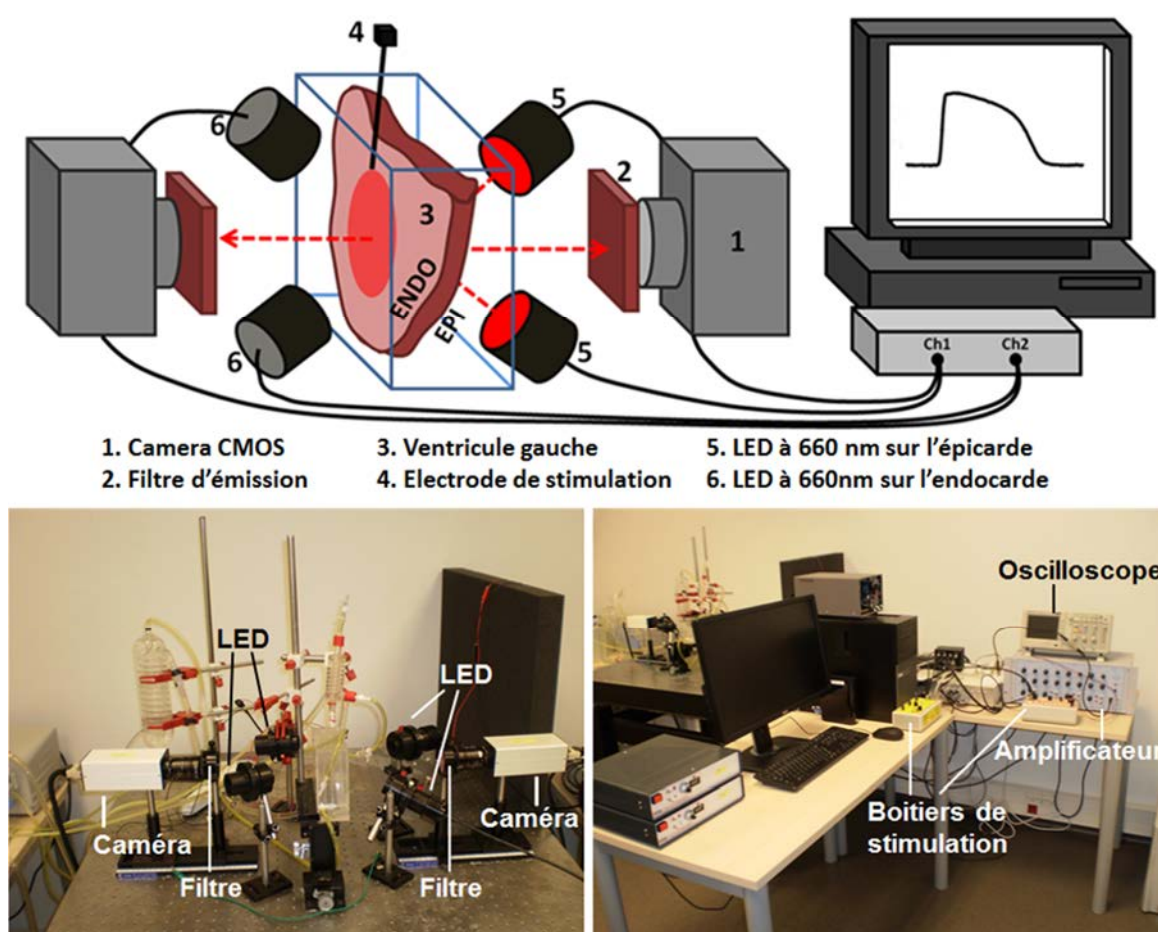


Figure 27 : Schéma et dispositif utilisé au laboratoire du système de cartographie optique.

ENDO : endocarde, EPI : épiscarde.

2.5. Protocole expérimental

Des stimulations de l'endocarde et de l'épicarde, de 2 à 5 ms de durée et d'amplitude variable (~ 25 mA), ont été réalisées à l'aide d'une électrode bipolaire en tungstène (World Precision Instruments), dans une gamme de fréquence allant de 1 à 3,5 Hz. Sachant que des fréquences de stimulation supérieures à 3,5 Hz pouvaient venir perturber la stabilité de la préparation en induisant des arythmies.

Puis, des stimulations également bipolaires des fibres libres de Purkinje, ont été effectuées à l'aide d'électrodes en fil d'argent (Phymep), dans une gamme de fréquence allant de 1 à 3 Hz. Ici, la limite de stimulation était fixée à 3 Hz en raison de la durée plus longue du PA chez les fibres de Purkinje (*Cf. Introduction 4.2*). En effet, ces dernières se retrouvaient dans leur période réfractaire et ne suivaient pas toujours la stimulation.

2.6. Traitement des données

Le logiciel BV_Analyze (Brainvision) a été utilisé pour analyser les PAOs. Les signaux ont tout d'abord été normalisés à 25% puis, un filtre spatial (kernel 2,1 mm) et un filtre cubique (kernel 3 ms) ont été appliqués.

Les temps d'activation (ou AT pour « activation time ») optique ont été déterminés par le temps de la dérivée maximale durant la phase ascendante du PA (Walton et al 2012). Les durées de potentiel d'action (APDs) ont été définies comme la différence entre le AT et 80 ou 90% de la repolarisation selon l'étude. La construction des cartes d'AT et des cartes d'APD a été générée via l'utilisation de programmes personnalisés (Pv-Wave 9.5, Rogue Wave Software, Inc). Un intervalle de 5 ou 10 ms a été choisi pour les isochrones, ces derniers reliant les pixels de même AT ou APD.

La mesure des APDs a été réalisée de manière différente en fonction des études. En général, les APDs ont été mesurées de façon globale afin de s'affranchir le plus possible du bruit et d'obtenir une moyenne de l'activité électrique sur la surface étudiée de la préparation. Les APDs ont également été mesurées localement aux origines d'activation (car c'est ici que l'effet électrotonique est le plus prononcé) ou suivant l'origine du « breakthrough », sur chaque surface (endocardique et épicaudique) et en fonction du site de stimulation (endocardique, épicaudique ou fibres de Purkinje).

Le « breakthrough » correspond à l'émergence de l'activité électrique sur la surface non stimulée. Les origines d'activation ont pu être identifiées à l'aide des cartes d'AT.

La mesure des différentes APD en fonction des différentes fréquences testées a permis de générer des courbes de restitution selon les différents sites de stimulation. Les cartes d'activation épicaudiques ont permis de calculer les vitesses de conduction longitudinales et transversales via l'utilisation d'un programme, nommé ORCA, implémenté dans MATLAB (Doshi et al 2015). Cette mesure est plus compliquée sur l'endocarde de par sa trabéculatation et n'a pas été effectuée ici.

3. Technique de microélectrode

3.1. Principe de la technique

Afin de pallier aux limites de la cartographie optique, à savoir, l'impossibilité d'obtenir des renseignements provenant directement du Purkinje, le signal de ce dernier étant noyé par celui du muscle ventriculaire, la technique de microélectrode a été mise en place. Cette méthode permet l'enregistrement de PAs au sein d'une seule cellule *in situ*. En effet, la microélectrode permet de se placer à l'intérieur d'une cellule sans déchirer sa membrane et de mesurer le potentiel membranaire de cette cellule. Son principe repose sur la mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes, une électrode intracellulaire et une électrode de référence. L'électrode intracellulaire est généralement en verre avec un diamètre d'ouverture inférieur à 0,1 μm et elle est remplie d'une solution conductrice de chlorure de potassium (KCl). Sa résistance doit être comprise entre 15 et 30 $\text{M}\Omega$. Toutes les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que la cartographie optique, jusqu'à l'ajout de blébbistatine (Cf. Méthodes 2.3.1). L'absence de contraction étant primordiale pour l'enregistrement des PAs.

3.2. Système d'enregistrement

Après stabilisation du VG, les PAs ont été enregistrés à l'aide d'une microélectrode fabriquée avec une étireuse horizontale (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instruments, Germany) à partir d'un capillaire de verre en borosilicate, de 1 mm de diamètre interne et de 0,58 mm de diamètre externe (1B100f-4, World Precision Instruments).

La microélectrode a été au préalable remplie avec une solution de 3 M de KCl (au moins 3 heures avant). Elle a ensuite été placée sur la tête de l'amplificateur (Digitimer NL100AK, Neurolog System), lui-même relié à un boîtier amplifiant dix fois le signal électrique (Digitimer NL102G, Neurolog System) puis connectée à l'ordinateur par l'intermédiaire d'un système d'acquisition (PowerLab® 8/35, ADInstruments). La microélectrode a par la suite été plongée dans la solution de bicarbonate de façon à régler les différents paramètres du signal électrique à l'aide du boîtier d'amplification (figure 28). La mesure de sa résistance ($\sim 20 \text{ M}\Omega$) a tout d'abord été effectuée par injection d'un courant de 1 nA à 150 Hz, ce même courant a également servi à régler la compensation de la capacitance cellulaire. Pour terminer, la ligne de base a été corrigée en mettant la trace à 0 avant le contact avec le tissu.

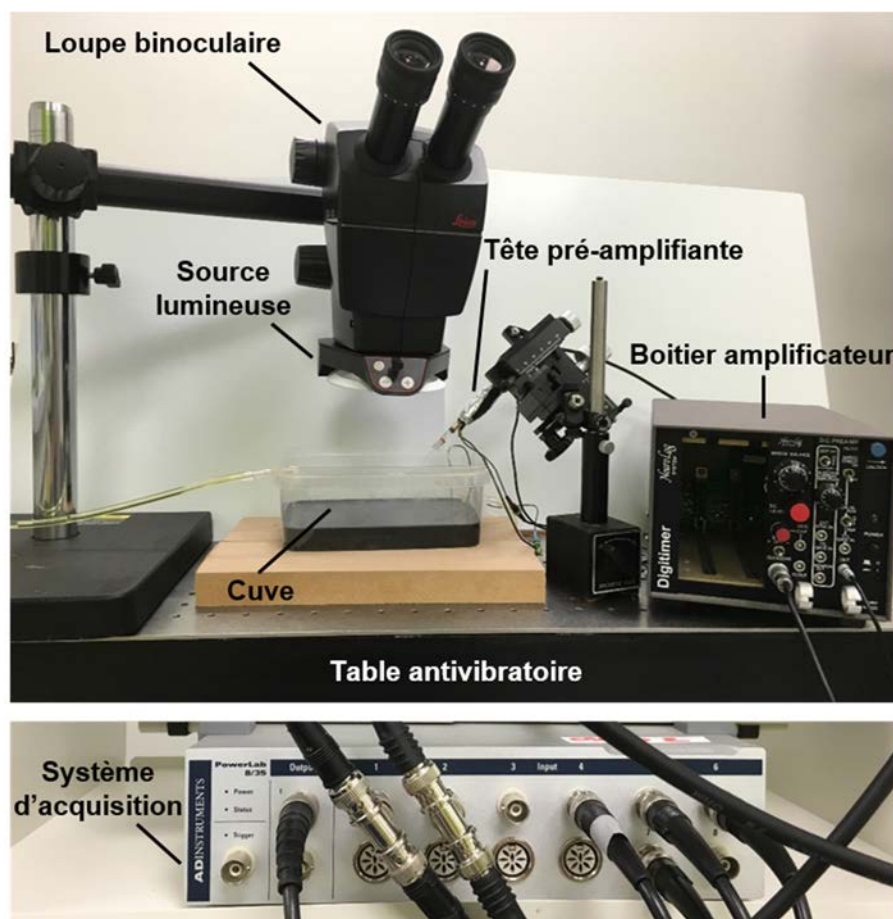


Figure 28 : Dispositif de microélectrode utilisé au laboratoire.

3.3. Protocole expérimental et traitement des données

Des stimulations basales de l'endocarde entre 1 et 2 Hz, de 2 à 5 ms de durée et d'amplitude variable (~ 25 mA), ont été réalisées à l'aide d'une électrode bipolaire en tungstène (World Precision Instruments). L'enregistrement des PAs ainsi que le déclenchement et l'arrêt des stimulations de la préparation ont été faits sous le contrôle du logiciel LabChart (version 7.0) avec un taux d'échantillonnage de 40 kHz, un filtre passe bas de 500 Hz, et un filtre secteur de 50 Hz.

4. Technique d'histologie

4.1. Principe de la technique

L'histologie consiste à étudier la morphologie et la fonction des éléments d'un tissu par observation microscopique. Son principe repose sur la conservation du tissu dans un état le plus proche possible du vivant (fixation), de préparer des échantillons compatibles avec l'examen microscopique (coupes) et d'introduire des contrastes qui n'existent pas naturellement et qui rendent possible l'observation (coloration). La coloration est la technique de référence pour évaluer l'état pathologique des tissus. Elle utilise des colorants qui vont se fixer préférentiellement à certaines molécules. Il suffit ensuite d'observer les échantillons au microscope en lumière blanche pour en révéler la structure.

4.2. Fixation et inclusion en paraffine

FIXATION

Des échantillons fins de tissu de brebis (1,5 cm d'épaisseur) ont été fixés dans du formaldéhyde 4% et mis sous agitation à 4°C pendant un minimum de 48 heures. La fixation a pour but de conserver la structure du tissu en empêchant sa dégradation tout en le rendant plus rigide. Elle doit être réalisée immédiatement après le prélèvement.

DESHYDRATATION ET IMPREGNATION DU TISSU EN PARAFFINE

Des cassettes contenant les échantillons de tissu précédemment fixés ont été placées dans un automate d'inclusion, histokinette (Leica TP 1020), entraînant la déshydratation de ces échantillons et permettant par la suite leur inclusion en paraffine (cette dernière étant hydrophobe). Ce procédé consiste au passage automatique des tissus dans onze bains successifs (alcool 70%, 95%, 100%, toluène 100% et paraffine chauffée à 56°C) pour une durée totale de 9 heures et 50 minutes (tableau 2). L'éthanol sert à la déshydratation du tissu afin de le rendre lipophile. Le toluène permet la pénétration de la paraffine dans le tissu, l'alcool n'étant pas miscible avec la paraffine.

Bains	Temps
Tampon phosphate salin	5 min
Ethanol 95% (3 bains)	1 h
	1 h
	1 h
Ethanol 100% (3 bains)	1 h
	1 h
	1 h 30
Toluène (3 bains)	30 min - 1 h
	1 h
	1 h
Paraffine (2 bains)	30 min – 1 h
	1 h

Tableau 2 : Déroulement du processus de déshydratation.

INCLUSION EN PARAFFINE

Les échantillons déshydratés ont été inclus dans des moules contenant de la paraffine à 60°C, dans une unité Leica EG1150H, et suivant une orientation longitudinale ou transversale. Ils ont ensuite été refroidis sur une plaque de refroidissement, à - 4°C (Leica EG1150C), afin d'accélérer la solidification. Puis, ils ont été placés et conservés à - 20°C avant leur utilisation. L'inclusion du tissu permet la réalisation de coupes fines et régulières.

4.3. Coupes microscopiques

Des coupes de 8 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à rotation (Leica RM2255), puis déposées sur des lames de verre Superfrost (Thermo Scientific). Les lames ont immédiatement été placées sur une plaque chauffante à 38-40°C pour assurer une adhésion correcte des coupes de tissu.

4.4. Coloration au trichrome de Masson

Un automate, teinturier de tissus (HMS 70, MYR) a été utilisé pour les étapes suivantes.

DEPARAFFINAGE ET HYDRATATION

Les colorants étant en solution aqueuse, l'étape préalable à la coloration est le retour à un état hydrophile du tissu, assuré par les processus de déparaffinage et d'hydratation (tableau 3). La coloration accentue les contrastes du tissu afin de mieux distinguer les différents éléments qui le compose.

Bains	Temps	Etapes
Toluène	5 min	Déparaffinage
Toluène	5 min	
100% Ethanol	5 min	Hydratation
95% Ethanol	4 min	
80% Ethanol	5 min	
Eau du robinet	4 min	
Hémalun	5 min	Coloration
Eau milliQ	5 min	
1% Fushine Ponceau (1vol F/2vol P)	1 min	
3% Acide phosphomolybdique	1 min	
1% Eau acétifiée	1 min	
1% Vert lumière	2 min	
1% Eau acétifiée	1 min	
95% Ethanol	3 min	Déshydratation
95% Ethanol	3 min	
100% Ethanol	3 min	
100% Ethanol	3 min	
Toluène	3 min	

Tableau 3 : Déroulement des processus utilisés lors de la coloration au trichrome de Masson.

TRICHOME DE MASSON

Il s'agit d'une coloration trichromique, composée d'une coloration basique des noyaux en bleu/noir par l'hémalun, d'une coloration rose du cytoplasme via un mélange de colorants acides : fuch sine acide et ponceau de xylidine; et d'une coloration spécifique du collagène de type 1 (tissu conjonctif) en vert par un autre colorant acide : le vert lumière (tableau 3). Ce type de coloration est largement utilisé pour étudier les pathologies cardiaques car elle permet de différencier les fibres de collagène du tissu musculaire (Sun & Weber 2005).

4.5. Montage des lames

Le tissu coloré a ensuite été déshydraté avant son montage sur lame en milieu hydrophobe (tableau 3). Puis, des lamelles ont été apposées sur les lames de verre, après application d'une résine d'enrobage composée de polymères à affinité pour le toluène (Entellan®) dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. Les régions d'intérêt des lames ont été étudiées et photographiées en lumière blanche à l'aide d'une caméra reliée au microscope (Nikon Digital Camera DXM1200F).

5. Technique de clarification optique

5.1. Principe de la technique

La reconstruction en trois dimensions des tissus biologiques constitue un moyen d'étude important dans l'analyse de leur forme et de leur fonction. Généralement, la reconstruction tridimensionnelle d'un tissu est obtenue par assemblage d'informations à partir de coupes histologiques en deux dimensions. Cependant, les coupes histologiques présentent certains inconvénients comme la distorsion géométrique, la perte d'information si les coupes se séparent, ou encore, la reconstruction seulement dans le plan de coupe. La technique de clarification optique offre ici de nouvelles opportunités d'imagerie très détaillée tout en préservant la structure du tissu étudié. Son principe repose sur l'utilisation d'une résine à faible viscosité en tant qu'agent de clarification, dont l'action permet de rendre le tissu transparent (MacDonald & Rubel 2008, Silvestri et al 2016).

Combinée aux techniques d'immunofluorescence classique et de microscopie confocale, cette approche permet d'obtenir des images du tissu en profondeur (jusqu'à 300 μm avec un objectif à huile) pour reconstruire et visualiser la structure du tissu étudié en trois dimensions, contrairement à la microscopie classique qui ne permet d'obtenir que des images à la surface du tissu (50 μm de profondeur) (MacDonald & Rubel 2008, Silvestri et al 2016).

PRINCIPE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

L'immunofluorescence permet d'observer une ou plusieurs protéines au sein du tissu. Il existe deux types d'immunofluorescence, directe ou indirecte. La méthode indirecte repose sur la reconnaissance par un anticorps primaire d'un antigène de la protéine d'intérêt. Puis cet anticorps est révélé par un anticorps secondaire fluorescent dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire suivant l'espèce dans laquelle il a été produit. La méthode directe consiste en l'utilisation d'un anticorps directement conjugué à un fluorochrome reconnaissant l'antigène de la protéine d'intérêt (figure 29) (Sawant et al 2014). Ici seulement le marquage indirect est décrit.

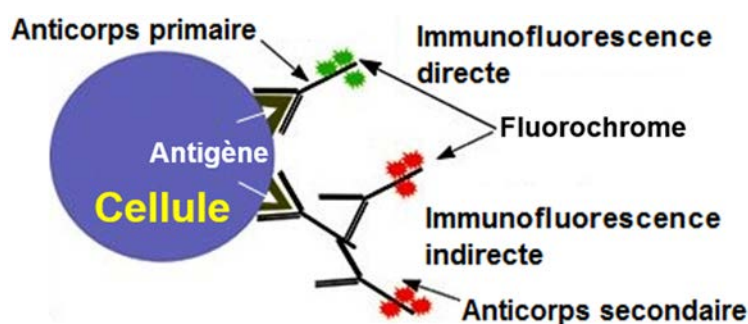


Figure 29 : Immunofluorescence directe et indirecte. Adapté de Sawant et al 2014.

PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE

La microscopie confocale permet de visualiser un échantillon en trois dimensions en réalisant sur ce dernier des coupes optiques de faible épaisseur (1-2 μm) à différents plans focaux (plan net sur lequel se forme l'image de l'objet). La reconstruction des images obtenues par un système informatisé permet ainsi cette visualisation tridimensionnelle.

Son principe repose sur l'excitation par laser de l'échantillon qui a préalablement été marqué avec des fluorochromes. Si la bonne longueur d'onde d'excitation est utilisée, il y a alors émission de fluorescence provenant des différents plans (suivant l'axe Z) de l'ensemble de l'échantillon. Grâce à la présence d'un diaphragme à ouverture variable (ou « pinhole ») seul le signal fluorescent provenant du plan focal est collecté sur le détecteur (figure 30). L'acquisition consécutive des signaux émanant des différents plans focaux permet la reconstruction en trois dimensions de l'échantillon.

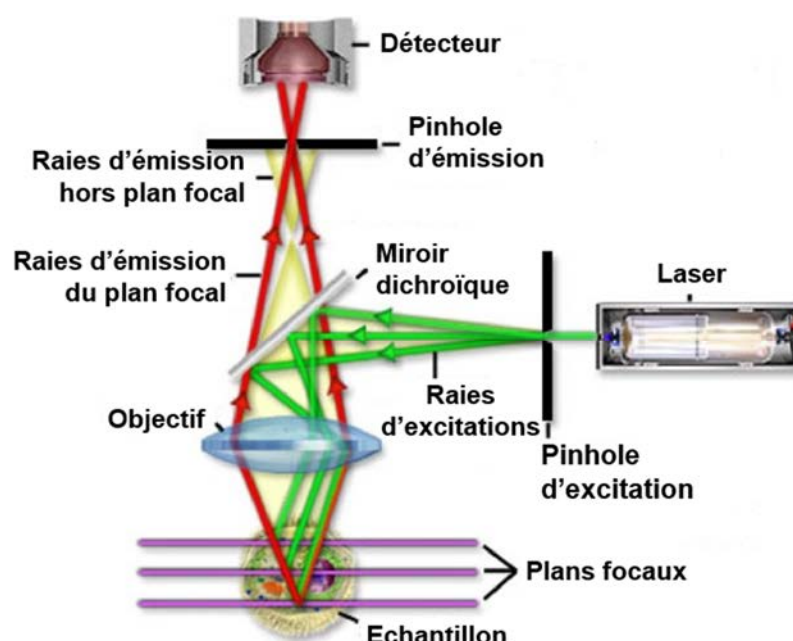


Figure 30 : Schéma du microscope confocal. D'après Basil & Wassef 2013.

5.2. Fixation et marquage fluorescent

Des échantillons très fins de VG de brebis (2-3 mm d'épaisseur) ont été fixés dans du formaldéhyde 4% et mis sous agitation à 4°C pendant un minimum de 48 heures.

Toutes les étapes de marquage ont été réalisées à température ambiante. Les échantillons ont tout d'abord été bloqués durant la nuit avec 10% de sérum de chèvre et 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) dans du tampon phosphate salin (composée de (en mM) 138 NaCl et 2,7 KCl à pH 7,4 et 25°C) (PBST) afin de réduire les marquages non spécifiques.

Les tissus ont ensuite été laissés durant cinq jours dans une solution contenant un marquage primaire d'anticorps dilué dans 0,3% de PBST et 5% de sérum de chèvre. Puis, les échantillons ont été marqués avec les anticorps secondaires pendant deux jours. Les tissus ont été rincés dans du tampon phosphate salin (ou PBS pour « phosphate buffer saline ») après chaque étape de marquage (3x5 minutes).

5.3. Clarification optique et acquisition des données

Afin d'éliminer toute trace de marquage fluorescent, les échantillons ont été lavés pendant 3x10 minutes dans du PBS. Les tissus ont ensuite été déshydratés par quatre bains successifs de 2 heures d'éthanol (25%, 50%, 75%, 95% v/v dans de l'eau distillée). Puis, les échantillons ont été placés dans un bain contenant 100% d'éthanol et du salicylate de méthyle (v/v) durant 2 heures (tableau 4). Enfin, les tissus ont été placés dans 100% de salicylate de méthyle (agent de clarification) (Sigma-Aldrich) et laissés à clarifier sur une période de quatre jours minimum.

Bains	Temps
Ethanol 25%	2 h
Ethanol 50%	2 h
Ethanol 75%	2 h
Ethanol 95%	2 h
Ethanol 95% + Méthyle salicylate (v/v)	2 h

Tableau 4 : Déroulement des processus de déshydratation et de clarification.

Par la suite, les échantillons ont été montés dans une cuve transparente surmontée d'une lamelle (Menzel-Gläser) pour être observés au microscope confocal inversé (Nikon C1 ECLIPSE TE 2000).

Ce microscope possède un pihnole de 1 μm , plusieurs objectifs dont un à huile, le x60, permettant d'obtenir une résolution maximale de 2048 x 2048 pixels. Il est couplé à quatre lasers comprenant les raies d'excitation suivantes : 405 nm, 488 nm, 562 nm et 635 nm. La détection de la fluorescence s'effectue par l'intermédiaire de trois détecteurs : 515-545 nm, 590-640 nm et 650 nm avec un filtre passe-haut.

L'ensemble du système est géré par le logiciel EZ-C1 (Nikon) contrôlant les paramètres d'excitation, d'acquisition et de traitement des images.

6. Cœurs humains

Dans le cadre d'un projet de recherche commun de l'IHU-LIRYC et le CHU de Bordeaux, l'opportunité a été offerte de pouvoir travailler sur des cœurs humains. Il s'agissait de cœurs de donneurs en état de mort cérébrale et dont le consentement pour le don d'organe (dans le contexte d'un prélèvement multiorganes) avait été accordé par la famille. Ces cœurs ont été rejetés pour la transplantation cardiaque en raison de pathologies ou de dysfonctions cardiaques (infarctus du myocarde ou fraction d'éjection trop basse < 40%) ou encore de l'âge trop avancé du donneur (> 65 ans).

Le prélèvement des cœurs a été réalisé par une équipe de chirurgien à l'Hopital Pellegrin, dans les mêmes conditions que celles effectuées sur l'animal précédemment étudié (Cf. *Méthodes 1.2*). Après avoir été rincé et placé dans une solution de cardioplégie froide (Custodiol, EUSA Pharma) contenue dans de la glace, le cœur a été récupéré par les équipes de l'IHU-LIRYC environ 1 heure après le prélèvement. L'utilisation de ces cœurs de donneurs a été approuvée par l'Agence de Biomédecine.

Les mêmes techniques de cartographie optique, d'histologie et de clarification optique ont pu être appliquées sur ces cœurs humains afin d'obtenir des données translationnelles et de pouvoir les comparer aux données animales déjà obtenues.

7. Analyse statistique

Plusieurs types d'analyses statistiques ont été réalisés durant les différentes études de ce travail de thèse. L'ensemble des données a été exprimé sous la forme de moyenne $\pm$ écart-type (ou SD pour « standard deviation ») et tous les tests statistiques ont été effectués par le logiciel SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc).

Lors de la première étude (premier papier), la différence des APD₈₀ locales lors de la stimulation du Purkinje ou de la stimulation de l'endocarde a été comparée à une valeur moyenne hypothétique de 0,0 ms par un test de Student sur un échantillon (* $p < 0,05$).

Puis la comparaison des APD₈₀ entre les groupes (Purkinje et endocarde stimulés) a été réalisée par un test de Student apparié (* $p < 0,05$).

Pour la seconde étude (second papier), la différence entre les APD₉₀ locales de l'endocarde et de l'épicarde suivant le site de stimulation, endocardique ou épicaudique, a été déterminée par des tests de Student appariés (* $p < 0,05$). Des tests ANOVA à un facteur sur des mesures répétées, suivis de tests de Holm-Sidak, ont été utilisés pour la comparaison des APD₉₀ locales de la jonction Purkinje-muscle (PMJ) et de l'épicarde (* $p < 0,05$), du PMJ et de l'endocarde (# $p < 0,05$) et l'endocarde et de l'épicarde (ϕ $p < 0,05$), suivant la stimulation du Purkinje. La comparaison du gradient transmural suivant le site de stimulation, fibres de Purkinje (* $p < 0,05$), endocardique ou épicaudique (ϕ $p < 0,05$) a été déterminée par des tests ANOVA à un facteur, suivis de tests de Holm-Sidak. Ce test a également été utilisé pour définir les différences significatives (* $p < 0,05$) entre les APD₉₀ du PMJ suivant le site de stimulation. La comparaison des APD₉₀, et des vitesses de conduction longitudinales et transversales entre les groupes contrôles et ischémiques a été réalisée par des tests de Student appariés (* $p < 0,05$).

Concernant la troisième étude, la différence statistique entre les groupes de fibrillation ventriculaire localisées (PMJ et zone d'activation tardive) a été déterminée par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$). Les différences statistiques lors de la comparaison de l'ensemble des groupes de fibrillation ventriculaire après ablation des PMJs ont été définies par un test de Kruskal-Wallis, suivie d'un test de Dunn's (* $p < 0,05$). Les différences statistiques au sein des groupes de fibrillation ventriculaire avant et après ablation des PMJs ont été déterminées par des tests de Student appariés (* $p < 0,05$).

Pour la quatrième étude (troisième papier), la différence statistique a été évaluée par un test de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

Dans la cinquième étude, les APD₉₀ globales de l'endocarde et de l'épicarde avant et après perfusion de la flécaïnide, ont été comparées par des tests de Kruskal-Wallis, suivie de tests de Dunn's (* $p < 0,05$).

Au cours de la sixième étude, les différences statistiques d'expression des ARNs de l'épicarde ou de l'endocarde entre le donneur présentant un syndrome de repolarisation précoce et les deux donneurs sains ont été déterminées par des tests ANOVA à deux facteurs, suivis de tests de Sidak ($\uparrow$ $p < 0,05$ et $\uparrow\uparrow\uparrow$ $p < 0,0001$).

La différence significative entre les APD₈₀ globales ou entre la triangulation de l'APD globale du donneur présentant un syndrome de repolarisation précoce et les trois donneurs sains a été définie par des tests ANOVA à un facteur, suivis de tests de Holm-sidak (***) $p < 0,0001$).

Résultats

Résultats

L'ensemble des résultats est présenté sous la forme de six études complémentaires. Les quatre premières études démontrent l'évolution de la compréhension du rôle des fibres de Purkinje dans l'hétérogénéité de repolarisation durant une activité normale ou pendant l'arythmie.

La première étude décrit le rôle des jonctions Purkinje-muscle (PMJs) dans la modulation locale de la durée de potentiel d'action sur le ventricule gauche de brebis. La seconde étude porte sur l'influence du réseau de Purkinje dans la mise en place des gradients transmuraux de repolarisation dans le myocarde sain et pathologique. La troisième étude décrit l'implication des PMJs lors de la fibrillation ventriculaire. La quatrième étude porte sur l'influence d'une structure spécialisée composée de fibres de Purkinje, comme substrat de la réentrée lors de la tachycardie ventriculaire ainsi que, sur des résultats complémentaires concernant l'étude tissulaire de la structure du réseau de Purkinje.

Dans un contexte préclinique, les deux dernières études se sont intéressées à l'hétérogénéité électrique du cœur humain lors de l'application d'un médicament anti-arythmique ou d'une pathologie cardiaque.

La cinquième étude illustre des résultats préliminaires concernant le rôle de la flécaïnide dans la modulation du gradient transmural de la durée de potentiel d'action chez le ventricule gauche humain. La sixième étude porte sur la caractérisation du substrat électrophysiologique du syndrome de repolarisation précoce chez un cœur humain.

1. Influence de la jonction Purkinje-muscle sur l'hétérogénéité transmurale de repolarisation

1.1. Contexte et objectif

Les myocytes ventriculaires de l'endocarde possèdent une durée de potentiel d'action (APD) plus longue que celles des myocytes épicaudiques. Ceci génère une hétérogénéité transmurale de l'APD nécessaire à la repolarisation homogène des ventricules (Antzelevitch et al 1991, Nabauer et al 1996, Nerbonne & Kass 2005) et par conséquent un fonctionnement normal du cœur.

Cependant, au niveau tissulaire cette hétérogénéité intrinsèque de l'APD peut être modulée par des interactions électrotoniques entre les cellules (Laurita et al 1996). Ce phénomène est dû à l'existence d'un courant passif entre les cellules avoisinantes qui se produit en présence d'un gradient de potentiel. Ces interactions permettent la propagation du potentiel d'action (PA) mais peuvent également être présentes durant la repolarisation. L'effet électrotonique est important au sein des PMJs où il existe des interfaces de cellules avec des PAs de différentes morphologies. Cet effet se traduit par un gradient d'APD le long des fibres de Purkinje qui diminue à proximité de la jonction avec le myocarde. Cela ayant pour conséquence de générer une dispersion de la repolarisation qui peut être une source potentielle d'arythmogénèse (Myerburg et al 1972, Myerburg et al 1970).

Par ailleurs, des régions avec des APDs longues ont été précédemment enregistrées au niveau des couches internes du myocarde sur des préparations de ventricules isolés chez plusieurs espèces (Antzelevitch & Fish 2001) y compris chez l'homme (Glukhov et al 2010, Rouzioux 1990). Ces régions localisées ont été associées à un type de cellules spécialisées, les cellules M, qui possèdent des propriétés intermédiaires entre les cellules de Purkinje et les myocytes ventriculaires (Antzelevitch & Fish 2001, Antzelevitch et al 1991). Cependant, la caractérisation électrophysiologique et l'isolement de ces cellules M restent incomplets et controversés à ce jour. Néanmoins, il a été rapporté que ces régions hétérogènes de l'APD, identifiées comme des cellules M, peuvent se chevaucher avec l'emplacement des PMJs (Yan & Antzelevitch 1998, Yan et al 1998).

Le but de cette étude était de déterminer si le couplage entre les cellules Purkinje et les myocytes ventriculaires au sein des PMJs pouvait conduire à une augmentation locale de l'APD ventriculaire, conduite par le système de Purkinje et en absence de cellules M, contribuant ainsi à la modulation de la dispersion transmurale de la repolarisation. Il s'agissait d'expériences de cartographie optique à partir de préparations de ventricules isolés et perfusés donnant accès aux fibres libres de Purkinje (*Cf. Méthodes 1.3*), complétées par des simulations informatiques reproduisant le modèle expérimental et les conditions auxquelles il était soumis.

L'ensemble de mes travaux pour cette étude a consisté à caractériser et étudier le modèle expérimental de ventricule gauche de brebis isolé et perfusé, stimulé par le réseau de Purkinje, afin d'identifier les PMJs et de définir leur potentiel pro-arythmogénique dans le myocarde sain.

Cette étude a été publiée dans la revue *Cardiovascular Research* en 2014.

1.2. Article 1 : Influence of the Purkinje-muscle junction on transmural repolarization heterogeneity

Les données supplémentaires de cet article se trouvent en annexe 1.

The Influence of the Purkinje-Muscle Junction on Transmural Repolarization Heterogeneity

Richard D. Walton PhD^{1,2,5}, Marine E. Martinez^{1,2,5}, Martin J. Bishop PhD⁷, Méléze Hocini M.D.^{1,2,5,6}, Michel Haïssaguerre M.D.^{1,2,5,6}, Gernot Plank PhD⁸, Olivier Bernus PhD^{1,2,5} and Edward J. Vigmond PhD^{3,4,5}

¹ Université de Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux U1045, Bordeaux, France.

² Inserm, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux U1045, Bordeaux, France.

³ Université de Bordeaux, L'Institut de Mathématiques de Bordeaux UMR 5251, Bordeaux, France.

⁴ Department of Electrical and Computer Engineering, University of Calgary, Calgary, Canada.

⁵ L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque LIRYC, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

⁶ CHU de Bordeaux, Hôpital du Haut Lévêque, Avenue de Magellan, 33600 Pessac

⁷ Biomedical Engineering Department, Division of Imaging Sciences, King's College London, London, United Kingdom.

⁸ Institute of Biophysics, Medical University of Graz, Graz, Austria.

Corresponding author: Richard Walton

L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque LIRYC
CRCTB U1045

PTIB – Campus Xavier Arnozan,
Avenue du Haut Lévêque,
33600 Pessac,
France.

Tel : +33 (0) 5 47 30 27 61

Fax : +33 (0) 5 57 10 28 69

richard.walton@ihu-liryc.fr

Short title: Purkinje modifies transmural repolarization

Word count : 7000

Abstract

Transmural heterogeneity of action potential duration (APD) is known to play an important role in arrhythmogenesis. Regions of non-uniformities of APD gradients often overlap considerably with the location of Purkinje-Muscle junctions (PMJ). We therefore hypothesized that such junctions are novel sources of local endocardial and transmural heterogeneity of repolarization and that remodelling due to heart failure modulates this response.

Aims – To elucidate the properties of the PMJ and myocardium underlying these effects.

Methods and Results – spatial gradients of endocardial APD in left ventricular wedge preparations from sheep (N=5) were correlated to the locations of PMJs identified through Purkinje stimulation under optical mapping. APD prolongation was dependent upon proximity of the PMJ to the imaged surface whereby shallow PMJs significantly modulated local APD when stimulating either Purkinje ($P=0.0116$) or endocardium ($P=0.0123$). In addition, we model a PMJ in 5x5x10 mm transmural tissue wedges using healthy and novel failing human ventricular and Purkinje ionic models. Short distances of the PMJ to cut-surfaces (<0.875 mm) revealed APD maxima were localized to the PMJ in healthy myocardium whereas APD minima were observed in failing myocardium. Amplitudes and spatial gradients of APD were prominent at functional PMJs and quiescent PMJs. Furthermore, increasing the extent of Purkinje fiber branching or decreasing tissue conductivity augmented local APD prolongation in both failing and non-failing models.

Conclusions –The Purkinje network has the potential to influence myocardial AP morphology, rate-dependent behavior and furthermore underlie enhanced transmural APD heterogeneities and spatial gradients of APD in non-failing and failing myocardium.

Abbreviations

AP – Action potential

APD – Action potential duration

I_m – Transmembrane current

PMJ – Purkinje-muscle junction

PF – Purkinje fiber

R_{PMJ} – Junctional resistance

σ_L – Longitudinal conductivity

σ_S – Transmural conductivity

σ_T – Transverse conductivity

V_m – Transmembrane potential

Introduction

Mammalian ventricles display transmural heterogeneity of ionic properties. Typically, subendocardial ventricular myocytes have longer action potential durations (APDs) than those from the sub-epicardium¹. Numerous differences in channel expression have been identified to explain this difference². Much more contentious is the transmural profile of APD, measured from transmural-cut surfaces of arterially perfused wedge preparations, which does not follow monotonic patterns as might be expected³.

Regions of longer APD have been recorded from the mid-myocardial layers of wedge preparations in several species⁴ including humans⁵. Interestingly, in human heart failure, where APD is prolonged, this profile becomes monotonic⁵ and transmural gradients are reduced³. Localized regions of APD prolongation have previously been explained by the existence of an additional cell type, with different properties to the rest of the myocardium, the M-cell¹. Due to challenges to differentiate such cells on an individual basis, they have thus far not been isolated and well characterized electrophysiologically at a cellular and molecular level. Microelectrode measurements from regions thought to occupy M-cells in tissue preparations have shown that M-cells have intermediate properties between Purkinje cells and ventricular myocytes, especially with regards to APD rate adaptation⁶. However, their origin and function have not been fully elucidated.

Electrophysiological characterization of the intrinsic properties of cells from coupled tissue is confounded by external current loading from neighboring cells. Such electrotonic loading determines source-sink mismatches during propagation⁷ but can also modulate repolarizing currents⁸ and, therefore, APD. This is likely to be particularly relevant at the Purkinje-muscle junction (PMJ), where interfaces of cells with differing AP morphologies exist. Such electrotonic effects drive gradients of APD along Purkinje fibers that decrease towards the junctioning myocardium and perhaps explain why localized APD prolongation in papillary muscle preparations correspond to sites consisting of dense Purkinje ramifications⁹.

Perhaps non-coincidentally, there is also overlap of sub-endocardial regions identified as M-cell and enhanced APDs with regions containing PMJs^{10, 11}. We hypothesized that coupling at the PMJ could lead to local increases in ventricular APD that appear more Purkinje-like in the absence of M-cells or a mid-myocardial cell layer and can contribute to modulation of the transmural dispersion of repolarization; an important factor in T wave morphology. We investigated this hypothesis firstly experimentally from ventricular wedge preparations in which, access to free-running Purkinje fibers permitted stimulation of the Purkinje system and enabled the location and determination of depths of PMJs by optical mapping. Secondly, we tested this hypothesis in a computer model of a human wedge of ventricular tissue into which a Purkinje fiber was inserted to form a PMJ. We repeated previous experimental protocols where transmural propagation was initiated with an endocardial stimulus. Furthermore, we tested the impact of the PMJ in failing myocardium where APD is prolonged and gradients between the bulk of the myocardium and specialized cell types, such as M-cells and Purkinje cells are reduced. Finally, we simulated optical mapping experiments for direct comparison with experimental recordings.

Methods

Optical mapping experiments

Hearts were acquired from Sheep (N=5; 40-55 kg) in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and the local ethical committee. Sheep were pre-medicated with ketamine at a dose of 20 mg/kg and acepromazine (Calmivet, 1 mL/50 kg). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (10 mg/kg) and maintained under isoflurane, 2%, in 100% O₂. Sheep were euthanized by sodium pentobarbital (40 mL, from a stock of 50 mg/mL) and the heart rapidly excised. Coronary-perfused ventricular wedges were prepared as previously applied in pig⁸. Methods for optical mapping are described in detail in the supplemental materials. Optical signals were acquired during pacing of either free-running Purkinje fibers or directly on the endocardial surface at 2 Hz.

Ionic models

Membrane electrical activity (I_m) for all cell types was based on the Ten Tüscher 2 cell model¹². Supplemental table 1 lists modifications of each model parameter. Modifications were based upon AP morphology of Purkinje identified from large animal models¹¹⁻¹⁴ and changes due to heart failure in human ventricular myocytes, where known. See supplemental materials for a detailed description of each model. Each cell type was subjected to 200 s of pacing at a constant basic cycle length of 1000 ms for stabilization and the last AP used for comparison of characteristics. States of ionic variables were captured 1 ms prior to stimulation of the last AP.

Human transmural ventricular wedge model

We used the well validated Purkinje-myocyte model developed by our group¹⁵⁻¹⁷. A finite element model of a three-dimensional transmural ventricular wedge, measuring 5x5x10 mm was considered at a spatial resolution of 0.1 mm. The model composed of an epicardial layer of 2 mm, while the remaining 8 mm were endocardial. A single Purkinje fiber (PF) of length 3 mm was inserted 2 mm along the long dimension of the wedge. One cut-transmural face was considered as the imaged face from which the PF was inserted at various distances. Electrical activity was solved with the CARP simulator¹⁸ using the monodomain approach with baseline conductivity values of 0.33, 0.15 and 0.075 S/m in the longitudinal (σ_L), transverse (σ_T) and transmural (σ_S) directions, corresponding to a conductivity anisotropy ratio of 4:2:1. A 120° linear transmural fiber rotation was implemented. To emulate previous experimental protocols, the middle of the endocardial surface was stimulated by intracellular current injection, thereby exciting the PMJ retrogradely. Direct Purkinje stimulation resulting in anterograde (PF to myocardium) transmission was also performed, with results confined to the supplement. Each region of the wedge was pre-conditioned by states of ionic variables captured from single cell pacing. Modeling of the PMJ has been described and characterized in detail¹⁹. We furthermore simulated optical mapping of the wedge. Detailed descriptions for the model and simulations are provided in the supplemental materials.

To compare single cell APD restitution characteristics from each ionic model, an S1S2 stimulus protocol was applied. Cells were paced over 200 s at 1000 ms basic cycle lengths followed by S1S2 intervals ranging from 300 to 1000 ms. Intervals were incremented by 5 ms from 300 to 400 ms, by 25 ms until 500 ms, and then by 100 ms, until 1000 ms. For characterizing APD restitution in wedges, we paced endocardially with an S1S2 protocol comprising a train of 10 S1 pulses followed by a single S2 pulse with S1S2 intervals ranging from 325 to 1000 ms.

Results

APD heterogeneity at the PMJ

Figure 1A shows multiple early sites of activation were observed following PF stimulation in experiments (black arrows). Sites of early activation corresponded to APD prolongation at some, but not all, early activation sites (figure 1B). When stimulated directly on the endocardial surface, AT increased in all directions with increased distance from the pacing site that was distinct from early activation sites observed through PF-pacing (figure 1C). Lines of apparent slowed conduction correlated with irregularities in surface geometry between trabeculae and the papillary muscle (see supplemental figure 1). A decreasing trend of APD with increased AT was observed for both PF and endocardial pacing sites (figure 1B and 1D, respectively). Figure 1E shows profiles of AT intersecting an additional earliest activation site from figure 1A (red arrow). A distinct zone of early activation is clearly identifiable (black arrow) when pacing PF, which is absent when pacing the endocardium directly. Furthermore, APD profiles taken along the same line revealed localized heterogeneities across the endocardial surface. One distinct region (black arrow) of prolonged APD was co-localized to the site of earliest AT when pacing the PF (figure 1F). This local elevation of APD remained, albeit reduced in amplitude, when stimulating the endocardial surface (black arrow). Endocardial pacing enabled better separation of loading effects of the PMJ on local APD from those associated with AT than PF stimulation (see also supplemental figures 2A,B). AP traces from the region of earliest activation and a region with an AT delay of 6 ms when pacing the PF (black boxes in figure 1A) were overlaid in figure 1G. APs were aligned by AT to compare repolarization times. The AP at the earliest activation site was somewhat prolonged compared to the later activated zone. AP traces from equivalent pixels following endocardial stimulation revealed APD prolongation was maintained (figure 1H).

Due to the transmural distribution of PMJs in sheep myocardium, we firstly determined which of the early activation sites measured by optical mapping corresponded to PMJs residing close to the endocardial surface; and not wave front surface breakthrough from PMJs located deeper in the myocardium. This was determined from the morphology of optical AP upstrokes²⁰ at the sites of early activation when pacing through PF. The normalized amplitude of the maximal derivative of the AP upstroke (v_F^*) corresponded to the orientation of the excitation wave front with respect to the imaged surface. As has been shown previously, a low v_F^* corresponds to a wave originating from and propagating away from the imaged surface and a high v_F^* gives the opposite. Thus activation through a deep PMJ should yield a high v_F^* (figure 2A), whereas a low v_F^* should be observed for endocardial PMJs (figure 2B). The v_F^* was variable between early activation sites (figure 2C & 2D). A threshold v_F^* (0.22) was determined as the maximum v_F^* observed when stimulating the endocardial surface directly (data not shown). When pacing the PF, v_F^* was used as a marker of PMJ depth. The impact of the PMJ on APD was quantified as the local differences of APD between the PMJ and neighboring myocardium when pacing the endocardium. Figure 2E shows that across all experiments, 17 origins of activation were identified, 9 of which had v_F^* values below the v_F^* threshold. Furthermore, a linear correlation was revealed between local APD differences and v_F^* ($R=-0.60$) for origins at, or near to, the endocardial surface. For origins below the v_F^* threshold, mean APD differences from locally surrounding myocardium were found to be significantly >0.0 ms when pacing the PF and endocardium (figure 2F). However, such differences were more pronounced for pacing PF than endocardium (paired t-test, $P=0.042$).

Ionic models

The Purkinje cell was electrophysiologically distinct from non-failing and failing myocardial cells (figure 3A). Resting V_m was -76.9 mV (-79.8 ± 1.9 mV previously observed in sheep²¹) compared to -85.2 mV and -85.3 mV from non-failing epicardial and endocardial cells, but in

failing were -76.4 and -77.0 mV. Maximal AP upstroke velocity in the Purkinje cell superseded all others. It was further distinguished from non-failing myocardial cells by a more negative AP plateau potential (9.8 vs 16.5 and 27.3 mV, respectively). Differences were reduced for failing myocardial cells, 14.6 vs. 13.5 mV, respectively. Non-failing myocardial cell's APDs were modified to match experimental data and percentage increases of APD for failing cells matched qualitatively with previous findings³. APD of epicardial and endocardial non-failing cells were 297 and 306 ms, whereas Purkinje APD was prolonged to 334 ms and similar to failing epicardial and endocardial cells, 336 ms and 340 ms. All APD restitution curves were mono-exponential (Figure 3B). The rate-dependence of APD of the Purkinje model matched those observed in dog^{22, 23}. The maximum slopes for non-failing epicardial and endocardial cells were 1.4 and 1.6, 2.2 and 2.4 for failing models but 14.0 for Purkinje cells.

Wave front transmission across the PMJ

Propagation in 3D transmural wedge's showed transmural conduction delays consistent with previous experiments³. Figure 4A shows endocardial activation with a smooth transmural activation pattern. An AP from the earliest activated myocardial node at the PMJ (2mm from the endocardium) was compared against a mid-wall location 5 mm from the endocardium. Gradients in AP morphology were evident. At the PMJ, the AP showed a negative shift in plateau potential compared with the mid-wall AP, despite being intrinsically identical. Similar morphological variations were observed from anterograde activation (supplemental figure 2A). Gradients of plateau potentials and decreased APD along the PF and modest differences between mid-wall and PMJ were also present (as for anterograde stimulation). Retrograde transmission across the PMJ was almost instantaneous with a delay of 1.0 ms. Endocardial stimulation in failing myocardium is shown in Figure 4B. Conduction slowed during approach of the wave front to the PMJ, followed by rapid excitation of the PMJ site. This was due, in part, to relatively more rapid depolarization kinetics of the Purkinje cells. Additionally, an increased rate of early (phase 1) repolarization was observed myocardially at the PMJ relative to the mid-wall. No differences in AP morphology were found along PFs for retrograde (figure 4B) or anterograde (supplemental figure 2B) conduction.

APD heterogeneity at the PMJ

Figure 5A shows an APD map of a transmural cross-section intersecting the PMJ for non-failing myocardium following endocardial stimulation. A pattern of APD negatively correlated with activation time was perturbed by a 3.1 ms prolongation of APD at the PMJ, where the maximum APD was found; versus a control simulation in the absence of a PMJ. This was comparable to local mean difference of APD of 3.9 ± 3.6 ms observed at PMJs in experiments. Note stimulation artifacts altered APD up to 500 μ m from the endocardial surface. Dispersion of APD and repolarization in control were 16.0 and 7.6 ms, which increased by 4.9% and 7.7% with a PMJ, respectively. Failing myocardium showed a distinct and localized APD depression of 7.7 ms (figure 5C), which co-localized with the PMJ (figure 5D). Steepest APD gradients were preferentially localized to endocardial-most boundaries of PMJs for endocardial stimulation, but no preference was observed for anterograde conduction (supplemental figure 3C,D). APD dispersion was reduced by the PMJ from control simulations (30.2 ms) by 7.1%. However, repolarization dispersion was considerably more sensitive, increasing by 59.2% from 9.6 ms.

APD heterogeneity is determined by surface proximity to the PMJ

Experimental measurements of local APD changes at the PMJ were linearly correlated to the estimated transmural depth of the PMJ from the imaged surface of intact myocardium, which eliminated potential artefacts associated to cut surfaces (figure 2E). Shallow PMJs showed the greatest influence on local APD, which was predictably prolonged. To relate this behavior with previous studies of transmural heterogeneity from cut-surfaces^{3, 6}, we

assessed the impact of the proximity of the PMJ to a transmural cut surface in the presence of a transmural APD gradient. Figure 6A shows APD maps from non-failing simulations of endocardial stimulation for various PMJ distances from the cut surface. Near-cut surface PMJs (0.25 mm) caused a prominent peak in APD on the cut-surface superficial to the PMJ. The peak was still present, albeit reduced, at a distance of 0.875 mm. For greater distances, smooth transmural gradients of APD monotonically decreased from the endocardium. Note also that the region of maximum APD modulation was displaced with increased PMJ distance due to fiber rotation. Figure 6B shows that for failing myocardium, APD changes were similarly more pronounced at short distances (≤ 0.875 mm) as for non-failing.

Figure 6C shows transmural APD profiles along the cut surface intersecting the maximum surface APD overlaid by corresponding profiles in the absence of a PF. In the sub-endocardium, APD gradients were highly dependent on the PMJ distance showing decreases of 47.6%, 90.5% and 109.5%, from 4.1 ms for distances 0.875, 1.5 and 2.5 mm. At 1.5 and 2.5 mm, maximum gradients of APD were independent of the PMJ. Transmural APD profiles for failing simulations in figure 6D show APD depression at the cut surface for all PMJ distances, which was less pronounced with increased distance. The greatest local APD difference was 12.3 ms at 0.25 mm, decreasing by 23.4%, 54.0% and 82.5% for each distance respectively. For PMJ distances ≤ 1.5 mm, local maximum transmural APD gradients were found at the epicardial-endocardial interface. Given the polarity of the PMJ effect, total transmural APD dispersion was unaltered by the PMJ.

S1S2 APD restitution characteristics were evaluated for PMJ distances of 0.25 and 2.5 mm (figures 6E,F). Curves were computed from the myocardium at the PMJ and mid-wall, and from the Purkinje at the PMJ and mid-fiber locations. With decreased coupling intervals, the Purkinje mid-fiber showed steepening of APD restitution that predisposed to APD alternans at short pacing cycle lengths (long APD shown). In contrast, restitution at the mid-wall of the myocardium was relatively shallow with reduced amplitude of APD alternans. At the junctional end of the PF, V_m was more tightly coupled to the proximal PF. Increasing PMJ distance from the cut-surface attenuated the amplitude of APD alternans in the myocardium at the PMJ.

PMJ properties determine APD heterogeneity

To elucidate the myocardial properties influencing local APD at the PMJ, we modified tissue and PMJ parameters for the maximum PMJ-to-surface distance, to eliminate additional boundary effects, mimicking intact myocardium. We examined R_{PMJ} , which was modified to 75% and 125% of the baseline. Supplemental figure 4 shows reduced R_{PMJ} attenuated transmission delays across the PMJ whilst an increase caused block in both non-failing and failing simulations for PF pacing. Retrograde transmission delays were insensitive to endocardial pacing over the R_{PMJ} range tested. Despite this, the local APD difference at the PMJ measured during endocardial pacing was attenuated with increased R_{PMJ} for both non-failing and failing simulations (figures 7A & 7B).

Local differences of APD at the PMJ in non-failing and failing simulations were augmented by increases in PMJ radii tested over a range from 400 to 800 μ m (supplemental figure 5 and figures 7C & 7D). Furthermore, the local area whereby APD was modulated by the PMJ scaled with PMJ radii. Myocardial conductivity also modulated APD at the PMJ however to a lesser extent than for PMJ radii (supplemental figure 6 and figures 7E & 7F). In both non-failing and failing and simulations, anisotropy of conduction in the myocardium had the least influence on local APD differences at the PMJ (Supplemental figure 7).

Validating optical mapping of APD heterogeneity at the PMJ

We validated the feasibility of observing localized APD changes at the PMJ via optical mapping of non-failing simulations. We tested the sensitivity of optical imaging to resolving spatial differences in APD for a PMJ 0.25 mm from the surface. Supplemental figure 8A

shows the APD map derived from V_m with the characteristic APD maxima at the PMJ. Optical signals were calculated for pixel dimensions of 100, 500 μm and 1000 μm . Supplemental figure 8B showed that for 100 μm , the optical APD map also revealed a prominent peak in APD at the PMJ and a decreasing trend from endocardium to epicardium, consistent with the APD map from V_m . Optical signals at 100 μm , 500 μm and 1000 μm resolutions had localized peaks that preserved APD amplitude from V_m signals by 80.8%, 79.1% and 73.6% (supplemental figures 8C & 8D). Local maxima of gradients of optical APD were discernible at the boundaries of PMJs for all resolutions tested. Relative to V_m signals however, these were reduced by 43.2%, 46.1% and 56.7%, respectively.

Discussion

This study has revealed experimentally that PF coupled to the myocardium modulates locally the APD in non-failing myocardium. Such increases in APD have been measured by both optical mapping and microelectrodes^{3, 10}. Experimentally, we showed that local APD differences at the tissue surface were correlated to the depth of PMJs. This role of PF to modulate locally the APD was proposed to underlie changes in repolarization heterogeneity in the transmural plane. In computer simulations, we produced an intrinsic monotonic linear transmural profile in APD using only 2 cell types, which was modulated exclusively by Purkinje coupling. Moreover, coupling of the Purkinje in failing myocardium was also shown to modulate local APD at the vicinity of the PMJ, contributing to strong localized transmural gradients of APD and RT.

PMJ Structure

A transitional compartment, composed of a distinct cell phenotype, is present between Purkinje fibers and the working myocardium^{14, 24-27}. It is postulated that this region serves as a high resistance barrier¹⁴, reducing electrotonic suppression of the PF so that it can excite the myocardium. Morphologically, these cells are smaller than Purkinje cells and myocytes. Thus far, they have not been disassociated from adjoining tissue and remain electrophysiologically uncharacterized. We do not explicitly model these cells but we do account for propagation and loading characteristics between the PF and myocardium as a whole by precisely modeling anterograde and retrograde transmission delays, consistent with those measured experimentally^{27, 28}. Our representation of the PMJ is asymmetrical so that proper loading and source conditions are sensed by the myocardium and PF. We do not model one PMJ, but a region of several closely spaced ones, as is necessary for ventricular activation and thought to be sufficient to influence repolarization in papillary muscles⁹. We, thus, implicitly model any current amplification realized by possible arborization of the PF and by the transitional compartment, as well as explicitly modeling effective resistance. Waveforms at the model junctions correspond to those recorded from tissue. Furthermore, consistent with non-failing experimental models, APDs of junctional Purkinje cells are longer than that of ventricular myocytes^{9, 29}, but shorter than that of Purkinje cells distant from the junction in free running strands^{9, 29, 30}.

Besides myocytes connected less than a few space constants from the PMJ, it is possible that transitional cells are also part of the prolonged APD region measured, as previously suggested³¹. A high resistance barrier does not preclude modulation of APD. In fact, the coupling between the PF and myocytes can only succeed if the coupling resistance falls within a narrow range. If coupling is sufficient for AP propagation, by definition it is sufficient for APD modulation. Furthermore, it may be possible that there are nonfunctional PMJs at which APD modulation still occurs, as demonstrated by coupled cell pairs³², since smaller currents are required for APD modulation than AP transmission because membrane resistance is much greater during repolarization than at rest³³. In this study, the effects of modifying R_{PMJ} , above and below thresholds for functional anterograde conduction, on local APD heterogeneity were investigated (figures 7 and supplemental figure 4). APD in the myocardium at the PMJ was highly sensitive to R_{PMJ} . Conditions favoring anterograde propagation (i.e. low R_{PMJ}) improved the loading influence of PF on the myocardium at the PMJ resulting in enhanced local APD prolongation. For nonfunctional junctions, however, local elevations of APD at the PMJ remained, although reduced in amplitude. This highlights potential for both functional and quiescent PMJs in transmural heterogeneities of repolarization.

M-Cells

This study lays the theoretical basis and experimental verification for an additional origin of inhomogeneities of repolarization to the previously identified M-cells, which have

characteristics falling between Purkinje cells and myocytes. Here, for M-cell, we specifically refer to the distinct cells found clustered in isolated islands in the midmyocardium, and not to cells generally found in the midmyocardium which encompasses everything but thin epicardial and endocardial layers. M-cells are defined by their longer APD and greater rate adaptation⁶. Using this definition, our coupled cells can be considered as M-cells, having a rate adaptation greater than pure myocytes due to the PF loading effects, as shown in figure 6. Furthermore, variability of PMJ coupling resistance or myocardial conductivity will alter the loading influence of the PF (supplemental figure 4). Since our prolonged APD results from coupling, any pharmacological intervention affecting either cell type will affect APD. It is also intriguing that in pigs, localized regions, previously assumed to be M-cells, were reported with properties highly consistent with the PF, primarily their resistance to ischemia³¹. While in nonungulates, M-cell populations are primarily reported at the subendocardium, corresponding to the terminal site of the PF¹⁰, there are M-cell populations reported epicardially in dogs⁶, which appear to be of a different origin than the mechanism presented here. Finally, M-cells have been exclusively reported in wedge preparations with one possible explanation being that the process of cutting the myocardium reduces coupling at the surface³⁴. Our results demonstrate that if this uncoupling does occur, local APD prolongation by the PF will be enhanced since reducing intracellular conductivity in our model also increased local APD at the PMJ.

Heart Failure

We found that APD shortening is possible in heart failure due to the altered loading conditions at the PMJ. We observed a depression of APD at the PMJ, which lay within the range of APDs measured between sub-epicardial and sub-endocardial layers. APD depression was affiliated to conduction discontinuity at the boundary of the PMJ approached by the wave front (figure 4). Its manifestation was dependent upon loading influence of the junctioning PF and could be reduced by increasing R_{PMJ} , the number of junctioning Purkinje cells in the PMJ or increasing myocardial conductance (figure 7). Maximal local spatial gradients of APD were found between the endocardium and the PMJ but relatively small gradients towards the epicardium. This was in contrast to non-failing simulations whereby steep gradients were found on all sides of the PMJ without conduction slowing. Our findings regarding possible APD shortening in heart failure have not been validated experimentally. APD duration profiles of failing wedges published by Glukhov³ showed an absence of transmural APD variability, but local APD distributions have yet to be correlated to conduction velocity in failing patients. Moreover, heart failure is associated with reduced myocardial conductivity and potentially therefore decoupling of the myocardium from the Purkinje at the PMJ (increasing R_{PMJ}). Akar & Rosenbaum³⁵, in contrast, observed a sub-endocardial APD elevation in dogs with heart failure. The steepest gradients of APD were observed at the endocardial boundaries of the prolonged APD zones, as in the present study, where PMJs are located. Furthermore, large gradients of APD over short distances were shown to be proarrhythmic.

Limitations

Full characterization of the PMJ has yet to be performed, especially in human hearts and during heart failure. Many measurements necessary for accurate parameter determination are missing or currently not feasible. The resting membrane potential of PF and their relative difference to myocardial cells are variable between large animal species including sheep^{21, 36} and dog^{23, 37}. A model of congestive heart failure in dog showed reduced phase 1 repolarization but no overall difference in APD from controls³⁸. Therefore we did not assume any differences in the Purkinje ionic model between non-failing and failing simulations. Instead, we explored a plausible range of parameters in cases such as functional and quiescent PMJs. However, the ionic models that were employed in this study had relatively modest differences of intrinsic APD between the myocardium and PF than those published in animal models by others^{11, 13, 14, 35}. As such, it is likely that local modulation of APD at a

cut-surface is underestimated in these models. Nevertheless, measuring APD modulation at the PMJ at the endocardial surface by optical mapping was explored experimentally and subsequently compared with computer simulations of optical mapping. An experimental model whereby we imaged an intact endocardial surface was preferred over a cut surface due to challenges to selectively stimulate through the Purkinje network and locate PMJs in thin cut tissue sections. Since the spatial extent of local APD changes fell below the spatial resolution of optical signals, the local changes in APD were reduced. However, we observed that over a large range of pixel dimensions (100-1000 μm), local APD prolongation at the PMJ was discernible and local differences of APD modulation at the PMJ were comparable to experiments. Local differences of APD at the PMJ measured from experiments are somewhat modest (figure 2F) relative to differences previously observed from transmural-cut surfaces. However, such preparations overestimate differences from intact myocardium due to the artificial introduction of a no-flux boundary in proximity to regions of APD prolongation. Moreover, as in simulations of optical mapping, our experimentally determined local differences of APD by the PMJ are somewhat underestimated due to optical scattering and furthermore, the average local APD differences reported here arise from PMJs that originate from a range of sub-endocardial depths, not purely surface PMJs, which are in turn subject to variable electrotonic loading from surrounding myocardium. We therefore conclude that observations of local elevations in APD by Glukhov³, observed by optical mapping, could indeed be the results of junctioning PF.

Conclusions

The present study revealed through a combined experimental/modeling approach, a close association between PMJs and local myocardial APD. Furthermore, this mechanism was shown to contribute to transmural heterogeneities of repolarization in simulations of human non-failing and failing myocardium. In a physiological range, electrotonic interactions across the PMJ are sufficient to modulate APD locally in the myocardium. The magnitude of such an effect is dependent upon resistive properties across the PMJ, number and density of junctioning myocardial cells and intracellular conductivity. Furthermore, the influence of the PMJ on local APD is further emphasized by cut surfaces. Despite smaller differences in intrinsic APD properties between the Purkinje and myocardium, APD gradients localized to the PMJ were 4-fold greater in failing than non-failing myocardium. The PMJ poses a novel origin of large spatial gradients of APD at the endocardium and in the transmural plane.

References

1. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res* 1991;**69**:1427-1449.
2. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205-1253.
3. Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res* 2010;**106**:981-991.
4. Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol* 2001;**96**:517-527.
5. Rouzioux JM. Who is responsible for what? *Fundam Clin Pharmacol* 1990;**4 Suppl** 2:183s-187s.
6. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res* 1991;**68**:1729-1741.
7. Scubon-Mulieri B, Sichel FJ. Intracellular resistance and conduction in bullfrog atrium. *Physiol Chem Phys* 1975;**7**:541-554.
8. Walton RD, Benson AP, Hardy ME, White E, Bernus O. Electrophysiological and structural determinants of electrotonic modulation of repolarization by the activation sequence. *Front Physiol* 2013;**4**:281.
9. Mendez C, Mueller WJ, Merideth J, Moe GK. Interaction of transmembrane potentials in canine Purkinje fibers and at Purkinje fiber-muscle junctions. *Circ Res* 1969;**24**:361-372.
10. Yan GX, Shimizu W, Antzelevitch C. Characteristics and distribution of M cells in arterially perfused canine left ventricular wedge preparations. *Circulation* 1998;**98**:1921-1927.
11. Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome. *Circulation* 1998;**98**:1928-1936.
12. ten Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H1573-1589.
13. Antzelevitch C, Shimizu W, Yan GX, Sicouri S. Cellular basis for QT dispersion. *J Electrocardiol* 1998;**30 Suppl**:168-175.
14. Tranum-Jensen J, Wilde AA, Vermeulen JT, Janse MJ. Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. *Circ Res* 1991;**69**:429-437.
15. Boyle PM, Masse S, Nanthakumar K, Vigmond EJ. Transmural IK(ATP) heterogeneity as a determinant of activation rate gradient during early ventricular fibrillation: Mechanistic insights from rabbit ventricular models. *Heart Rhythm* 2013;**10**:1710-1717.
16. Deo M, Boyle P, Plank G, Vigmond E. Arrhythmogenic mechanisms of the Purkinje system during electric shocks: a modeling study. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1782-1789.
17. Zamiri N, Ramadeen A, Masse S, Kusha M, Hu X, Azam MA, Liu J, Lai PFH, Vigmond EJ, Boyle PMJ, Behradfar E, Waxman M, Chen W, Backx P, Dorian P. Dantrolene Improves Survival Following Ventricular Fibrillation by Mitigating Impaired Calcium Handling in Animal Models *Circulation*;in-press.
18. Vigmond EJ, Hughes M, Plank G, Leon LJ. Computational tools for modeling electrical activity in cardiac tissue. *J Electrocardiol* 2003;**36 Suppl**:69-74.
19. Boyle PM, Deo M, Plank G, Vigmond EJ. Purkinje-mediated effects in the response of quiescent ventricles to defibrillation shocks. *Ann Biomed Eng* 2010;**38**:456-468.

20. Walton RD, Smith RM, Mitrea BG, White E, Bernus O, Pertsov AM. Extracting surface activation time from the optically recorded action potential in three-dimensional myocardium. *Biophys J* 2012;**102**:30-38.
21. Sheu SS, Korth M, Lathrop DA, Fozzard HA. Intra- and extracellular K⁺ and Na⁺ activities and resting membrane potential in sheep cardiac purkinje strands. *Circ Res* 1980;**47**:692-700.
22. Boyden PA, Albala A, Dresdner KP, Jr. Electrophysiology and ultrastructure of canine subendocardial Purkinje cells isolated from control and 24-hour infarcted hearts. *Circ Res* 1989;**65**:955-970.
23. Robinson RB, Boyden PA, Hoffman BF, Hewett KW. Electrical restitution process in dispersed canine cardiac Purkinje and ventricular cells. *Am J Physiol* 1987;**253**:H1018-1025.
24. Martinez-Palomo A, Alanis J, Benitez D. Transitional cardiac cells of the conductive system of the dog heart. Distinguishing morphological and electrophysiological features. *J Cell Biol* 1970;**47**:1-17.
25. Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 2008;**80**:9-19.
26. Shimada T, Nakamura M, Notohara A. The Purkinje fiber-myocardial cell region in the goat heart as studied by combined scanning electron microscopy and chemical digestion. *Experientia* 1984;**40**:849-850.
27. Tan RC, Ramza BM, Joyner RW. Modulation of the Purkinje-ventricular muscle junctional conduction by elevated potassium and hypoxia. *Circulation* 1989;**79**:1100-1105.
28. Wiedmann RT, Tan RC, Joyner RW. Discontinuous conduction at Purkinje-ventricular muscle junction. *Am J Physiol* 1996;**271**:H1507-1516.
29. Veenstra RD, Joyner RW, Rawling DA. Purkinje and ventricular activation sequences of canine papillary muscle. Effects of quinidine and calcium on the Purkinje-ventricular conduction delay. *Circ Res* 1984;**54**:500-515.
30. Myerburg RJ, Stewart JW, Hoffman BF. Electrophysiological properties of the canine peripheral A-V conducting system. *Circ Res* 1970;**26**:361-378.
31. Tribulova N, Novakova S, Macsaliova A, Sass S, Thomas S, Goetzfried S, Podzuweit T, Manoach M. Histochemical and ultrastructural characterisation of an arrhythmogenic substrate in ischemic pig heart. *Acta Histochem* 2002;**104**:393-397.
32. Huelsing DJ, Spitzer KW, Cordeiro JM, Pollard AE. Modulation of repolarization in rabbit Purkinje and ventricular myocytes coupled by a variable resistance. *Am J Physiol* 1999;**276**:H572-581.
33. Zaniboni M, Pollard AE, Yang L, Spitzer KW. Beat-to-beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;**278**:H677-687.
34. Janse MJ, Coronel R, Opthof T, Sosunov EA, Anyukhovsky EP, Rosen MR. Repolarization gradients in the intact heart: transmural or apico-basal? *Prog Biophys Mol Biol* 2012;**109**:6-15.
35. Akar FG, Rosenbaum DS. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res* 2003;**93**:638-645.
36. Verkerk AO, Schumacher CA, van Ginneken AC, Veldkamp MW, Ravesloot JH. Role of Ca(2+)-activated Cl(-) current in ventricular action potentials of sheep during adrenoceptor stimulation. *Exp Physiol* 2001;**86**:151-159.
37. Balati B, Varro A, Papp JG. Comparison of the cellular electrophysiological characteristics of canine left ventricular epicardium, M cells, endocardium and Purkinje fibres. *Acta Physiol Scand* 1998;**164**:181-190.
38. Han W, Chartier D, Li D, Nattel S. Ionic remodeling of cardiac Purkinje cells by congestive heart failure. *Circulation* 2001;**104**:2095-2100.

Funding

This work was supported by the Lefoulon-Delalande Institute to [R.D.W.]; Marie Curie [grant number IEF-PFCD to R.D.W.]; the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-10-IAHU04-LIRYC to R.D.W., M.M., M.H., M.H, O.B. and E.J.V.] and the National Institute of Health [grant number R01HL101196 to E.J.V.].

Disclosures/Conflicts of Interest

Edward Vigmond is an owner of CardioSolv LLC.

Figure Legends

Figure 1. APD heterogeneity at origins of activation following pacing of PF. **A**, AT map derived from the endocardial surface of an ovine LV wedge following pacing of PF. Origins of activation are indicated by arrows. Regions of slowed conduction correspond to intra-trabeculated grooves. **B**, Corresponding APD map. **C** and **D**, APD map following direct stimulation of the endocardium. **E**, Profiles of AT from pixels along the dashed lines in **A** and **C**. **F**, Corresponding profiles for APD. AP traces extracted from an origin of activation (box with red arrow in **A**) and from the local myocardium (box in **A**) when pacing PF (**G**) or endocardium (**H**).

Figure 2. Surface APD heterogeneity determined by depth of PMJ. Optical AP upstroke morphology depends on orientation of wave front relative to the imaged surface. Schematics of transmural propagation patterns and optical AP upstrokes measured from pixels corresponding to the surface location of earliest activation from deep (**A**) and shallow (**B**) origins of activation. Normalized amplitude of maximal derivative determines v_F^* . **C**, v_F^* map following PF pacing. Arrows indicate origins of activation from figure 1A. **D**, Disparity of PMJ v_F^* observed in panel **C**. **E**, v_F^* versus local APD differences between all origins and their local myocardium. Dashed line shows v_F^* threshold differentiating origins residing at the tissue surface or deeper myocardium. A linear correlation was observed between v_F^* and APD differences from origins located between surface and mid-myocardial layers ($R=-0.60$). **F**, Mean $\pm$ SD local APD differences at surface origins. *Indicates data are significantly different to a hypothetical difference of 0.0 ms ($N=9$, one sample t-test, $P<0.05$).

Figure 3. Ionic models and heterogeneous tissue wedge. **A**, APs derived from human epicardial, endocardial and Purkinje fiber ionic models of non-failing (left panel) and failing (right panel) hearts. Shown are the last of a train of 200 APs stimulated at 1 s cycle lengths. From the time window shown, ionic state variables were captured at time 0 ms for single cell APD restitution and 3D computations. **B**, APD restitution curves from S1S2 stimulation in non-failing (left panel) and failing (right panel) single cell ionic models. Single S2 pulses, preconditioned by the S1 pulse shown in **A**, were applied over a range of intervals from 230 ms to 1000 ms. **C**, 3D transmural tissue wedge with a junctioning PF.

Figure 4. Conduction across the PMJ. **A**, Impulse propagation in a non-failing wedge simulation was initiated by point stimulation at the endocardial surface, superficial to the PMJ, for retrograde activation sequences. The PMJ was 2.5 mm from the transmural cut-surface. From left to right, panels are surface activation maps and a transmural cross-section of the wedge through the PMJ, APs from nodes positioned in the myocardium at the centre of the PMJ (black solid trace), at a transmural depth of 5 mm in the myocardium (black dashed trace), the distal-most node of the PF (red solid trace) and at the mid PF (red dashed trace). The right-most panel is an expanded view of upstrokes from APs at the PMJ. **B**, Retrograde activation sequences from a failing simulation. Shown are corresponding activation maps and AP traces as in **A**. All isochrones have 2 ms intervals.

Figure 5. The PMJ contributes to myocardial APD heterogeneity. **A**, APD maps from transmural cross-sections through the PMJ of non-failing simulations for retrograde activation sequences corresponding with figure 2. **B**, APD profile across transmural cross-sections from endocardium to epicardium and intersecting the PMJ (solid line). A control profile in the absence of a PF is shown (dashed line). Equivalent APD map (**C**) and APD profile (**D**) for a failing simulation. All isobars have 2 ms intervals.

Figure 6. APD heterogeneity across the transmural cut-surface and the dependence of the proximity of the PMJ. **A**, Surface APD maps of non-failing simulations with PMJs at depths of (from left to right) 0.25 mm, 0.875 mm, 1.5 mm and 2.5 mm from the transmural-cut surface from retrograde activation. **B**, Equivalent APD maps are shown for failing simulations. All isobars have 2 ms intervals. **C**, Transmural APD profiles for each extracted from nodes

along the transmural-cut surface and intersecting nodes with maximal APD from non-failing simulations and for each PMJ depth (dashed lines in **A**). Control profiles in the absence of a PF for each PMJ depth are shown (dashed lines). Equivalent **D**, Transmural APD profiles for each PMJ depth for failing simulations were extracted from the same nodes as in non-failing simulations (dashed lines in **B**). APD restitution for nodes localized in the myocardium at the PMJ and mid-wall and nodes from the PF at the PMJ and mid-fiber derived from constant cycle length pacing protocols with retrograde activation sequences. APD restitution was compared between PMJ depths of 0.25 mm (**E**) and 2.5 mm (**F**). Pacing frequencies associated with alternans are indicated by arrows.

Figure 7. Determinants of transmural APD heterogeneity at the PMJ. Transmural APD profiles intersecting the PMJ from simulations with PMJ at depths of 2.5 mm from the transmural-cut surface. Control profiles in the absence of a PS are shown (dashed lines). R_{PMJ} for 75%, 100% and 125% in non-failing (**A**) and failing (**B**) simulations. Corresponding maps are shown in figures 2, 3 and 5. PMJ with radii of 400, 600 and 800 μm in non-failing (**C**) and failing (**D**) simulations were considered. Corresponding figures are shown in supplemental materials figure 2. Intramyocardial coupling was modified by changes in σ_L to 0.09 S/m, 0.21 S/m and 0.33 S/m while preserving anisotropy at 4:2:1 for non-failing (**E**) and failing (**F**) simulations.

Figure 1.

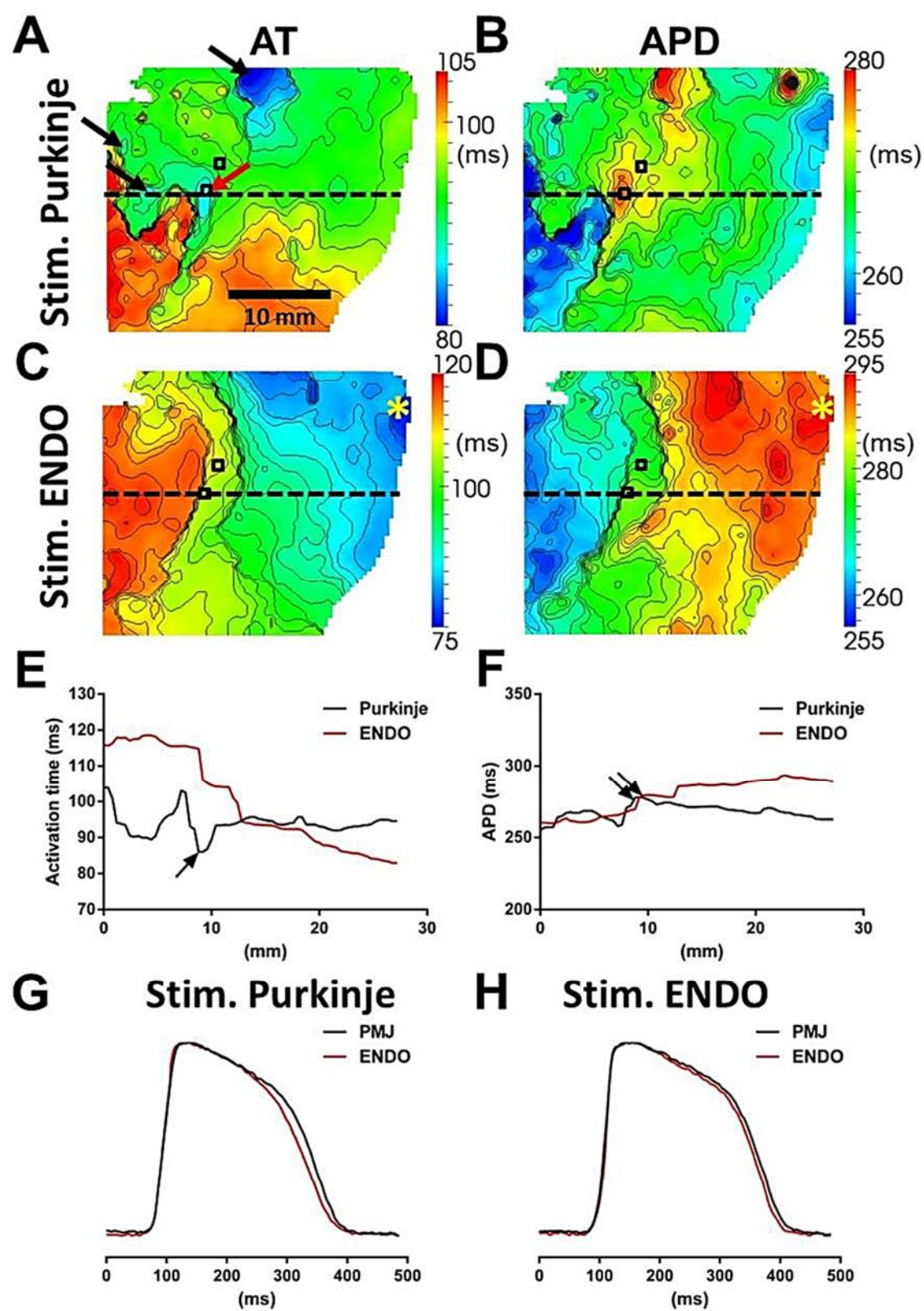


Figure 2.

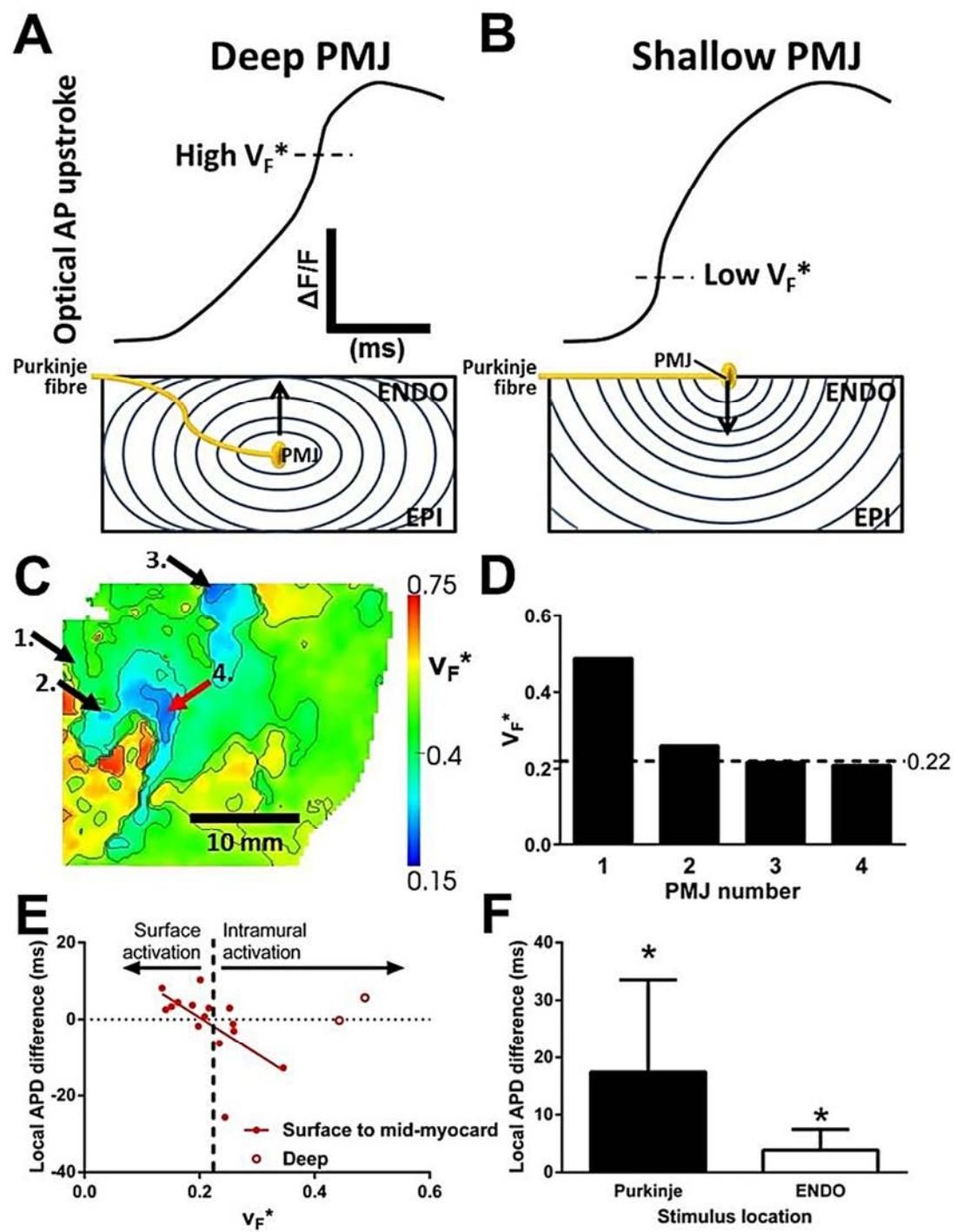


Figure 3.

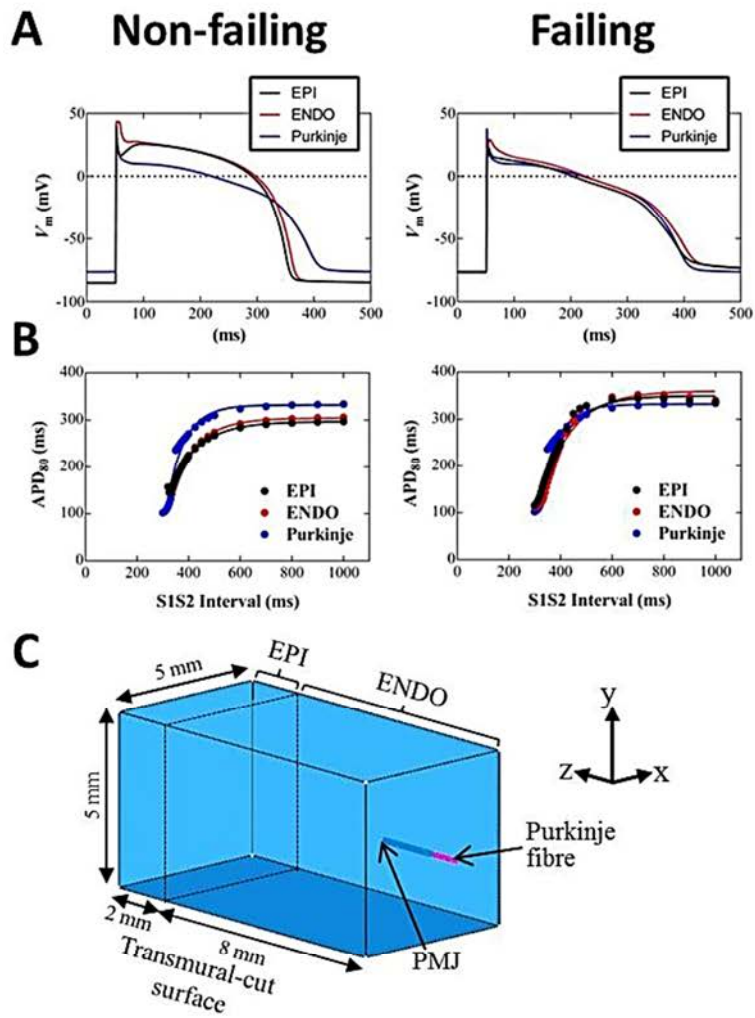


Figure 4.

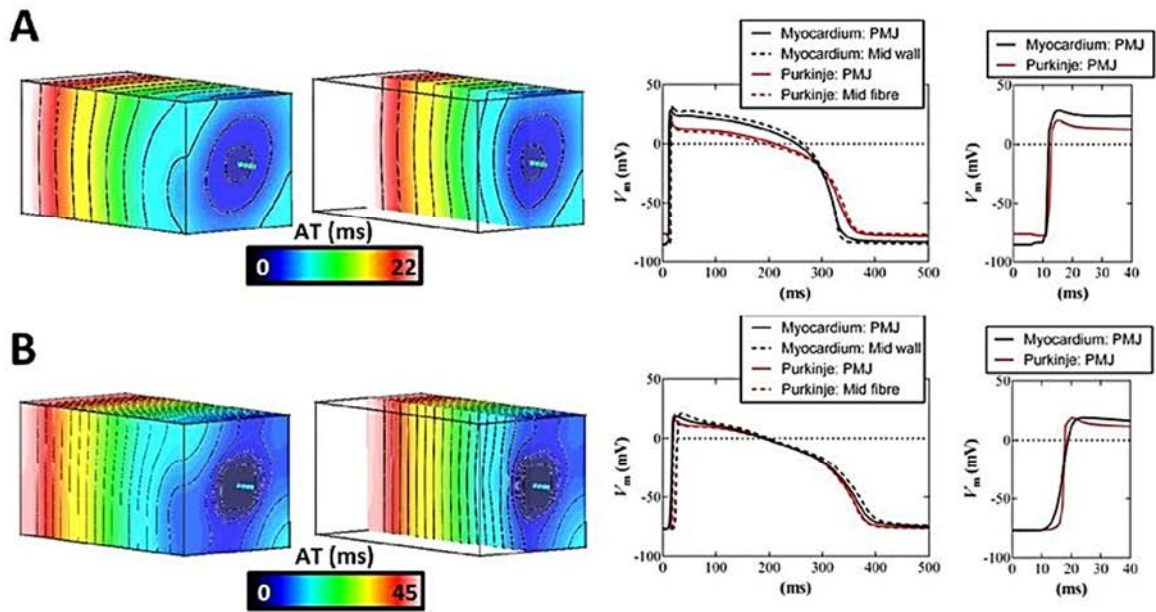


Figure 5.

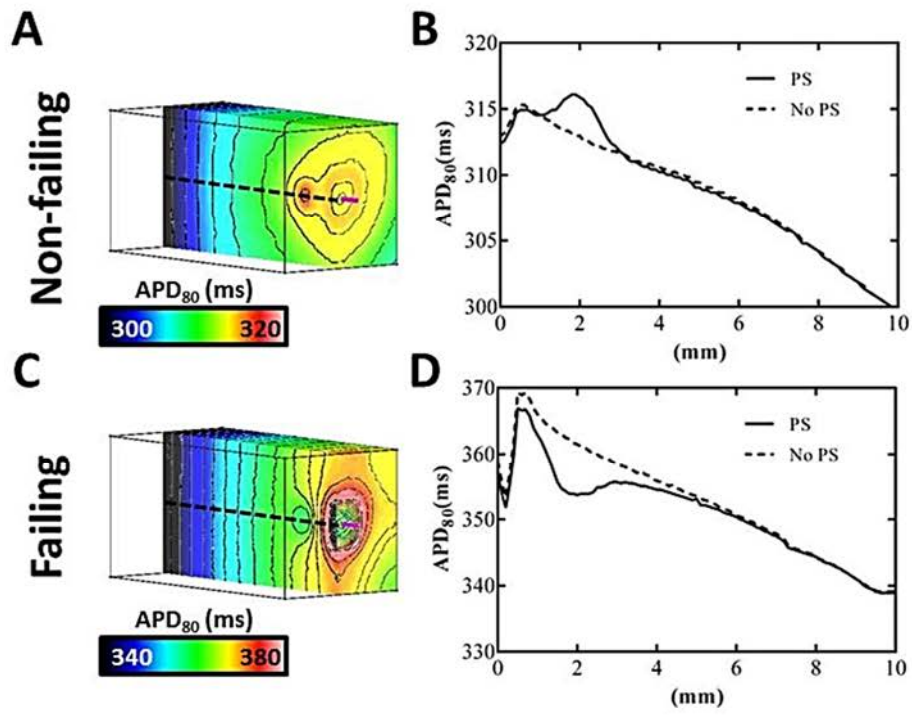


Figure 6.

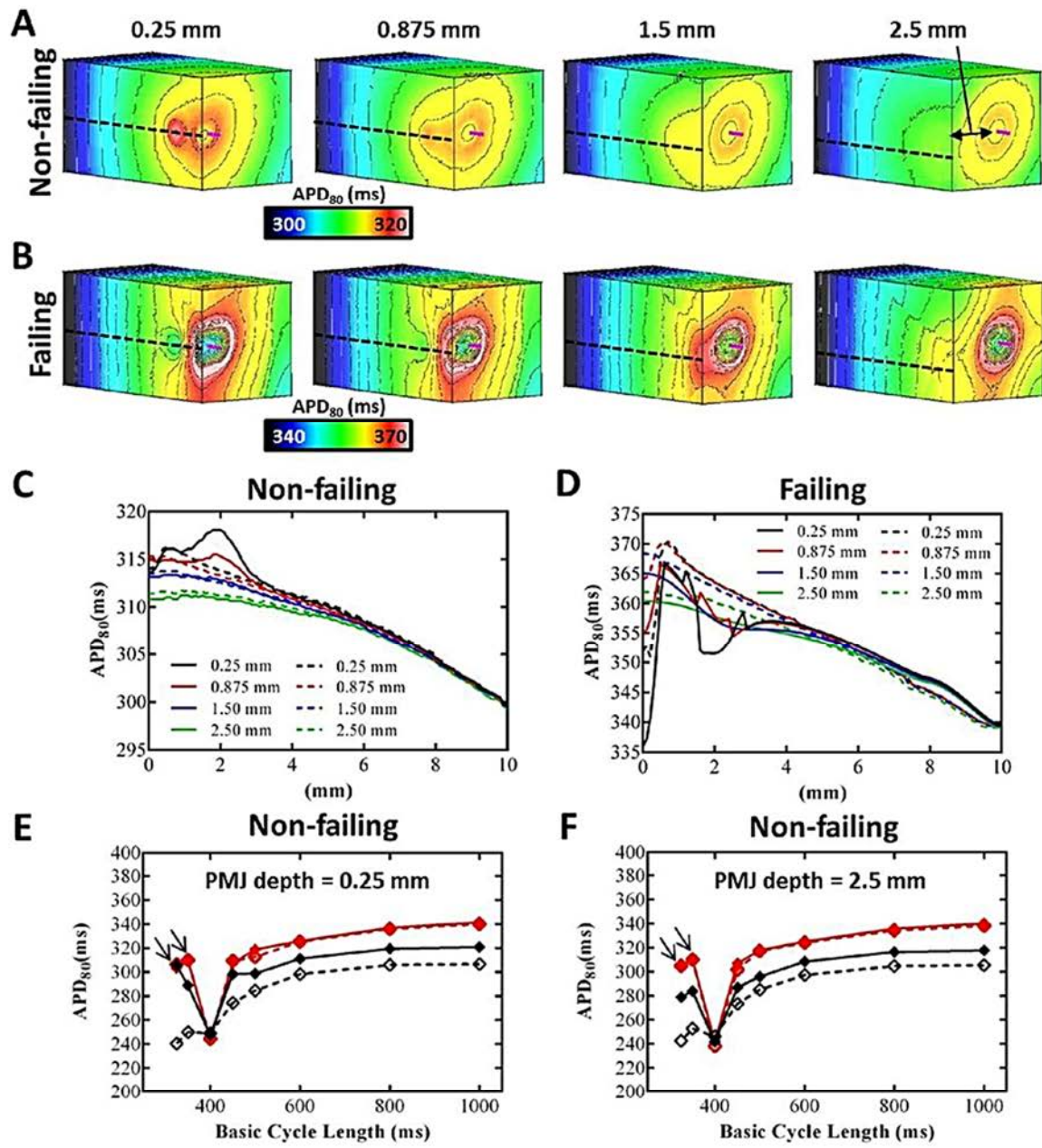
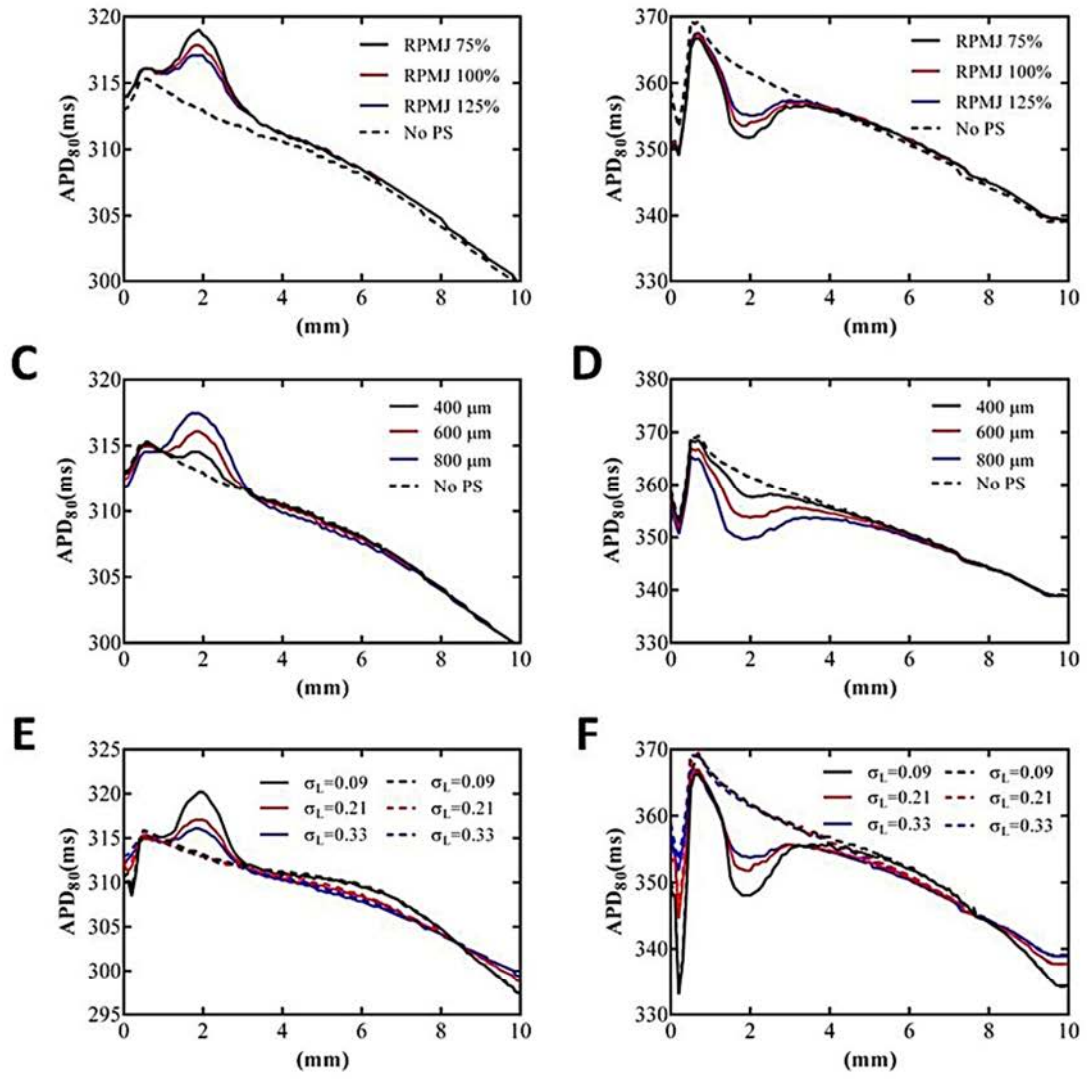


Figure 7.



1.3. Conclusion

Cette étude révèle le rôle crucial des PMJs dans la modulation locale de l'APD qui peut potentiellement avoir un impact sur l'hétérogénéité de repolarisation transmurale. Pour la suite de nos expériences, il paraissait donc important de s'intéresser à la modulation de cette hétérogénéité transmurale de repolarisation en fonction de la séquence d'activation.

2. Influence de la séquence d'activation sur l'hétérogénéité transmurale de la durée du potentiel d'action dans le myocarde sain et ischémique de brebis

2.1. Contexte et objectif

Une hétérogénéité anormale de l'APD des ventricules peut être la conséquence de certaines pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque ou l'ischémie aiguë du myocarde. Cette dernière conduit à un remodelage électrique des myocytes ventriculaires, diminuant le couplage cellulaire, réduisant la vitesse de conduction et augmentant ainsi l'hétérogénéité de l'APD (Cascio et al 1995, Shaw & Rudy 1997). Par ailleurs, il a précédemment été démontré que ce gradient transmural de l'APD pouvait être modulé par les influences électrotoniques chez le petit animal (Myles et al 2010, Walton et al 2013). En effet, lors de stimulations endocardiques, des prolongements de l'APD de l'endocarde ont été observés, et inversement lors de stimulations épicaudiques avec des PAs plus longs au sein de l'épicarde. Cependant, ces résultats restent à confirmer chez les grands mammifères.

Les PMJs présentant des propriétés électrophysiologiques différentes des myocytes ventriculaires dont une augmentation de l'APD (Dun & Boyden 2008, Myerburg et al 1970), ont également été impliquées dans l'apparition d'arythmies idiopathiques (Haissaguerre et al 2002a, Haissaguerre et al 2002b) ou d'arythmies consécutives à une ischémie du myocarde (Friedman et al 1973, Marrouche et al 2004). Notre précédente étude a notamment démontré que ces PMJs pouvaient contribuer à une hétérogénéité locale de l'APD (Walton et al 2014).

Le but de cette étude était de déterminer si la séquence d'activation jouait un rôle important dans la dispersion transmurale chez les grands mammifères et, si l'activation par le système de Purkinje pouvait moduler les gradients de repolarisation transmurale sur un myocarde sain ou ischémique. Plus précisément, si l'effet électrotonique maximal était retrouvé lors de la stimulation du Purkinje et si cette dernière possédait un rôle durant l'ischémie au niveau de l'hétérogénéité locale de l'APD au niveau des PMJs. Il s'agissait d'expériences de cartographie optique à partir de ventricules isolés et perfusés, stimulés par l'endocarde, l'épicarde ou les fibres de Purkinje, en condition contrôle ou ischémique et complétées par des simulations informatiques reproduisant le modèle expérimental et les conditions auxquelles il était soumis.

Mes travaux pour cette seconde étude ont consisté à définir l'hétérogénéité transmurale de l'APD sur le modèle expérimental de ventricule gauche de brebis isolé et perfusé, suivant une activation normale ou en mimant une activation ectopique provenant du système de conduction, en condition contrôle ou ischémique.

Cette étude est actuellement soumise à publication.

2.2. Article 2 : Influence of the activation sequence on the transmural action potential duration heterogeneity in the healthy and ischemic sheep myocardium

Les données supplémentaires de cet article se trouvent en annexe 2.

Influence of the activation sequence on the transmural action potential duration heterogeneity in the healthy and ischemic sheep myocardium

Marine E. Martinez MSc^{1,2,3}, Richard D. Walton PhD^{1,2,3}, Jason D. Bayer PhD^{1,5}, Michel Haïssaguerre M.D. ^{1,2,3,4}, Edward J. Vigmond PhD^{1,5}, Méléze Hocini M.D. ^{1,2,3,4} and Olivier Bernus PhD^{1,2,3}

All work was performed at: L'Institut de Rythmologie et Modelisation Cardiaque (LIRYC), Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Corresponding author: Marine Martinez
L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque (LIRYC)
CRCTB U1045
Hopital Xavier Arnozan,
Avenue du Haut Lévêque,
33604 Pessac,
France.
Tel : +33 (0) 5 35 38 19 54
Fax : +33 (0) 5 35 38 19 98
marine.martinez@ihu-liryc.fr

Short title: Activation modulates transmural repolarization

Funding sources

This work was supported by European Research Council [grant number SYMPHONY to M.E.M. & Mi.Ha.] and the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-10-IAHU04-LIRYC to M.E.M., R.D.W., J.D.B., Mi.Ha., E.J.V., Me.Ho. & O.B.].

Word count: 5924

¹ Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France;

² INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France;

³ IHU Liryc, Electrophysiology and Heart Modeling Institute, fondation Bordeaux Université, F-33600 Pessac-Bordeaux, France;

⁴ Bordeaux University Hospital (CHU), Cardiothoracic Pole, F-33600 Pessac, France;

⁵CNRS, IMB, UMR5251, F-33400 Talence, France.

Abstract

Background – Transmural action potential duration (APD) heterogeneity plays an important role in synchronizing ventricular repolarization.

Objective – Differential ion channel expression has been associated with this heterogeneity, but it has been hypothesized that the activation sequence, especially through the Purkinje network and its functional Purkinje-muscle junctions (PMJs), may also modulate repolarization heterogeneity. Ischemia is also known to affect repolarization heterogeneity in ventricles.

Methods – Optical mapping was performed on sheep left ventricular (LV) wedge preparations with intact free-running Purkinje network (N=7). Simultaneous epicardial (EPI) and endocardial (ENDO) recordings were obtained while the wedges were paced on either the free-running Purkinje fibers (PF), mimicking normal activation, or the ENDO or EPI surfaces. APDs were measured on each tissue surface and for each pacing configuration, before and after (7 min) the onset of no-flow ischemia. For direct comparison with experimental experiments simulations were acquired with a PMJ transmural tissue wedge using healthy and ischemic human ventricular and Purkinje models.

Results – In control conditions, we showed local APD heterogeneity correlated to the coupling of PMJ with the myocardium. We observed a significant transmural APD gradient for PF pacing with PMJ APD=363±19 ms and EPI APD=285±28 ms (gradient=77±16 ms, $p<0.001$). A similar transmural gradient was observed when pacing ENDO (51±36 ms; $p=0.010$). However, the gradient was reduced when pacing EPI (35±22 ms; $p=0.005$). In ischemia, we found that the mean ENDO APD and the mean EPI APD across all pacing locations were significantly reduced ($p=0.002$). However, the transmural APD gradient (98±34 ms) was significantly increased when pacing ENDO compared to control ($p=0.043$). Interestingly, no significant changes in transmural gradients were observed for PF pacing in control vs. ischemia ($p=0.63$). The results were consistent with simulations.

Conclusions – We find that the activation sequence modulates transmural APD in the sheep LV. Normal activation through the PF influences repolarization by locally increasing the PMJ APD in healthy and ischemic myocardium.

Keywords: Purkinje system, transmural heterogeneity, Purkinje-muscle junction, repolarization, optical mapping.

Abbreviations

AP – Action potential

APD – Action potential duration

AT – Activation time

CL – Cycle length

Cv_L – Longitudinal conduction velocity

Cv_T – Transversal conduction velocity

PMJ – Purkinje-muscle junction

PF – Purkinje fiber

σ_L – Longitudinal conductivity

σ_S – Transmural conductivity

σ_T – Transverse conductivity

VF – Ventricular fibrillation

Introduction

Transmural action potential duration (APD) heterogeneity is thought to play an important role in coordinating repolarization of the ventricles. Typically, the intrinsic APD of endocardial myocytes is greater than for epicardial cells, to maintain normal functioning of the heart. This gradient can be explained by a differential expression of ion channels between these cells¹. Cardiovascular diseases, such as acute ischemia, are also known to lead to abnormal repolarization heterogeneity in ventricles as a cause of acute electrical remodeling at the level of ventricular myocytes, decreasing cellular coupling, reducing conduction velocities and increasing APD heterogeneity^{2,3}.

The transmural gradient has been shown to be modulated by electrotonic influences in small animal models^{4,5}. It was demonstrated that homogeneous repolarization depends on a strong relationship between APD and activation time, in rat hearts. Suggesting that, in intact tissue, electrotonic modulation of APD dominates the effects of intrinsic transmural differences in cellular repolarization characteristics⁴. Those findings remain to be confirmed in large mammals.

An additional source of repolarization heterogeneity in the intact myocardium are Purkinje fibers (PF), which present differential electrophysiological properties including longer APD^{6,7}. At the junctional site between PF and the myocardium, electrotonic forces can predispose to APD prolongation local to the Purkinje-Muscle junction (PMJ)⁸. PF are also known to show resistance towards ischemic insults due to a high metabolic reserve^{9,10}. However, the impact of ischemia on the electrotonic influences of repolarization heterogeneity at the PMJ remain to be elucidated.

We hypothesized that the activation sequence plays an important role in determining the transmural dispersion of repolarization in healthy large mammals. Furthermore, local APD heterogeneity to the PMJ is augmented by the increased APD between ischemia-resistant PF and ischemic myocardium. We investigated this hypothesis by optical mapping experiments from left ventricular wedge preparations of sheep with activation originated from the endocardium, epicardium or free-running PF, mimicking normal anterograde activation. We repeated these protocols after the onset of no-flow ischemia. Finally, we simulated optical mapping experiments for direct comparison with experimental recordings.

Methods

Experimental preparation

Hearts were obtained from adult sheep (N=7; 45-62 kg) in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and the local ethical committee. Sheep were pre-medicated with ketamine (20 mg/kg) and acepromazine (Calmivet, 1 mL/50 kg). Anaesthesia was induced with intravenous injection (IV) of sodium pentobarbital (10 mg/kg) and maintained under isoflurane, 2%, in 100% O₂. Sheep were euthanized by sodium pentobarbital (40 mL, from 50 mg/mL of stock) and the heart rapidly excised, cannulated by the aorta and rinsed with cold cardioplegic solution, containing (mM): NaCl, 110; CaCl₂, 1.2; KCl, 16; MgCl₂, 16; NaHCO₃, 10 and glucose, 9.01 at 4°C. The left ventricular (LV) wall was dissected and cannulated by the left anterior descending artery. Coronary leaks were ligated with silk suture and the quality of perfusion was verified by injection of Methylene Blue dye (Sigma-Aldrich). LVs were mounted on to a frame to stretch and expose in a warm chamber, the endocardial and epicardial surfaces, facing the optical apparatus. Tissues were submersed and perfused (20 mL/min) with a saline solution containing (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 24; NH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1; glucose, 5.6; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; gassed with 95% O₂ / 5% CO₂ at 37°C (pH 7.4); and supplemented with blebbistatin (10 µM), to inhibit contraction.

Optical setup

Ventricles were stained with the potentiometric dye di-4-ANBDQBS (10 µM) which was excited by illumination of the endocardial and epicardial surfaces using monochromatic LEDs at 660 nm (Cain Research Ltd, Kent, UK). Two Micam Ultima CMOS cameras (SciMedia USA Ltd, CA, USA) with a 100x100 pixels resolution were used to obtain simultaneous synchronised recordings. Optical signals were acquired with a long-pass 715 nm filter, a spatial resolution of 700 µm/pixel and a frame rate of 1 kHz.

Optical mapping protocol

The wedges were paced by 5 ms pulses on the endocardial or epicardial surfaces, mimicking ectopic activity, or through the PF, mimicking normal activation. Optical signals were measured on each tissue surface and for each pacing configuration, before and after (7 min) the onset of no-flow ischemia.

Data analysis

Optical action potentials (APs) were normalized to 25% (DF/F_{max}) and were filtered using spatial averaging (kernel 2.1 mm) and temporal averaging (kernel 3 ms). Optical activation times (ATs) were determined by the time of maximal derivative during the AP upstroke and action potential duration (APD) was determined as the difference between the time of 90% of repolarization and AT. APDs were measured from a small area (2.8x2.8 mm²) at the origin of activation or the origin of breakthrough, on each surface and depending on the pacing location. For PF pacing only the earliest origin of activation was selected to dissociate true Purkinje-mediated activation from complex activation patterns caused by the non-uniform endocardial structure. Local endocardial APD was measured in a region distinct from all potential origins of activation mediated by PF. Dispersion of APD (µ) was measured as the difference between 5 and 95% confidence interval of normal sample distribution. Epicardial conduction velocities were analyzed using a program of MATLAB as previously described¹¹.

Ionic models

Membrane electrical activity (I_m) for all cell types was based on the Ten Tusscher 2 cell model¹². Supplemental table 1 lists modifications of each model parameter. Modifications were based upon a previous study⁸ but G_{Ca} and G_{Na} currents were modified to obtain similar APD

values of experimental findings (see supplemental table 1). Each cell type was subjected to 100 s of pacing at a constant basic cycle length of 1000 ms for stabilization and the last AP used for comparison of characteristics. States of ionic variables were captured 1 ms prior to stimulation of the last AP.

Human transmural ventricular wedge model

We used the well validated Purkinje-myocyte model developed by our group¹³⁻¹⁵. A finite element model of a three-dimensional transmural ventricular wedge, measuring 5x5x10 mm was considered at a spatial resolution of 0.1 mm. The model composed of an epicardial layer (2 mm), while the remaining 8 mm were endocardial. A single PF of length 3 mm was inserted such that fibers terminated at PMJs of depths of either 0.6 or 5 mm from the endocardium. The terminal point of the Purkinje strand is connected to myocardial nodes within a set radius of 600 μ m. One cut-transmural face was considered as the imaged face from which the PF was positioned. Electrical activity was solved with the CARP simulator¹⁶ using the monodomain approach with baseline conductivity value of 0.33 S/m in the longitudinal (σ_L), transverse (σ_T) and transmural (σ_S) directions, corresponding to a conductivity anisotropy ratio of 9:3:1. A 120° linear transmural fiber rotation was implemented. In non-ischemic and ischemic models, we identified the highest Purkinje-myocyte coupling resistance, R_{PMJ} , to the nearest 42 M Ω , that permitted anterograde transmission, which were 40.4 G Ω and 43.0 G Ω , respectively. Anterograde propagation delays were on the order of 7-8 milliseconds. To reproduce previous experimental protocols, the endocardial and the epicardial surfaces were stimulated by intracellular current injection, mimicking ectopic activity. Direct Purkinje stimulation mimicking normal activation (PF to myocardium) was also performed. Activation times were determined by a fixed threshold level of -10 mV to avoid capturing artifacts of stimulation or early depolarization of the AP foot manifest by large voltage gradients across the PMJ. APD was measured between activation and a 90% level of repolarization.

Statistical analysis

APD differences from endocardial- or epicardial groups were determined by paired t-tests and one-way repeated measures ANOVA for Purkinje-stimulated group. Statistical differences for transmural gradient and PMJ APDs were determined by one-way ANOVA. Comparisons between groups used paired t-tests.

Results

APD distribution following the pacing location

Optical images from the endocardial and epicardial surfaces of the sheep were obtained to investigate the relationship between the activation sequence and the transmural distribution of APD₉₀. Figure 1 shows endocardial and epicardial AT and APD₉₀ maps and corresponding AP traces derived from LV wedge preparations when pacing the endocardium (ENDO), epicardium (EPI) or free-running PF at 1 Hz. A total AT of 54, 49 and 42 ms were found across the LV when pacing ENDO, EPI and PF; respectively (left panel). The corresponding transmural distribution of APD₉₀ was more pronounced during ENDO and EPI stimulations (119 ms and 129 ms; respectively) compared to PF pacing (96 ms) (middle panel). Optical APs from the origin of activation or the origin of breakthrough (dashed arrows), depending on the pacing location, were compared and aligned by the maximal derivative of the upstroke (right panel). A transmural APD gradient was observed for all pacing locations. During PF stimulation (figure 1C), the spatial distribution of APD₉₀ was heterogeneous ($\mu=201\pm76$ ms). As previously described⁸, we observed the longest APD₉₀ (315 ms) at sites of earliest endocardial AT compared to later activated regions on ENDO. Although a heterogeneous pattern of APD₉₀ was also found during ENDO ($\mu=228\pm77$ ms) and EPI ($\mu=274\pm80$ ms) pacing, spatial dispersion of APD₉₀ did not correlate with AT (figure 1A and B). Interestingly, for ENDO and EPI stimulations, the longest APD₉₀ were found at similar sites as the endocardial PMJ. Moreover, during PF pacing we observed two types of AT responses that corresponded to either earliest activation at one surface with long activation latencies on the opposing surface ($n=4$) or near simultaneous activation of epicardial and endocardial surfaces ($n=3$).

Modulation of the transmural APD heterogeneity by the activation sequence

Figure 2A shows transmural APD restitution from ENDO, EPI and PF stimulations, ranging from 286 (effective refractory period) to 1000 ms for ENDO and EPI pacing and from 333 (effective refractory period) to 1000 ms for PF pacing. APDs were measured locally at origin of activation or origin of breakthrough on each surface, as shown in figure 1. Figure 2B indicates transmural APD gradients between ENDO and EPI (endocardial - epicardial APDs), when pacing ENDO, EPI or PF at different pacing cycle length. We observed a significant transmural gradient for PF pacing for all frequencies tested, with PMJ APD=363±19 ms and EPI APD=285±28 ms (gradient=77±16 ms, $p<0.001$). A similar transmural gradient was observed, albeit reduced, when pacing ENDO (51±36 ms; $p=0.010$). EPI pacing revealed the smallest transmural APD gradient (35±22 ms; $p=0.005$). At higher frequencies, EPI APD (233±21 ms) became greater than ENDO APD (221±16 ms) when pacing EPI and transmural gradient became negative (-12±17 ms) and significantly different to ENDO (28±29 ms, $p<0.029$) and PF (57±12 ms, $p<0.003$) gradient. Figure 1C shows Mean±SD PMJ APD and corresponding AP traces when pacing ENDO, EPI and PF; respectively at 1 Hz. Interestingly, there was no significant APD difference ($p>0.05$), longest APD remains at PMJ site independently of the pacing location, as shown in figure 1.

Modulation of APD dispersion during acute ischemia

In control conditions, a strong relationship between APD₉₀ and AT was observed during PF pacing but not for ENDO and EPI stimulations. Figure 3 shows endocardial and epicardial AT and APD₉₀ maps and corresponding AP traces, when pacing ENDO, EPI and PF at 1 Hz, as in figure 1, but after 7 min of no-flow ischemia. A prolongation of total AT across the LV was found in ENDO and EPI stimulations (242 ms and 191 ms; respectively) compared to PF pacing (42 ms) or control conditions (figure 1) (left panel). The corresponding transmural gradient of APD₉₀ was more pronounced for all pacing locations (156 ms ENDO; 145 ms EPI; 154 ms PF) compared to control (figure 1) (middle panel). However, the pacing location had no bearing on the transmural APD gradient (right panel). Interestingly, for all pacing sites the spatial distribution of APD₉₀ ($\mu=257\pm80$ ms ENDO; $\mu=280\pm122$ ms EPI; $\mu=288\pm43$ ms PF) was

heterogeneous and endocardial and epicardial regions of early activation were associated with the longest APD₉₀ that became gradually shorter with AT. Furthermore, the endocardial profile of longest APD₉₀ at PMJ sites were preserved for ENDO and EPI pacing and during PF stimulation an active junction was lost after ischemic conditions compared to control (figure 1C).

Validation of ischemia protocol

Figure 4A shows epicardial AT maps during EPI stimulation at 1 Hz, before (CTL) and after (ISC) 7 min of ischemia. We observed a prolongation of total AT from 51 ms to 104 ms before and after ischemia; respectively. The anisotropic propagation observed in control conditions was lost after ischemia. Figure 4B indicates Mean±SD longitudinal (Cv_L) and transversal conduction velocities (Cv_T) and their ratio from epicardial surface when pacing EPI at 1 Hz, in CTL versus ISC conditions. Figure 4C shows corresponding AP and upstroke traces in figure 4A, from the origin of activation before and after ischemia. As previously described^{17, 18}, we observed a diminution of APD, a significant decrease in Cv_L and Cv_T and a significant increase of their ratio, after ischemia ($p < 0.05$).

Influence of ischemia on the transmural APD gradient

Figure 5A shows comparisons of Mean±SD APD from endocardial and epicardial surfaces during ENDO, EPI and PF stimulation at 1 Hz, before (CTL) and after (ISC) 7 min of ischemia. APDs were measured locally as shown in figure 1. Figure 5B indicates Mean±SD ENDO and EPI APD depending on ENDO or EPI pacing at 1 Hz, in control or ischemic conditions. We found that the mean ENDO APD across all pacing locations was reduced from 357±37 ms to 337±43 ms ($p = 0.002$) and the mean EPI APD was reduced from 302±47 ms to 266±42 ms ($p = 0.002$) (data not shown). Although, a general diminution of APD was observed, the transmural gradient during ischemia was preserved for all pacing sites. However, the transmural APD gradient (98±34 ms) was significantly increased when pacing ENDO compared to control ($p = 0.043$). And, no significant changes in transmural gradients were observed for PF pacing in control versus ischemic conditions ($p = 0.63$) (data not shown). Moreover, differences between ENDO APDs when pacing ENDO versus EPI (367±44 ms vs. 342±32 ms, $p = 0.040$) in control conditions were lost in ischemia ($p = 0.22$). Interestingly, it was the opposite for EPI APDs which were not different when pacing ENDO or EPI ($p = 0.48$) in control but became significantly different (245±38ms vs. 291±31ms, $p = 0.002$) during ischemic conditions with a more pronounced effect of EPI stimulation. Figure 5C shows Mean±SD PMJ APD and corresponding AP traces, as in figure 2, for all pacing locations, before and after ischemia. Contrary to control conditions there was a significant APD difference ($p < 0.05$) when pacing PF compared to ENDO or EPI pacing. The longest APD at PMJ site was preserved even in ischemic conditions, as shown in figure 3.

Modulation of the transmural APD heterogeneity validated by human wedge simulations

Simulations were performed at 1 Hz pacing from ENDO, EPI and PF to mimic experiments. AT and APD maps of transmural cross-section intersecting the PMJ and corresponding APD profiles were derived for control (figure 6) and ischemic (figure 7) myocardium. In general, APD negatively correlated with AT. Yet prolongation of APD was always observed at the PMJ and corresponded to the maximum observable APD in all simulations. In control simulations (figure 6), ENDO and PF pacing developed APD gradients of 70 and 68 ms, respectively; whereas transmural APD differences were only 49 ms for EPI stimulation. APD at the PMJ was greatest in myocardial nodes when excitation was elicited from PF to the myocardium (407 ms) versus 403 and 396 ms for ENDO and EPI origins, respectively. Ischemic myocardium (figure 7) showed global shortening of APD versus controls (295±20 ms vs. 373±21 ms; data are PF pacing). An increasing APD gradient from EPI to ENDO was preserved but increased for all pacing locations: ENDO (79 ms); EPI (58 ms) and PF (78 ms), compared with controls. Comparison between APDs at the mid-point along transmural profile and at the PMJ in

myocardium showed APD elevation at the PMJ for ENDO (11 ms), EPI (7 ms) and PF (9 ms) stimulations. This effect was more pronounced during ischemia and for all pacing sites (34 ms ENDO; 32 ms EPI; 33 ms PF). Moreover, free-running PF APD in control and ischemic (408 ± 1 ms and 356 ± 1 ms; data are PF pacing) conditions revealed the presence of a PF-myocardium gradient which was more elevated during ischemia (61 ms) compared to control (35 ms). Thus, APD modulation at the PMJ was more pronounced in ischemia versus control.

Discussion

This present study aimed to characterize the influence of the activation sequence on transmural dispersion of repolarization in the healthy and ischemic myocardium. Such mechanisms were investigated experimentally and computationally by comparing sheep LV before and after the onset of no-flow ischemia. Using endo- and epi-fluorescence optical imaging we found in control conditions, that PF stimulation induced an increase of APD heterogeneity with a significant transmural APD gradient which was similar when pacing ENDO but reduced during EPI stimulation (figures 1 and 2). In ischemic conditions, no significant changes in this transmural gradient was observed for PF pacing whereas it was significantly increased when pacing ENDO compared to control (figures 3 and 5). The results were consistent with simulations (figures 6 and 7).

Transmural APD heterogeneity

Previous studies on human and rabbit^{4, 19} cut surface wedge preparations of LV shown that electrotonic influences are important in determining the transmural repolarization sequence in ventricular myocardium and that they are sufficient to overcome intrinsic differences in the electrophysiological properties of the cells across the ventricular wall⁴. In the current study, optical measurements from endocardial and epicardial surfaces of sheep LV revealed transmural APD characteristics comparable to those recorded from the cut surface. We demonstrated the presence of an increasing transmural APD gradient from EPI to ENDO. However, the magnitude of the gradient was dependent upon pacing location; normal activation (PF pacing) or ectopic activity (ENDO and EPI pacing) (figure 2). Moreover, our experimental results are in agreement with earlier studies demonstrating in pig LV wedge preparations that endocardial spatial distributions of APD had a relatively poor dependence on the activation sequence. Due to the plateau phase and the late phase 3 repolarization, the overall gradient of the transmembrane potential during repolarization was reduced and consequently dampened electrotonic modulation⁵. This is further supported by simulations shown in figure 7 that showed the presence of a transmural APD heterogeneity when pacing PF which were similar during ENDO pacing but strongly reduced during EPI stimulation. We showed that in sheep LV, the activation sequence did not modulate endocardial and epicardial spatial distributions of APD owing to AP morphology which are similar to human and pig (figure 1).

Purkinje modulation

This study has confirmed previous results obtained by our team showing that PF coupled to the myocardium modulates locally the APD in the myocardium⁸. We found during PF pacing the longest APD at sites of earliest endocardial AT compared to later activated regions on ENDO (figure 1 and figure 2). This suggests a role for PF in changing transmural heterogeneity of repolarization⁸. Unexpectedly, during ENDO and EPI stimulations longest APDs were found at similar sites as the PMJ (figure 1) and there was no significant PMJ APD difference depending on the pacing location (figure 2). This results suggest that PMJ APDs were not modulated by the activation sequence, but dependent upon coupling with PFs and their intrinsic APD. Moreover, it is well known that PFs in sheep have transmural distribution, which enables both, surface and intramural origins of activation. These were determined from the normalized amplitude of the maximal derivative of AP upstrokes (V_f)^{20, 21} and correlate to APD heterogeneity⁸. Within the population of sheep LV preparations, we observed two types of transmural activation profiles when stimulating through PFs: ENDO to EPI activation and simultaneous EPI and ENDO activation (supplementary figures 1 and 3). Our study is the first to investigate the role of the Purkinje network to modulate transmural repolarization gradients in the healthy myocardium of large mammals.

Acute ischemia

We used a model of acute ischemia corresponding to 7 min no-flow in coronary-perfused tissue shown in figure 4 that showed a diminution of APD, a significant decrease in longitudinal and transversal conduction velocities and an increase of conduction anisotropy, as previously described^{3, 17, 18}. Acute ischemia in our experimental preparations (figure 3) was associated with a prolongation of total AT for ENDO and EPI pacing and an increase of APD dispersion for all pacing sites, compared to control conditions (figure 1). Furthermore, endocardial and epicardial spatial distributions of APD showed a strong dependence on the activation sequence as a result of inactivation of sodium current² or early cellular uncoupling⁵. Transmural APD gradients were greater during acute ischemia compared to control. This may be partially explained by the differential ATP sensitivity of ATP-regulated K⁺ channels across the ventricular wall which are more sensitive in EPI^{2, 13} and therefore more susceptible to the decrease of ATP during ischemia^{2, 22}. APD maxima were localized to PMJs, independent of the pacing location (figure 3) in control conditions whereas during ischemia PMJ APD was significantly much longer when pacing PF compared to ENDO or EPI stimulations (figure 5). This is due to the high glycogen content of PFs, which indicates that the fibers metabolize the glycogen with anaerobic enzymes providing greater resistance to hypoxia than is found in the ventricular myocardium^{9, 10}. As such, APD diminution in the myocardium was not coincidental with a decrease of APD in the PF, as modelled in simulations. Furthermore, we found a significant decrease of PMJ number during ischemia and we identified 3 different modulations of active PMJs: identical active junctions, loss of an active junction (figure 3), or new active junction (supplementary figure 4). This raises complexity of the Purkinje system with functional and nonfunctional junctions whose activation can be modulated during ischemia. This highlights potential for both functional and quiescent PMJs in transmural heterogeneities of repolarization.

Clinical implications

Prolongation and alterations in the morphology of the T wave on the clinical ECG are associated with sudden cardiac death²³. Transmural APD heterogeneity in the ventricular wall is known to underlie the T wave in humans. The end of the T wave is governed by the latest repolarizing zone, typically associated to cells with the longest APD, previously thought to be M cell^{19, 24}. But according to this study, PFs appear to have an important role in the dispersion of repolarization heterogeneity particularly during acute ischemic insult. Furthermore, increased repolarization heterogeneity may be a potential source of arrhythmogenesis through re-excitation of tissue^{19, 25}. Earlier studies using a canine ventricular fibrillation (VF) infarction model showed that PFs survived acute ischemia and were found to be involved in both triggered and reentrant arrhythmias^{26, 27}. Recently, the Purkinje system have been shown to be responsible for the initiation of VF in patients with no structural heart disease^{28, 29}. A similar mechanism has also been reported in patients with postinfarct ischemia, which appear to be driven by Purkinje-like triggered activity originating from the scar border zone^{30, 31}. However, mechanisms underlying these arrhythmias at tissue level are still poorly understood. Studies to investigate in more detail the influence of the Purkinje system as an arrhythmogenic substrate of VF in healthy or diseased myocardium represent a real challenge for the development of clinical therapy.

Limitations

Optical mapping of electrical activity directly from the transmural surface were not performed in this study as previously performed. This approach requires imaging from a cut surface whereby a tissue boundary is artificially imposed on the tissue preparation at the imaged surface. Tissue boundaries have a direct impact on electrical loading conditions and thus amplifies apparent repolarization heterogeneities of tissue. Instead, we sought to quantify electrotonic modulation of repolarization and the influence of PF coupling from intact myocardium to preserve in situ repolarization heterogeneities. Furthermore, our preparations

preserved the structural integrity of the PF network and enabled activation from the PF network via stimulation of free-running PFs. Nevertheless, many parameters are missing to characterize completely the PMJ, especially in human hearts which have a different distribution of the network. Moreover, this current study did not investigate trigger mechanisms of ventricular arrhythmias but provided a potential role of PF as a substrate of transmural heterogeneity of repolarization.

Conclusions

This study demonstrated that PFs played an important role in the transmural dispersion in the sheep LV. Modulation of the activation sequence in ventricular myocardium leads to dynamic repolarization gradients. However, coupling to PFs maintains localized elevation of APD and transmural dispersions of repolarization, irrespective of the origin of activation. Furthermore, reduction of myocardial APD following a global ischemic insult augments APD heterogeneity between myocardium at the PMJ and surrounding tissue, which elevates the transmural dispersion of repolarization.

Acknowledgements

The authors would like to thank the following people for valuable contributions: Rokhaya Faye, Caroline Cros, Caroline Pascarel-Auclerc and Fabien Brette.

References

1. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* Oct 2005;85:1205-1253.
2. Shaw RM, Rudy Y. Electrophysiologic effects of acute myocardial ischemia. A mechanistic investigation of action potential conduction and conduction failure. *Circulation research* Jan 1997;80:124-138.
3. Cascio WE, Johnson TA, Gettes LS. Electrophysiologic changes in ischemic ventricular myocardium: I. Influence of ionic, metabolic, and energetic changes. *Journal of cardiovascular electrophysiology* Nov 1995;6:1039-1062.
4. Myles RC, Bernus O, Burton FL, Cobbe SM, Smith GL. Effect of activation sequence on transmural patterns of repolarization and action potential duration in rabbit ventricular myocardium. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* Dec 2010;299:H1812-1822.
5. Walton RD, Benson AP, Hardy ME, White E, Bernus O. Electrophysiological and structural determinants of electrotonic modulation of repolarization by the activation sequence. *Frontiers in physiology* 2013;4:281.
6. Myerburg RJ, Stewart JW, Hoffman BF. Electrophysiological properties of the canine peripheral A-V conducting system. *Circulation research* Mar 1970;26:361-378.
7. Dun W, Boyden PA. The Purkinje cell; 2008 style. *Journal of molecular and cellular cardiology* Nov 2008;45:617-624.
8. Walton RD, Martinez ME, Bishop MJ, Hocini M, Haissaguerre M, Plank G, Bernus O, Vigmond EJ. Influence of the Purkinje-muscle junction on transmural repolarization heterogeneity. *Cardiovasc Res* Sep 1 2014;103:629-640.
9. Ono N, Yamaguchi T, Ishikawa H, Arakawa M, Takahashi N, Saikawa T, Shimada T. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Archives of histology and cytology* 2009;72:139-149.
10. Tanaka H, Hamamoto T, Takamatsu T. Toward an Integrated Understanding of the Purkinje Fibers in the Heart: The Functional and Morphological Interconnection between the Purkinje Fibers and Ventricular Muscle. *Acta Histochemica Et Cytochemica* 2005;38:257-265.
11. Doshi AN, Walton RD, Krul SP, de Groot JR, Bernus O, Efimov IR, Boukens BJ, Coronel R. Feasibility of a semi-automated method for cardiac conduction velocity analysis of high-resolution activation maps. *Computers in biology and medicine* Oct 1 2015;65:177-183.
12. ten Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. A model for human ventricular tissue. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* Apr 2004;286:H1573-1589.
13. Boyle PM, Masse S, Nanthakumar K, Vigmond EJ. Transmural IK(ATP) heterogeneity as a determinant of activation rate gradient during early ventricular fibrillation: mechanistic insights from rabbit ventricular models. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* Nov 2013;10:1710-1717.
14. Deo M, Boyle P, Plank G, Vigmond E. Arrhythmogenic mechanisms of the Purkinje system during electric shocks: a modeling study. *Heart Rhythm* Dec 2009;6:1782-1789.
15. Zamiri N, Ramadeen A, Masse S, et al. Dantrolene Improves Survival Following Ventricular Fibrillation by Mitigating Impaired Calcium Handling in Animal Models *Circulation*;In-press.
16. Vigmond EJ, Hughes M, Plank G, Leon LJ. Computational tools for modeling electrical activity in cardiac tissue. *J Electrocardiol* 2003;36 Suppl:69-74.
17. Mizumaki K, Fujiki A, Tani M, Misaki T. Effects of acute ischemia on anisotropic conduction in canine ventricular muscle. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* Aug 1993;16:1656-1663.
18. Kleber AG, Riegger CB, Janse MJ. Electrical uncoupling and increase of extracellular resistance after induction of ischemia in isolated, arterially perfused rabbit papillary muscle. *Circulation research* Aug 1987;61:271-279.

19. Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circulation research* Mar 19 2010;106:981-991.
20. Hyatt CJ, Zemlin CW, Smith RM, Matiukas A, Pertsov AM, Bernus O. Reconstructing subsurface electrical wave orientation from cardiac epi-fluorescence recordings: Monte Carlo versus diffusion approximation. *Optics express* Sep 1 2008;16:13758-13772.
21. Walton RD, Smith RM, Mitrea BG, White E, Bernus O, Pertsov AM. Extracting surface activation time from the optically recorded action potential in three-dimensional myocardium. *Biophysical journal* Jan 4 2012;102:30-38.
22. Scheinman MM. Role of the His-Purkinje system in the genesis of cardiac arrhythmia. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* Jul 2009;6:1050-1058.
23. Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, et al. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation* Dec 5 2000;102:2849-2855.
24. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circulation research* Jun 1991;68:1729-1741.
25. Kuo CS, Munakata K, Reddy CP, Surawicz B. Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. *Circulation* Jun 1983;67:1356-1367.
26. Dossall DJ, Tabereaux PB, Kim JJ, Walcott GP, Rogers JM, Killingsworth CR, Huang J, Robertson PG, Smith WM, Ideker RE. Chemical ablation of the Purkinje system causes early termination and activation rate slowing of long-duration ventricular fibrillation in dogs. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* Aug 2008;295:H883-889.
27. Tabereaux PB, Walcott GP, Rogers JM, Kim J, Dossall DJ, Robertson PG, Killingsworth CR, Smith WM, Ideker RE. Activation patterns of Purkinje fibers during long-duration ventricular fibrillation in an isolated canine heart model. *Circulation* Sep 4 2007;116:1113-1119.
28. Haissaguerre M, Shah DC, Jais P, et al. Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet (London, England)* Feb 23 2002;359:677-678.
29. Haissaguerre M, Shoda M, Jais P, et al. Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* Aug 20 2002;106:962-967.
30. Marrouche NF, Verma A, Wazni O, et al. Mode of initiation and ablation of ventricular fibrillation storms in patients with ischemic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* May 5 2004;43:1715-1720.
31. Szymowski L, Sanders P, Walczak F, Hocini M, Jais P, Kepski R, Szufladowicz E, Urbanek P, Derejko P, Bodalski R, Haissaguerre M. Mapping and ablation of polymorphic ventricular tachycardia after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* Oct 19 2004;44:1700-1706.

Figure legends

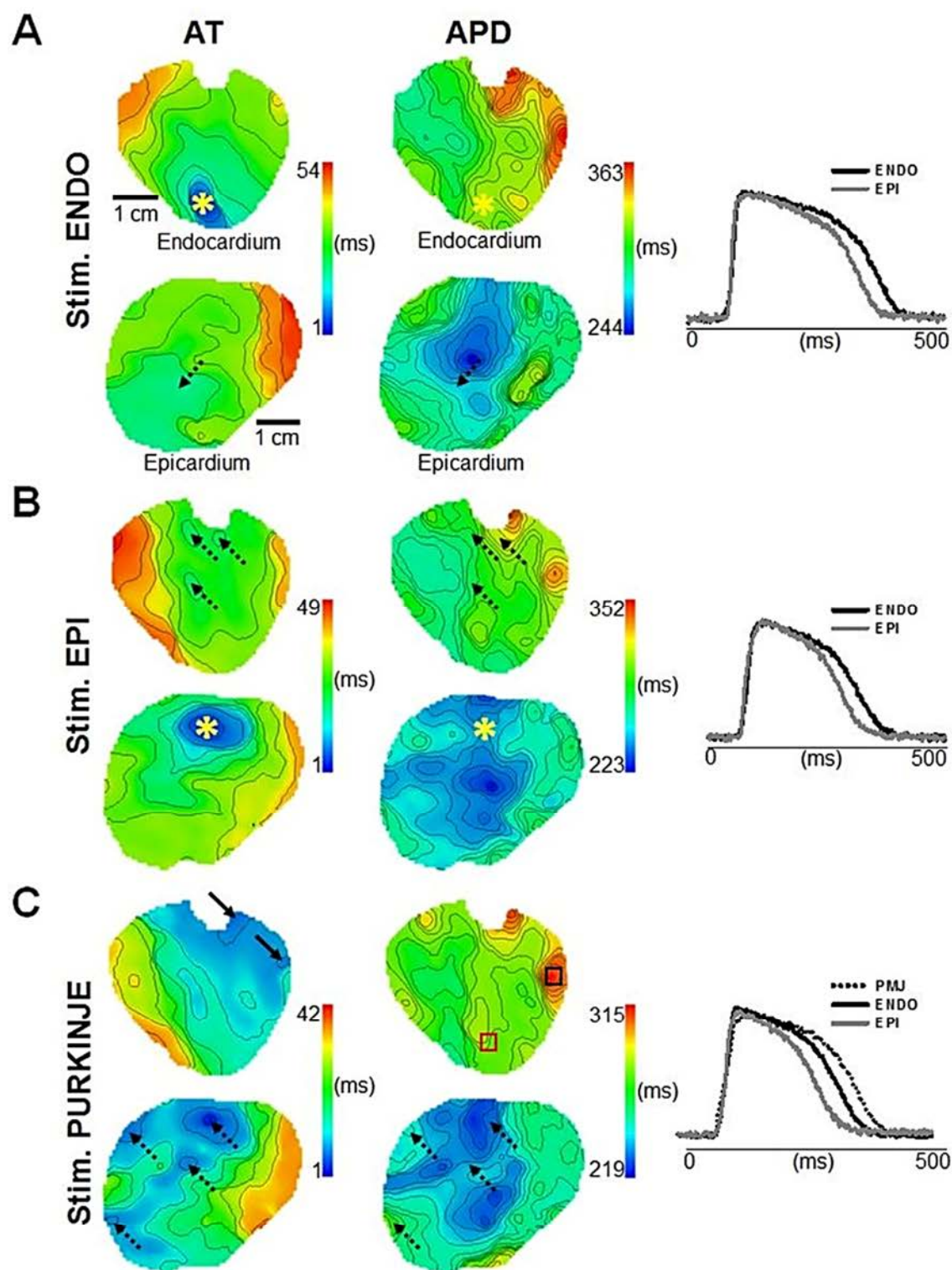


Figure 1. Influence of pacing location on endocardial and epicardial APD. Endocardial and epicardial AT and APD maps and corresponding AP traces derived from LV preparations when pacing at 1 Hz on the ENDO (A), EPI (B) or PF (C), by site marked (*). C, Origins of early activation during PF pacing are localized by arrows. Regions for APD measurements are indicated by the black box for PMJ and the red box for ENDO. Dashed arrows show origins of breakthrough. Isochrones are 5 ms spacing for AT and APD maps.

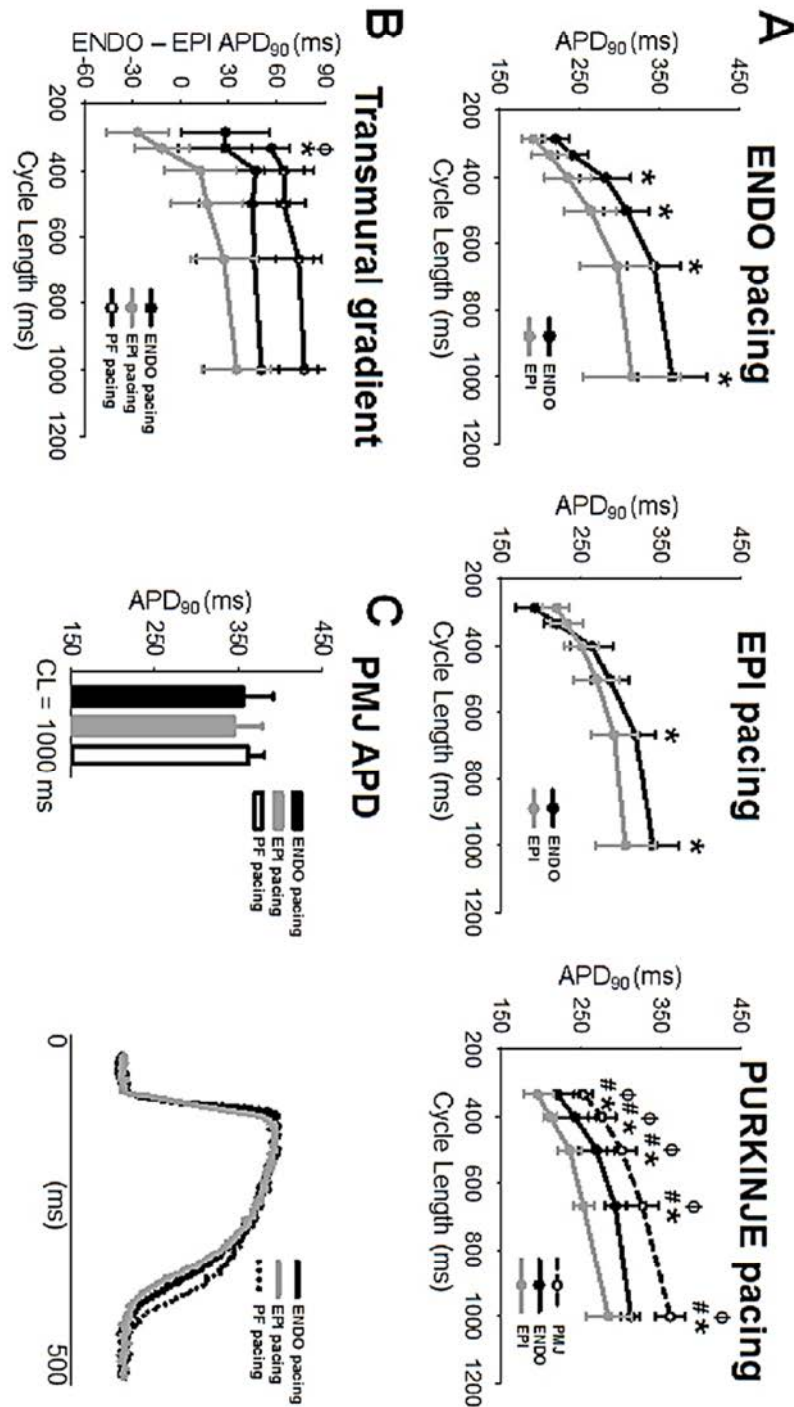


Figure 2. Dependence of transmural APD heterogeneity on the activation sequence. **A**, Frequency-dependence of transmural differences of APD for ENDO ($n=7$), EPI ($n=7$) and PF ($n=4$) stimulation sites. APD measurements were performed at origins of activation or origins of breakthrough on each surface for each stimulus location (black box shown in **Figure 1**). **B**, Transmural differences of APD when pacing ENDO, EPI and PF at different frequencies. **C**, Mean $\pm$ SD APD at the PMJ for ENDO, EPI or PF stimulation at 1 Hz (upper panel) and corresponding AP traces (lower panel). CL=cycle length. Statistical differences were determined by paired t-tests for ENDO and EPI pacing (* $p<0.05$), one-way repeated measures ANOVA for PF stimulation (PMJ vs EPI, * $p<0.05$; PMJ vs ENDO, # $p<0.05$; ENDO vs EPI, $\phi p<0.05$) and one-way ANOVA for transmural gradient (PF vs EPI pacing, * $p<0.05$; ENDO vs EPI pacing, $\phi p<0.05$).

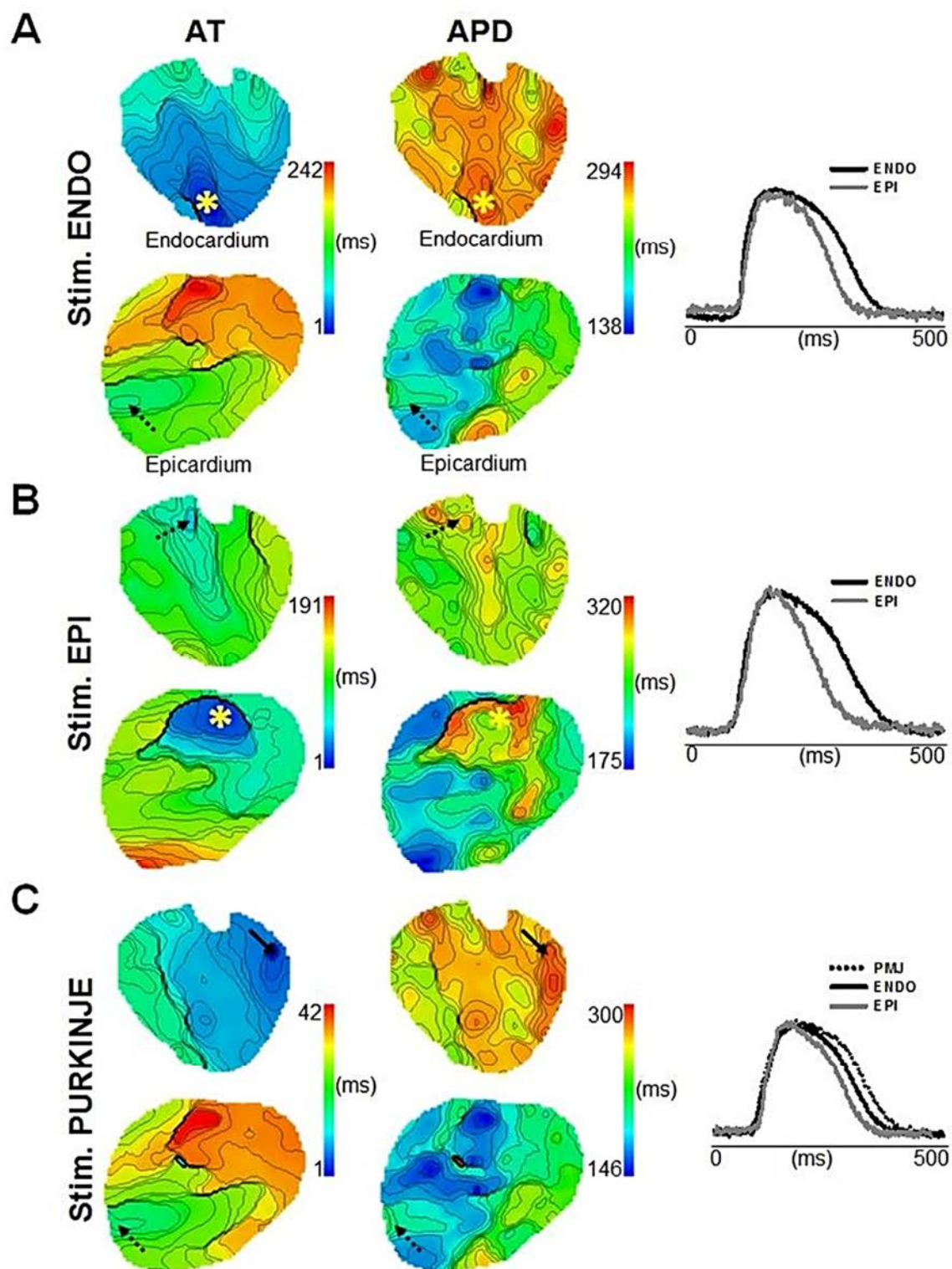


Figure 3. Impact of ischemia on transmural APD heterogeneity. Endocardial and epicardial AT and APD maps and corresponding AP traces as shown in **Figure 1** for ENDO (**A**), EPI (**B**) and PF (**C**) pacing. Stimulation sites are indicated by (*), arrows show origins of early activation for PF stimulation in (**C**) and dashed arrows indicate origin of breakthrough. Isochrones are 5 ms spacing for endocardial maps and 10 ms for epicardial maps.

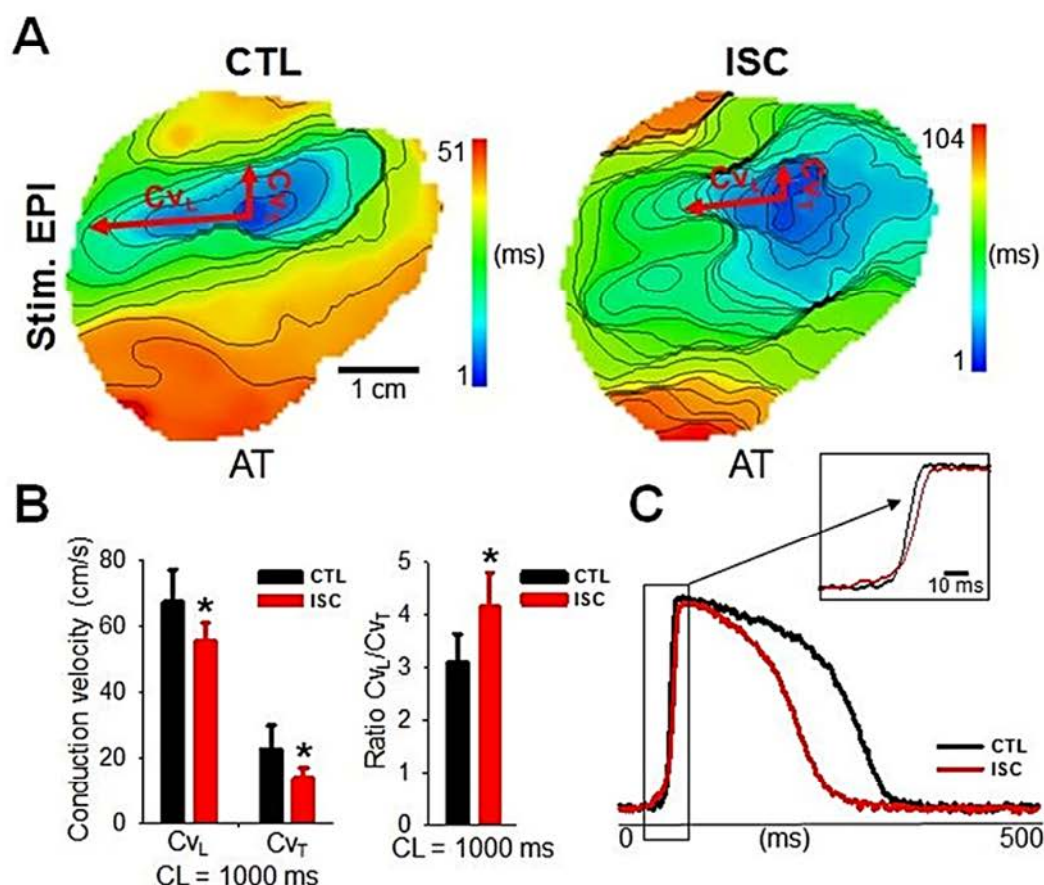


Figure 4. Conduction velocity before and after the onset of no-flow ischemia. A, Epicardial AT maps during EPI stimulation at 1 Hz, before and after 7 min of no-flow ischemia. Isochrones are 5 ms spacing. CTL=control, ISC=ischemia. **B,** Longitudinal (Cv_L) and transversal (Cv_T) conduction velocity and their ratio from EPI surface when pacing EPI at 1 Hz, in control versus ischemic conditions. **C,** AP traces and corresponding upstrokes extracted from the origin of activation when pacing EPI at 1 Hz, during CTL or ISC. Statistical differences were determined by paired t-tests (* $p < 0.05$).

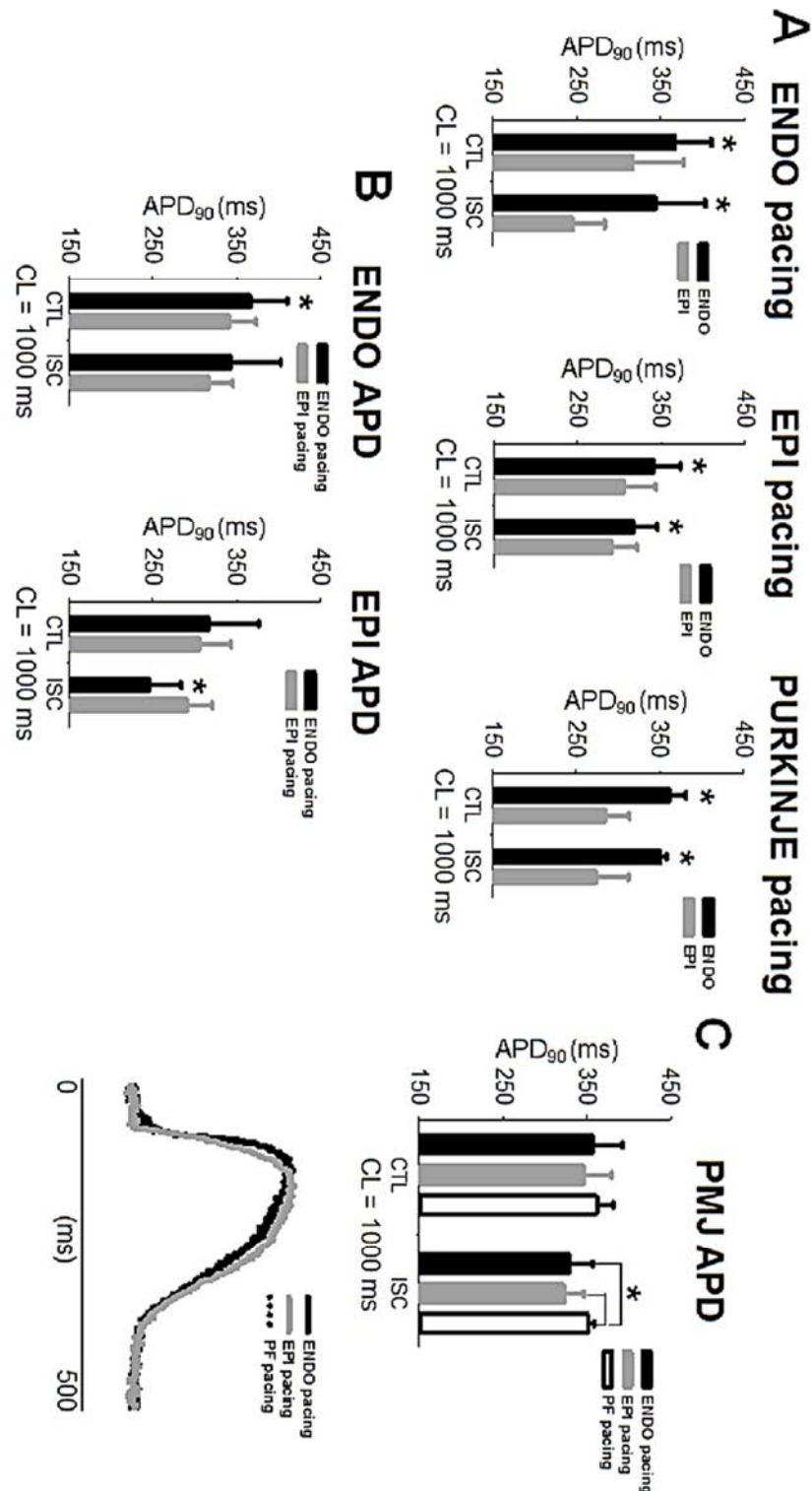


Figure 5. Greater resistance of Purkinje network to ischemia. **A**, Mean±SD APD from ENDO and EPI surfaces for each stimulus location stimulation at 1 Hz, before and after 7 min of ischemia. CTL=control, ISC=ischemia. **B**, Effects of ENDO and EPI pacing at 1 Hz on Mean±SD ENDO and EPI APD in CTL or ISC. **C**, Mean±SD PMJ APD (upper panel) and corresponding AP traces (lower panel), as in **Figure 2**, are shown for all pacing locations, before and after ISC. Statistical differences were determined by paired t-tests for pacing conditions and APD comparisons (*p<0.05).

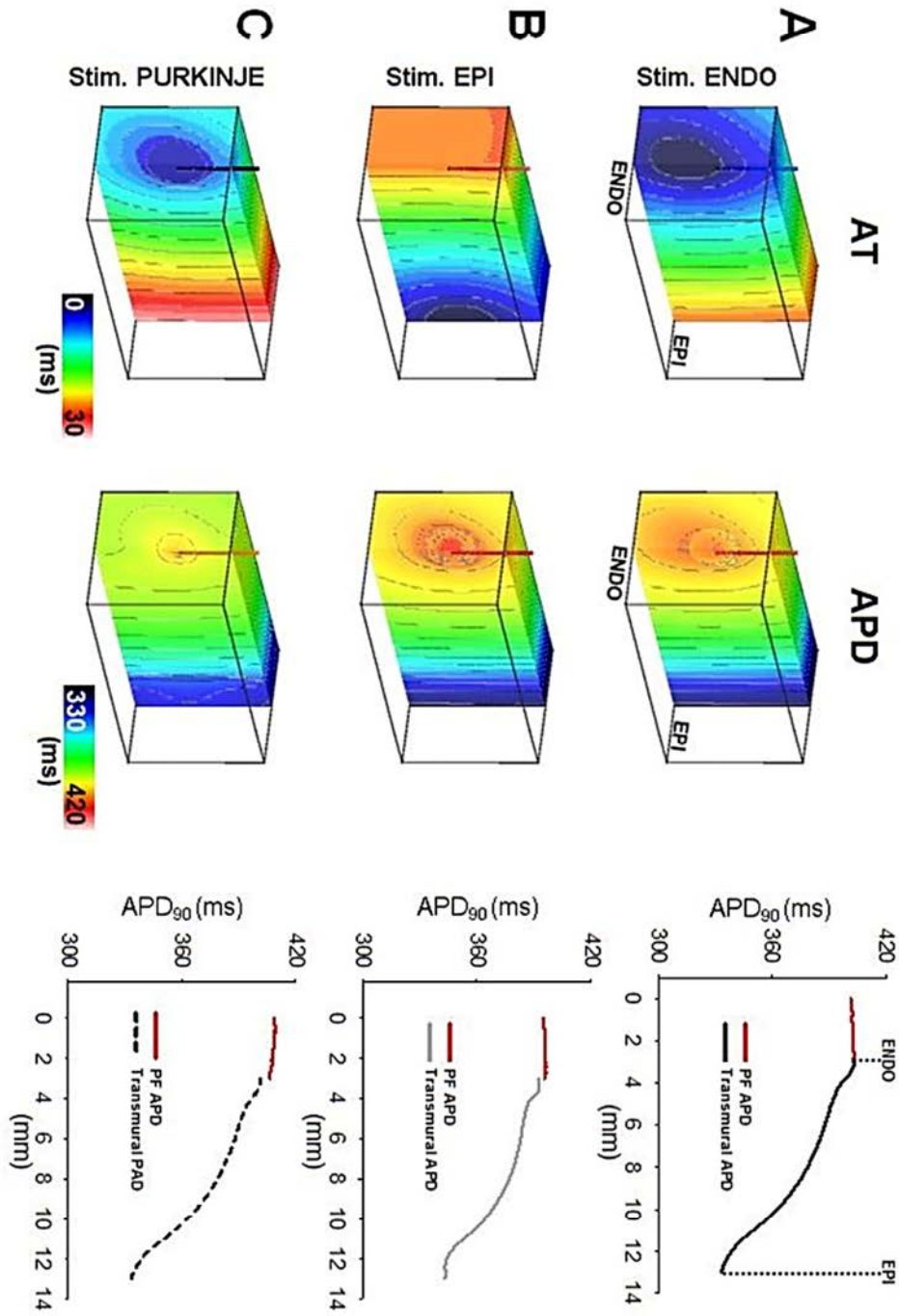


Figure 6. Transmural APD heterogeneity in human ventricular wedge model. AT and APD maps in simulations from transmural cross-sections of wedges for ENDO (A), EPI (B) and PF (C) stimulation at 1 Hz. Right panels show transmural APD profiles intersecting the PMJ and APD profiles along the free-running PF (red line). Isochrones are 2 ms spacing for AT maps and 5 ms for APD maps.

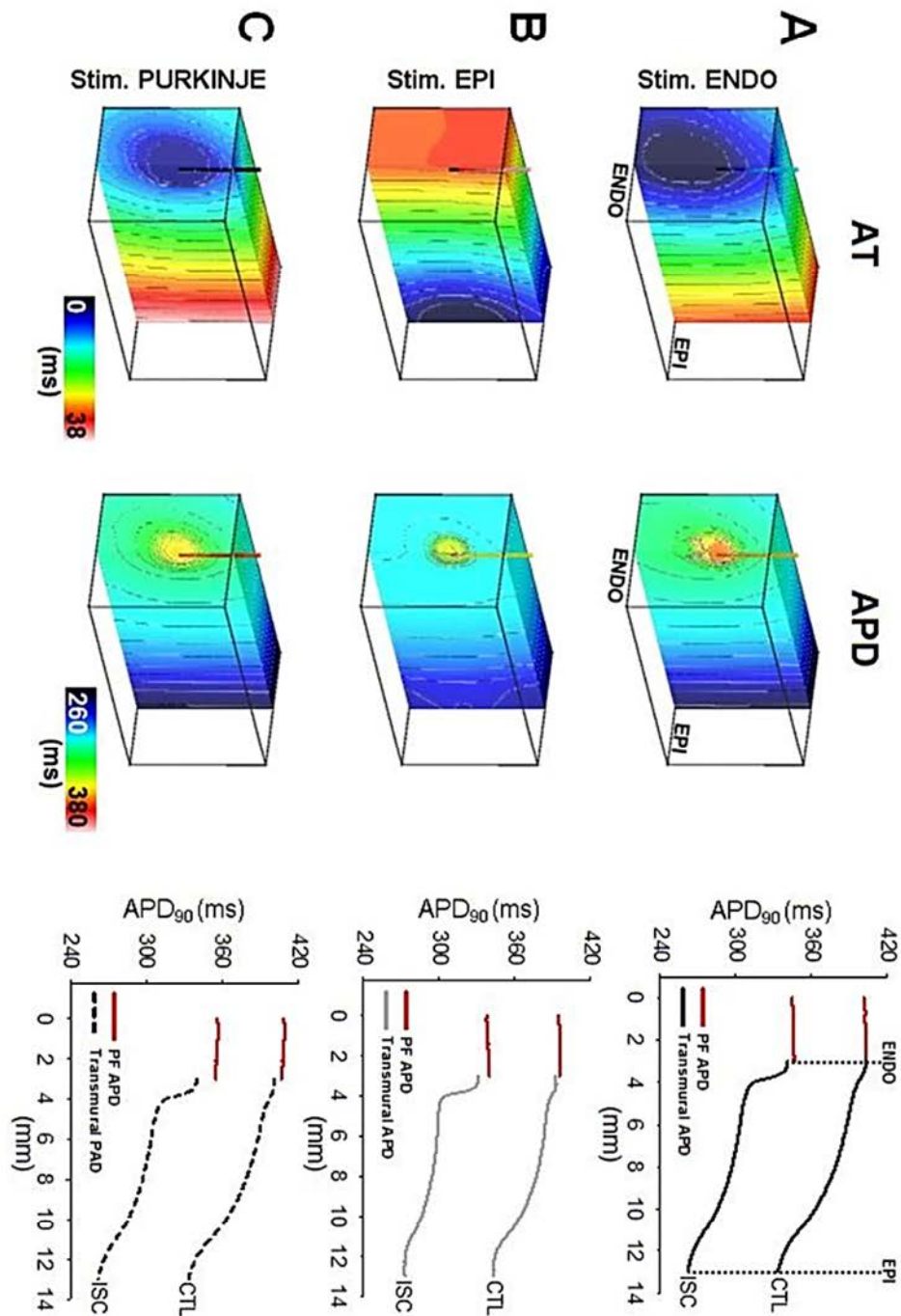


Figure 7. Transmural APD heterogeneity in ischemic human model. AT and APD maps and APD profiles are shown for simulations of ischemia following ENDO (A), EPI (B) and PF (C), as in Figure 7.

2.3. Conclusion

Les résultats de cette étude mettent en évidence le rôle important de l'activation à travers le réseau de Purkinje dans la mise en place des gradients transmuraux de repolarisation dans le myocarde sain et ischémiq. Pour la suite de nos expériences, il semblait intéressant de regarder l'implication directe du Purkinje lors de la fibrillation ventriculaire.

3. Implication des jonctions Purkinje-muscle lors de la fibrillation ventriculaire

3.1. Contexte et objectif

La fibrillation ventriculaire (FV) représente l'arythmie ventriculaire la plus grave car elle est mortelle au-delà de quelques minutes et constitue une cause majeure de mort subite. La FV est le plus souvent la conséquence de pathologies cardiaques comme l'infarctus du myocarde (Chan & Sy 2016).

Le système de Purkinje responsable de l'activation synchrone des ventricules a notamment été impliqué dans le déclenchement de la FV dans un large éventail de patients atteints de pathologies cardiaques structurales (Marrouche et al 2004, Szumowski et al 2004) ou présentant un cœur apparemment normal (Haissaguerre et al 2002a, Haissaguerre et al 2002b). En outre, nos précédentes études ont permis de démontrer que la modulation de la dispersion de repolarisation par le système de Purkinje à travers les PMJs constituait un potentiel substrat pro-arythmogénique (Walton et al 2014).

L'ablation par cathéter des sources ectopiques provenant du réseau de Purkinje est un traitement très efficace contre la FV (Chan & Sy 2016, Haissaguerre et al 2002b, Marrouche et al 2004, Szumowski et al 2004). Cependant, l'identification des PMJs responsables du maintien de la FV reste à définir tout comme les mécanismes d'arythmies liés au réseau de Purkinje, afin de faciliter le développement des interventions visant à prévenir les arythmies cardiaques mortelles.

Le but de cette troisième étude était de déterminer si le système de Purkinje participait au maintien de la FV par le biais de ces PMJs actives et si l'ablation de ces jonctions permettait de ralentir la FV. Pour cela, des expériences de cartographie optique ont été réalisées sur des ventricules isolés et perfusés, stimulés par les fibres de Purkinje donnant ainsi accès aux PMJs actives. Puis des FVs ont été déclenchées par l'intermédiaire de stimulations de hautes fréquences du ventricule et une ablation des PMJs a été générée.

L'ensemble de mes travaux pour cette troisième étude consistait en la réalisation d'expériences de cartographie optique sur des ventricules gauches de brebis isolés et perfusés afin de définir le rôle du Purkinje dans le maintien de la FV.

3.2. Résultats préliminaires

3.2.1. Localisation des jonctions Purkinje-muscle

Comme illustrée lors des précédentes études, la localisation des PMJs au cours de la stimulation des fibres de Purkinje a été réalisée à l'aide des cartes d'activation (AT), ainsi que, des cartes d'amplitude normalisée de la dérivée maximale de la dépolarisation du PA (V_F) pour déterminer leur position au sein du myocarde (endocardique ou transmurale) (figure 32).

Pour rappel, la V_F correspond à l'orientation du front de l'onde d'excitation par rapport à la surface imagée (Hyatt et al 2008, Walton et al 2012). Une V_F faible correspond aux ondes se propageant en provenance de la surface imagée et, une V_F forte donne l'inverse (figure 31). Ainsi l'activation par une PMJ transmurale devrait donner une V_F forte alors qu'une V_F faible devrait être observée pour une PMJ endocardique (Walton et al 2014).

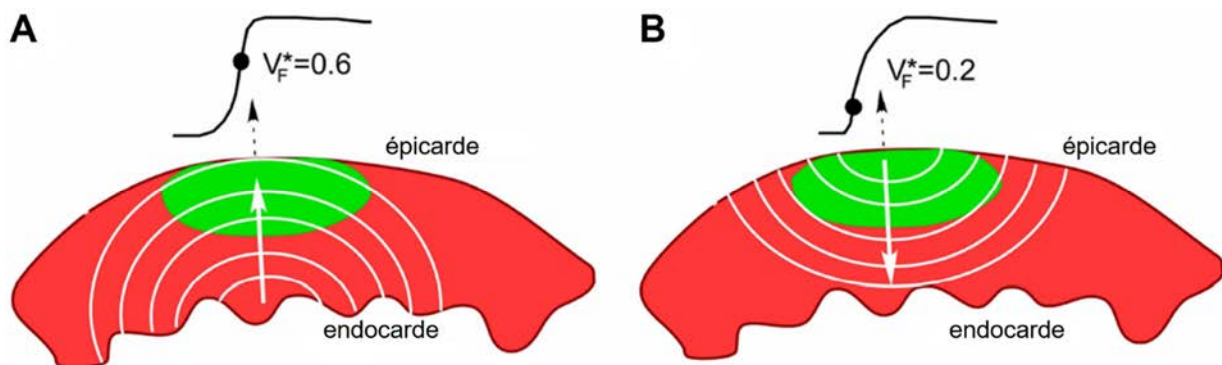


Figure 31 : Front de l'onde (isochrones blancs) se propageant de l'endocarde vers l'épicarde (A) ou l'inverse (B). La zone verte correspond au signal optique enregistré dans un pixel (flèche en pointillé) sur la surface épicaardique et le cercle noir correspond à la V_F .

D'après Hyatt et al 2008.

Comme précédemment, l'intérêt s'est porté sur l'étude des PMJs endocardiques, en raison de leur impact sur l'hétérogénéité locale de l'APD endocardique et de leur similitude de localisation avec l'homme (Cf. *Introduction 4.1*). Néanmoins, le seuil de la V_F ultérieurement de 0,22 a été augmenté à 0,30 afin d'obtenir un nombre plus important de PMJs endocardiques et sous endocardiques à étudier (figure 32).

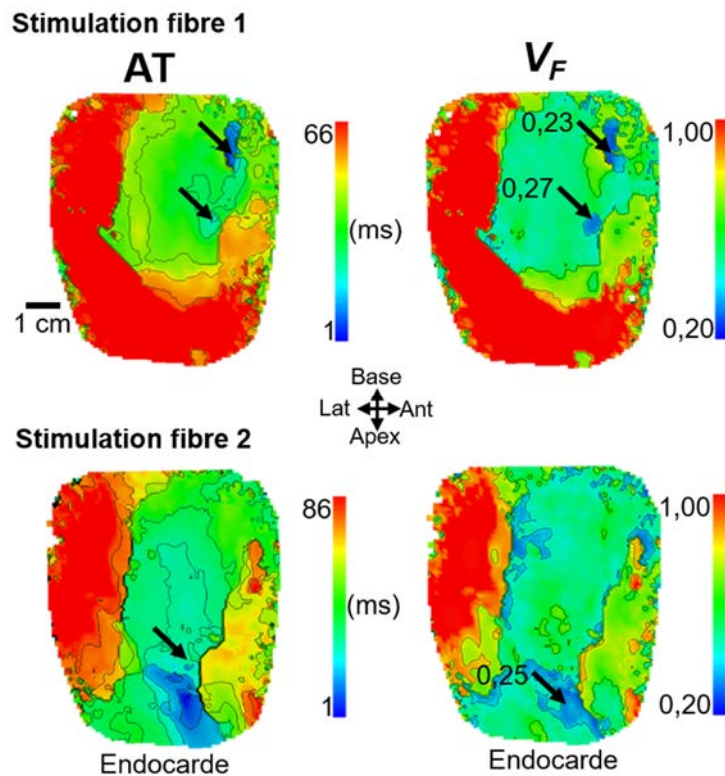


Figure 32 : Cartes d'AT et de V_F lors de stimulation de différentes fibres de Purkinje à 1 Hz. Les origines d'activation correspondant aux PMJs sont localisées par les flèches. Les isochrones correspondent à 10 ms d'espacement pour les cartes d'AT et 0,2 pour les cartes de V_F .

3.2.2. Influence des jonctions Purkinje-muscle sur la fibrillation ventriculaire

Des stimulations de hautes fréquences (10 ou 20 Hz) sur l'endocarde ont été effectuées afin de générer une FV du ventricule gauche (VG) (N = 6), puis des enregistrements ont été acquis lors des temps 0, 2 et 4 minutes suivant la FV. Des temps plus longs de FV risquaient d'endommager la préparation avec des arythmies impossibles à défibriller.

Les résultats préliminaires des cartes de fréquence dominante (FD) et d'indice de régularité (IR) (mesurant la régularité de la distribution des fréquences observées) ont montré pour les premiers temps de la FV, 0 et 2 minutes, une FD globale d'environ 5 Hz directement corrélée avec la localisation des PMJs possédant un IR important, compris entre 0,45 et 0,55. Cependant, après 4 minutes, la FV est devenue plus complexe avec une augmentation de la FV globale ainsi qu'un impact plus faible des PMJs dû à un IR diminué (0,25 à 0,48) (figure 33 A).

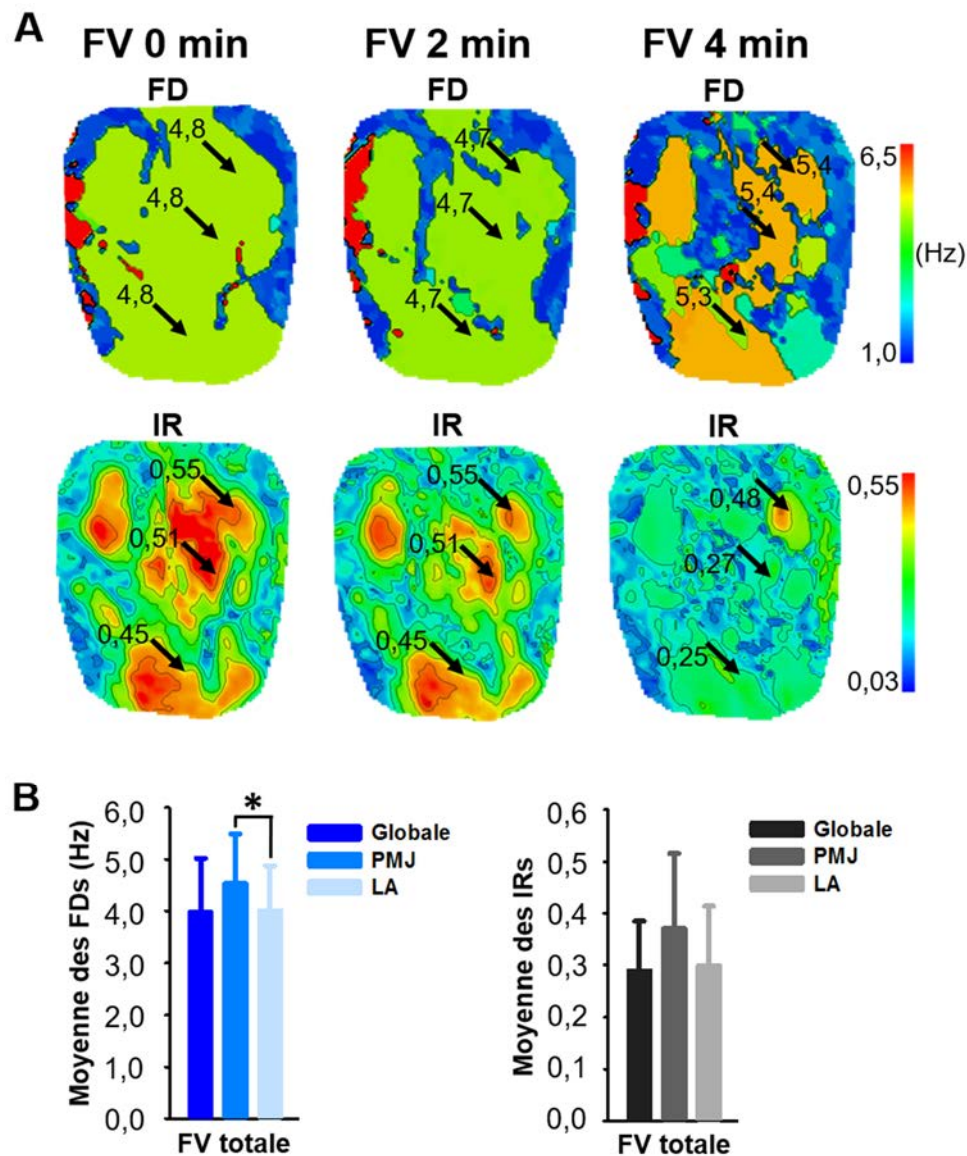


Figure 33 : A. Cartes de fréquence dominante (FD) et d'indice de régularité (IR) lors de la fibrillation ventriculaire (FV) à 0, 2 et 4 minutes. Les isochrones sont respectivement de 1 Hz et 0,1. Les flèches correspondent aux PMJs précédemment identifiées. **B.** Moyenne $\pm$ SD des FDs et des IRs de la FV globale ou localisée des PMJs ou des zones d'activation tardive (LA) lors des temps totaux de la FV. Les données proviennent de $N = 6$ et * indique $p < 0,05$.

Ainsi, comme précédemment démontré (Huang et al 2014), les PMJs semblent participer au maintien de la FV et ce dès les premières minutes. Néanmoins l'analyse statistique des IRs aux différents temps de la FV n'a pas démontré un impact significatif des PMJs durant les premiers temps de la FV (données non présentées).

Notons que d'autres zones avec des IRs importants ont été observées, ces zones peuvent potentiellement correspondre à d'autres PMJs non identifiées. Par ailleurs, la sommation des différents temps de FV a permis de démontrer une différence significative entre les PMJs et les zones d'activation tardive (ou LA pour « late activation ») du ventricule, avec une fréquence plus élevée au sein des PMJs ($4,5 \pm 1,0$ Hz vs $4,0 \pm 0,9$ Hz) (figure 33 B), ce qui leur confère un rôle moteur dans le maintien de la FV.

3.2.3. Impact de l'ablation des jonctions Purkinje-muscle sur la fibrillation ventriculaire

Après acquisition des différents temps de FV, la préparation a été défibrillée afin de retrouver un rythme normal lors de stimulations basales. L'ensemble des PMJs identifiées sur les cartes d'AT a été ablaté car la localisation de leur origine n'était pas possible durant l'expérimentation, mais seules les PMJs sous endocardiques ont été conservées pour l'analyse. L'ablation sur les VGs (N = 3) a été réalisée par radiofréquence à 30 W durant 15 secondes à l'aide d'un cathéter (Stockert EP-Shuttle, Biosense Webster). Ces conditions sont différentes des conditions cliniques (50-60 W durant 60-120 s) (Haissaguerre et al 2002a, Haissaguerre et al 2002b, Marrouche et al 2004) car l'objectif était de cibler seulement les PMJs sous endocardiques (figure 34). Puis des FVs ont été induites comme précédemment par des stimulations de hautes fréquences et des enregistrements des différents temps de la FV (0, 2 et 4 minutes) ont été réalisés.

Après ablation des PMJs, les résultats préliminaires ont montré une nette diminution de la FV avec une FD globale d'environ 2 Hz et une diminution importante des FDs (1 à 1,8 Hz) et des IRs (0,11 à 0,38) des PMJs pour tous les temps de FV a été observée sur les cartes (figure 35 A). Ainsi, les PMJs ne semblent plus avoir d'effet sur la FV au cours du temps. De manière intéressante, la sommation des différents temps de FV a démontré une perte de la différence significative de la FD entre les PMJs et les LA, mais également, l'apparition de différences significatives entre la FV globale et la FV localisée des PMJs et celle des LA (respectivement de $2,0 \pm 0,1$ Hz ; $3,4 \pm 0,9$ Hz et $3,1 \pm 0,7$ Hz) (figure 35 B). Les PMJs n'apparaissent donc plus impliquées dans la FV après ablation de ces dernières.

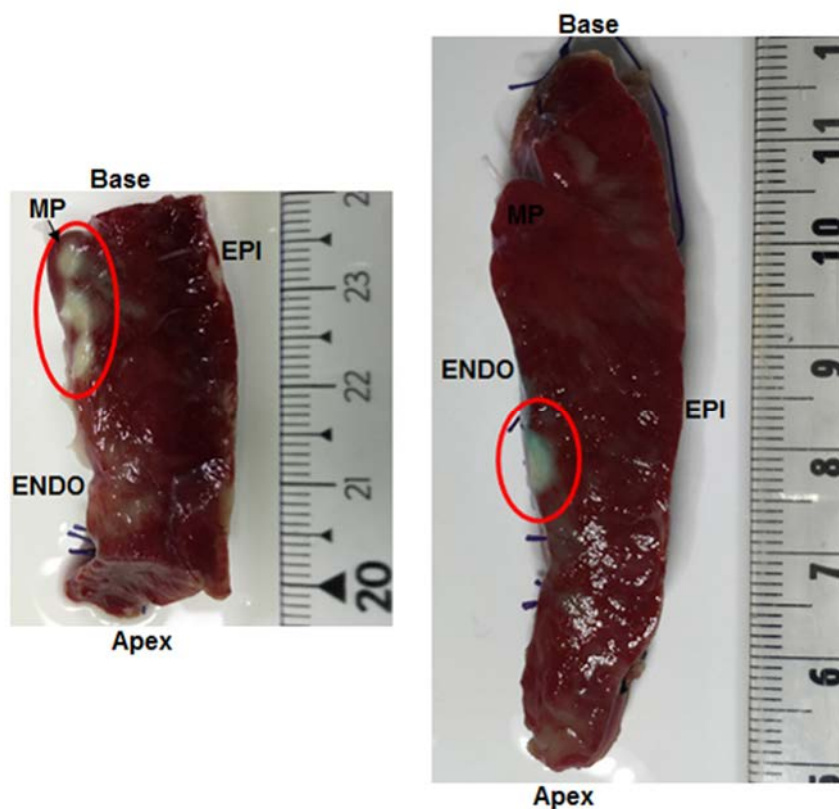


Figure 34 : Sections transmursales de ventricule gauche de brebis après ablation des PMJs.
 Coloration au chlorure de triphényltétrazolium accentuant la différence entre les tissus sains
 au métabolisme actif (rouge) et les tissus nécrosés au métabolisme inactif (blanc) (cercle rouge).
 ENDO : endocarde, EPI : épicarde, MP : muscle papillaire.

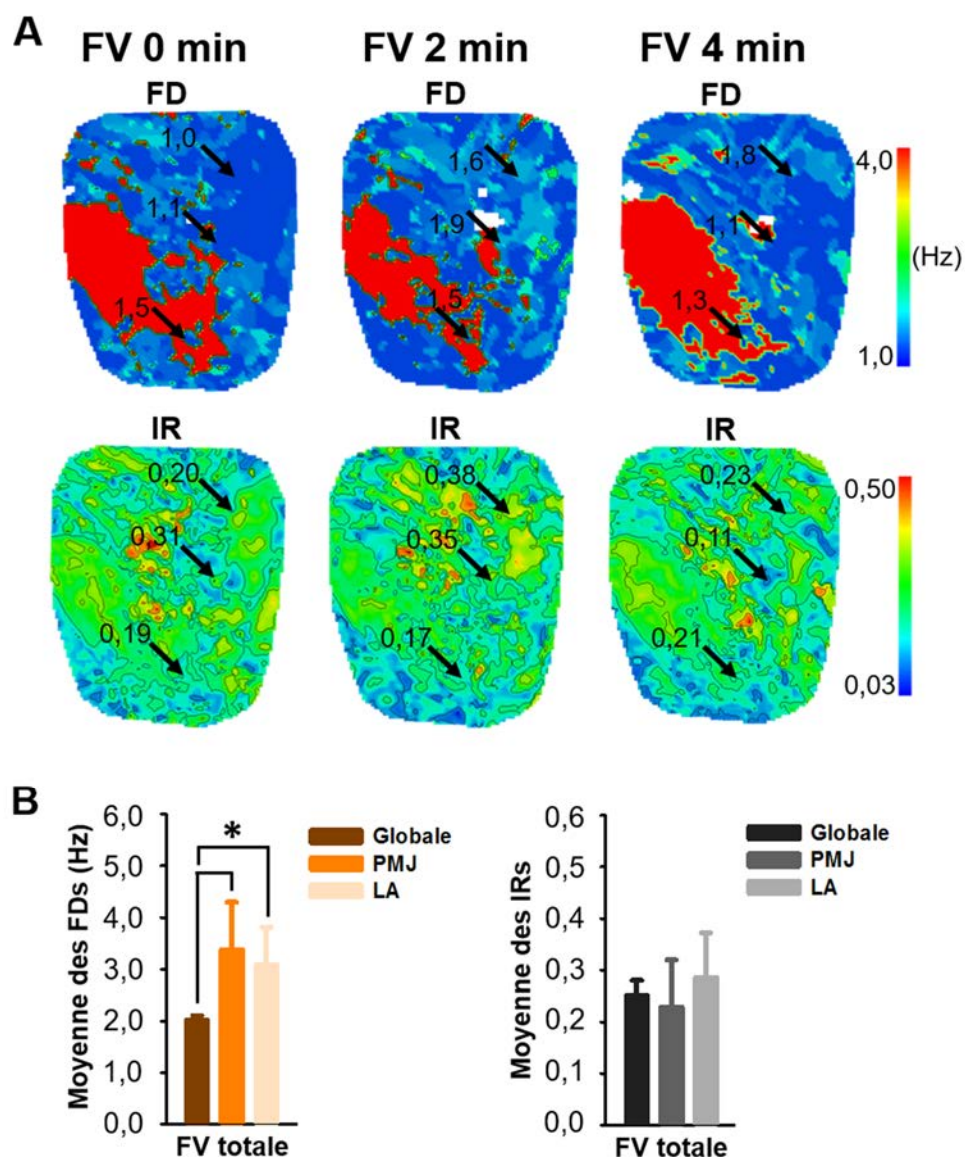


Figure 35 : A. Cartes de FD et d'IR durant une FV de 0, 2 et 4 minutes après ablation des PMJs.

B. Moyenne $\pm$ SD des FDs et des IRs de la FV globale ou localisée des PMJs ou des LA lors des temps totaux de la FV après ablation des PMJs. Les données proviennent de $N = 3$ et * indique $p < 0,05$.

3.2.4. Fibrillation ventriculaire avant et après ablation des jonctions Purkinje-muscle

En comparant la sommation des différents temps de la FV avant et après ablation, une diminution significative d'un facteur 2 de la FV globale a été observée ($p < 0,05$). De la même manière, une diminution significative de la FV localisée aux PMJs et de la FV localisée aux LA a également été observée ($p < 0,05$) mais de facteur plus faible de 1,3 (figure 36). Ainsi, ces premiers résultats de l'ablation localisée des PMJs semblent bien démontrer un impact significatif sur la FV globale mais aussi sur la FV localisée des PMJs et des LA.

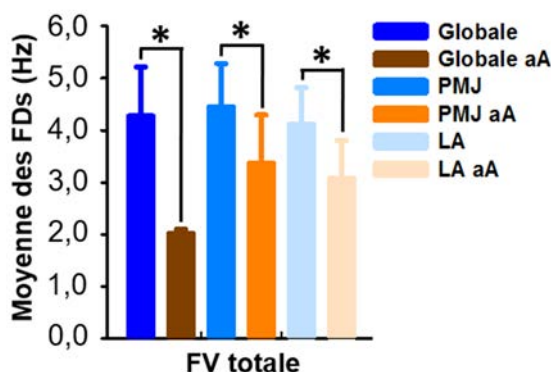


Figure 36 : Moyenne $\pm$ SD des FDs de la FV globale ou localisée des PMJs ou des LA lors des temps totaux de la FV avant et après ablation (aA) des PMJs. Les données proviennent de $N = 3$ et * indique $p < 0,05$.

3.2.5. Analyse de l'activité focale et des « rotors » de la fibrillation ventriculaire avant et après ablation

L'analyse des activités focales et des « rotors » de la FV a également été générée par un programme implémenté dans Matlab. L'activité focale d'une arythmie correspond au nombre de fois où le « breakthrough », c'est-à-dire l'émergence de l'activité électrique, est retrouvé au même endroit sur la surface non stimulée, ici l'endocarde. Le « rotor » ou onde électrique en spirale se caractérise par une activité électrique en rotation autour d'un centre, maintenue pendant quelques centaines à des milliers de cycles couvrant plusieurs minutes.

Le « rotor » correspond ainsi aux circuits de réentrée fonctionnelle à haute fréquence (Pandit & Jalife 2013). Cette analyse consistait à mesurer la distance entre les PMJs et les différents « breakthrough » et « rotors » durant la FV et ce, avant et après l'ablation des PMJs. Le seuil du « rotor » a été fixé au nombre de 2, c'est-à-dire, qu'il devait tourner au moins deux fois pour être considéré comme un « rotor ».

Les résultats préliminaires n'ont montré aucune différence des activités focales ou des « rotors » avant ou après ablation des PMJs. Cependant, une tendance avec une augmentation de la distance entre d'une part les PMJs et les « breakthrough » (12 ± 4 mm vs 16 ± 9 mm) et d'autre part entre les PMJs et les « rotors » (14 ± 7 mm vs 15 ± 16 mm) après ablation a été observée (figure 37). Ainsi, les PMJs pourraient potentiellement être impliquées dans la mise en place des « rotors » de la FV et pourraient correspondre aux activités focales retrouvées lors de cette dernière.

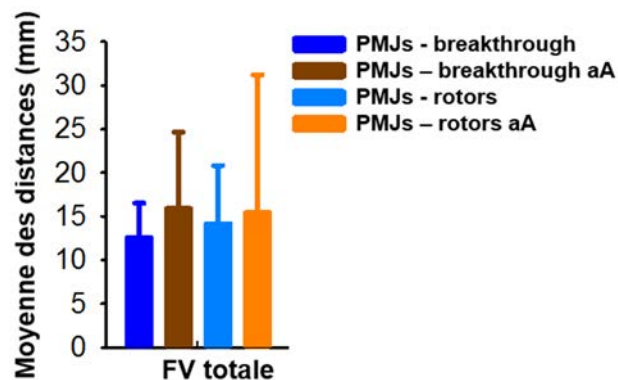


Figure 37 : Moyenne $\pm$ SD des distances entre les PMJs et les « breakthrough » et entre les PMJs et les « rotors » lors des temps totaux de la FV avant et après ablation (aA) des PMJs.

Les données proviennent de $N = 3$.

3.3. Discussion et conclusion

Les résultats préliminaires suggèrent un rôle des PMJs dans le maintien de la FV et ce, lors des premières minutes de l'arythmie. Ces premiers résultats mettent également en évidence les effets positifs d'une ablation par radiofréquences de durée et de puissance plus faibles dans le ciblage des PMJs endocardiques. Cependant l'ensemble de ces arguments doit évidemment être vérifié par d'autres expériences en raison du nombre insuffisant de ventricules testés. Par ailleurs des expériences avec des protocoles d'ablation des PMJs de manière aléatoire doivent être également envisagées pour confirmer l'impact de l'ablation ciblée. De plus, ces premiers résultats analysent seulement la FV et l'effet de l'ablation au niveau de l'endocarde, or, chez la brebis les PMJs sont transmuraux. Il semble donc important de regarder les effets de la FV au niveau de l'épicarde mais également d'envisager une ablation plus transmurale des PMJs.

Pour la suite de nos expériences, il semblait pertinent de s'intéresser plus particulièrement à l'architecture et l'organisation tridimensionnelle de ces jonctions.

4. Structure compartimentée de la bande modératrice fournissant un substrat de macro-réentrée pour la tachycardie ventriculaire

4.1. Contexte et objectif

La bande modératrice (BM) est une structure musculaire, contenant des fibres de Purkinje, isolée du reste du cœur et qui est retrouvée chez de nombreuses espèces (Gettes & Surawicz 1968, Morita et al 1991) y compris chez l'homme (Abouezzeddine et al 2010). Elle s'étend du septum antérieur jusqu'à la paroi libre du ventricule droit (VD). Son architecture très organisée et composée de nombreux myocytes cardiaques (Morita et al 1991), a tout d'abord fait penser que sa fonction était de contrôler la distension du VD mais il a été démontré par la suite que la BM constituait une branche importante du réseau de conduction du VD (Gettes & Surawicz 1968).

Par ailleurs, des études récentes ont montré que la BM constituait un site d'origine connu de contraction prématurée des ventricules induisant des arythmies chez des patients souffrant de fibrillation ventriculaire idiopathique (Sadek et al 2015). Cependant, l'origine des sources liées aux Purkinje atteint seulement 50%, ce qui amène à penser que les ectopies restantes proviennent d'origines myocardiques.

Le but de cette étude était d'étudier le couplage entre les différents compartiments ainsi que la cinétique de propagation électrique et l'hétérogénéité de repolarisation qui existent entre la BM, le septum et la paroi libre du VD. Pour cela des expériences de cartographie optique ont été réalisées sur des ventricules isolés et perfusés, complétées par des simulations informatiques mais également par des études histologiques de la BM.

Mes travaux pour cette étude se sont portés sur l'étude histologique des BM de brebis afin de caractériser l'architecture du réseau de Purkinje et de mieux comprendre son interaction avec le myocarde ventriculaire. Ces mêmes études histologiques ont été reproduites sur des BM humaines dans le but d'obtenir des données translationnelles comparables. Ces travaux ont permis de faire le lien entre la structure des BM et les mécanismes d'arythmies mis en évidence par cartographie optique par le Dr Richard Walton.

Cette étude est actuellement soumise à publication.

En parallèle de cette étude, mes travaux se sont orientés sur l'étude histologique de la paroi libre du ventricule gauche de la brebis et de l'homme. Une technique plus récente de clarification optique du tissu a notamment été mise en place pour obtenir des informations sur la structure en trois dimensions du réseau de Purkinje. Cette partie est présentée en résultats complémentaires.

4.2. Article 3 : Compartmentalized structure of the moderator band provides a substrate for macroreentrant ventricular tachycardia

Les données supplémentaires de cet article se trouvent en annexe 3.

Compartmentalized structure of the moderator band provides a substrate for macroreentrant ventricular tachycardia

Richard D. Walton PhD^{*,y,z}, Ali Pashaei PhD^{*,y,z}, Marine E. Martinez^{*,y,z}, Marion Constantin^{*,y,z}, Josselin Duchateau MD^{*,y,z,x}, Caroline Cros PhD^{*,y,z}, Caroline Pascarel-Auclerc PhD^{*,y,z}, Yunbo Guo PhD^{*,y,z}, Sebastien Chaigne^{*,y,z}, Sebastien Dupuis^{*,y,z}, Philippe Pasdois PhD^{*,y,z}, Dominique Detaille PhD^{*,y,z}, Line Pourtau PhD^{*,y,z}, Méléze Hocini MD^{*,y,z,x}, Michel Haïssaguerre MD^{*,y,z,x}, Julien Rogier MD^{*,y,z,x}, Louis Labrousse MD^{*,y,z,x}, Fabien Brette PhD^{*,y,z}, Edward J. Vigmond PhD^{z,ii,†}, and Olivier Bernus PhD^{*,y,z}.

All work was performed at: L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque (LIRYC), Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Brief title: The moderator band supports macroentry

Corresponding author: Richard Walton
L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque (LIRYC)
CRCTB U1045
Hôpital Xavier Arnoz,
Avenue du Haut Lévêque,
33604 Pessac,
France.
Tel : +33 (0) 5 35 38 29 73
Fax : +33 (0) 5 35 38 19 98
richard.walton@ihu-liryc.fr

Acknowledgements

Computer time for this study was provided by the computing facilities MCIA (Mésocentre de Calcul Intensif Aquitain) of the Université de Bordeaux and of the Université de Pau et des Pays de l'Adour. The authors would also like to thank the following people for valuable contributions: David Benoist, Fanny Vaillant, Virginie Dubes, Rokhaya Faye, Sabine Charron, Thomas Desplantez, Philippe Diolez, Bruno Quesson and Bruno Stuyvers.

Funding sources

This work was supported by the Marie Curie [grant numbers IEF-PSCD-300299 to RDW., IRSES-CORDIS3D-317766 to OB]; European Research Council [grant number SYMPHONY to MiHa] and the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-10-IAHU04-LIRYC].

Industrial partnerships: None

Word count: 4991

* Université de Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux U1045, Bordeaux, France.

^y Inserm, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux U1045, Bordeaux, France.

^z L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque LIRYC, Fondation Bordeaux Université, Bordeaux, France.

^x CHU de Bordeaux, hôpital du Haut Lévêque, Avenue de Magallen, 33600 Pessac, France.

ⁱⁱ Université de Bordeaux, L'Institut de Mathématiques de Bordeaux UMR5251, Bordeaux, France.

[†] Department of Electrical and Computer Engineering, university of Calgary, Calgary, Canada.

Abstract

Background: Ventricular tachycardia (VT) following premature ventricular contractions originating from the moderator band (MB) has been observed. The MB is composed of both muscular and Purkinje compartments.

Objectives: This study sought to determine how the MB structural arrangement provides a substrate for arrhythmias.

Methods: Human (N=2) and sheep (N=4) MB structures were assessed histologically to identify their Purkinje, myocardial, lipidic and collagenous tissue constituents by Mason's trichrome staining. Dual-perfused ventricular wedge preparations with intact MBs were studied from 8 sheep (40-50 kg). Right ventricular (RV) endocardium was optically mapped and simultaneous unipolar recordings were measured along the MB and septum. VT susceptibility was assessed by S1S2 pacing of the RV free wall, myocardial compartment of the MB or combined S1-RV S2-MB sites. Experiments were supported by simulations in realistic ventricles.

Results: Histology revealed an absence of coupling between myocardial and Purkinje compartments in both human and sheep MB. The incidence of VT in sheep for RV, MB and S1-RV S2-MB pacing was 1.3%, 5.1% and 10.3%. Pace mapping of the MB confirmed MB involvement during VT. Inducible preparations had shorter action potential durations in the MB than RV (259.3 ± 45.2 vs. 300.7 ± 38.5 ms). No difference was found in non-inducible preparations (312.0 ± 30.3 vs. 310.0 ± 24.6 ms, respectively). The window of vulnerability for VT in simulations was increased from 2 ms to 16 ms in models by shortening APD 21% in MB myocardium.

Conclusions: MB thickness and compartmentalization of the Purkinje and myocardium observed in both human and sheep provided a substrate for macroreentry involving the MB. This was perpetuated by repolarization heterogeneity between MB myocardium and the RV in sheep.

Keywords Ventricular tachycardia; moderator band; substrate for arrhythmia; macroreentry; optical mapping; repolarization heterogeneity

Abbreviations

APD – Action potential duration

ARI – Activation-recovery interval

AT – Activation time

ERP – Effective refractory period

MB – Moderator band

PVC – Premature ventricular contraction

RT – Repolarization time

RV – Right ventricle

VT – Ventricular tachycardia

Introduction

Premature ventricular contractions (PVC) leading to tachyarrhythmias have been increasingly recognized as a potential cause of sudden cardiac death¹⁻³. PVCs and ventricular tachycardia (VT) predominantly arises from the right ventricular outflow tract^{4,5}, yet 24% have been shown to originate from endocavity structures such as free-running Purkinje fibers, papillary muscles and the moderator band (MB)⁶.

The MB is a free-running muscular structure extending from the anterior septum to the anterior papillary muscle of the right ventricular (RV) free wall of large mammalian species^{7,8}, including humans⁶. The MB is highly organized and numerous in cardiac myocytes⁸ and consequently was initially thought to moderate RV distension. However, the MB was later found to support a major branch of the RV conduction network⁷ with termini in the mid-free wall of the RV.

Preparations of isolated MB from pig have shown that the muscular compartment is sufficiently well coupled and organized to permit electrical propagation⁹. Furthermore, the MB is a known origin of PVC-induced tachyarrhythmias in idiopathic ventricular fibrillation patients¹⁰. But the prevalence of Purkinje-related sources reaches only 50%, suggesting the remaining ectopies had myocardial origins.

Intracompartamental coupling as well as electrical propagation kinetics, repolarization heterogeneities and rate-dependence between the MB and the free wall and septum have yet to be investigated. The extent of dynamic electrophysiological interactions between the MB and ventricular myocardium were characterized in a large animal sheep model and compared to the structure of the human MB. Furthermore, we investigated a novel mechanism by which the MB itself provides a substrate for VT. Numerical simulations were used to support experimental findings.

Methods

Tissue acquisition

Procurement and use of human donor hearts was approved by the French Biomedical Agency “Agence de la Biomédecine”. Donor hearts were procured at the Bordeaux University Hospital and stored in ice cold cardioplegia until use in the laboratory. Patient data is shown in Supplementary Table 1.

Hearts were obtained from sheep (N=12) weighing 40-50 kg in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and the local ethical committee. Sheep were euthanized and hearts were rapidly excised, cannulated and flushed with cardioplegic solution, containing (mM): NaCl, 110; CaCl₂, 1.2; KCl, 16; MgCl₂, 16; NaHCO₃, 10 and glucose, 9.01 at 4°C.

Histology of human and sheep moderator bands

Tissue samples were stained for muscle fibers, nuclei and collagen using standard Masson's trichrome staining. See supplemental materials for a detailed description.

Optical and electrical mapping of the sheep myocardium

Novel dual coronary-perfused left anterior and right ventricular wedge preparations were imaged using optical mapping of the right ventricular endocardial surface (see supplemental materials for details). Unipolar electrograms were recorded from 5 locations simultaneously from the septum and along the MB. Two stimuli locations were used: endocardial surface of the RV mid-wall and the MB. S1S2 pacing was assessed for each pacing site, and a combined S1RV-S2MB protocol.

Analyses and statistics

VT involving the MB was defined as 3 or more re-entry cycles with uni-directional propagation along the MB with activation of the RV free wall originating from the insertion of the MB. The incidence of VT was determined from the frequency of occurrences throughout the S1S2 pacing protocol. Statistical differences were assessed by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test and defined by $P < 0.05$.

In silico reentry study

A detailed description of computer modeling in this study is found in the supplemental materials. Briefly, we used a realistic 3D rabbit ventricle finite element mesh with anisotropic fibers and Purkinje system (see supplemental figure 3A) that we have previously developed¹³. An MB was manually added to the geometry. Supplement table 2 details the changes and lists modifications for each ionic model parameter that were applied to adjust for modeling the effective heart size of sheep within a rabbit ventricular geometry for better correspondence with experiments¹². Pacing protocols were applied to mimic experiments.

Results

Structural substrate of the moderator band

Figure 1 shows high muscular content in the human MB. Bundles of Purkinje fibers were evident at the periphery of the MB (figure 1A and 1B). Purkinje fibers were separated from the myocardium by lipid deposits and extensive extracellular collagen surrounding individual bundles with no apparent coupling (figure 1C and 1D). This was consistent with the sheep MB (Figures 2A-2B). The relative contributions of the muscle fiber and Purkinje fiber compartments were assessed from transverse cross-sections of the MB (Figure 2D-2F). The Purkinje fiber/muscle ratios were highly variable, ranging from 0.04 to 0.63 (supplemental figure 2). This may be explained by a high intra-species variability of the MB thicknesses (3.3 ± 0.9 mm, minimum=2.1 mm, maximum=5.0 mm, in sheep). The structure of the MB appears therefore to be composed of two excitable, yet uncoupled, compartments. The insertions show convergence of MB muscle fibers with muscle layers of the papillary muscle and septum (figure 2G and 2H). A high presence of adipose tissue and extracellular constituents composed of fibroblasts and collagen were also observed.

Activation patterns following MB pacing

Figure 3A shows stimulation at the current threshold (35 μ A) for one-to-one capture of the MB, inducing continuous propagation towards the RV free wall. Upon substantial increases in stimulus current (i.e. 1 mA), the site of earliest activation shifted to the RV free wall. Incremental changes in stimulus current developed non-linear shortening of activation latency of the RV free wall whereby increased stimulation current caused step-wise reduction of activation latency (Figure 3B). Low stimulus current of 50 μ A resulted in relatively slow wave propagation emanating from the base of the MB to the RV free wall (Figure 3C). At 90 μ A, corresponding to the first step-wise reduction of RV activation latency, two sites of focal activation were observed in the RV free wall distant to the base of the MB (figure 3D). A third remote focal site of activation in the RV occurred at 1 mA (figure 3E). Long activation latencies in the RV were affiliated to conduction along the muscular

compartment of the MB and short activation latencies were attributed to capturing Purkinje.

Activation patterns following S1S2 pacing in MB and RV

Conduction delays between the RV free wall and MB were dependent upon the direction of propagation across the MB insertion and the coupling interval (Figure 4). Across all experiments, activation latency of the MB following RV stimulation at the S1 basic cycle length was 12.7 ± 6.1 ms. This was increased to 16.0 ± 8.3 ms at the ERP of the stimulation site. For MB stimulation, activation latency of the RV was 14.4 ± 13.6 ms at the basic cycle length but significantly prolonged to 32.5 ± 16.7 ms at the ERP ($P < 0.05$). An increasing RT gradient from RV to proximal MB could also be observed in some, but not all preparations (64%). Propagation from the MB to the RV homogenized RT patterns along the MB.

The MB supports ventricular tachycardia

Short coupled pacing intervals for S1RV-S2MB triggered sustained ventricular tachycardia (figure 5A). Here, the S2 beat originated from the insertion of the MB in to the RV (figure 5B), consistent with activation of the muscular compartment of the MB (figure 3C). During VT, similar origins of activation were observed as for S2 (figure 5C). VT was characterized by unidirectional propagation along the MB from septum to RV (figure 5D). This pattern of propagation was consistent and stable for each VT cycle. Owing to the similarity of propagation between S2 and VT, endocardial optical activation sequences were compared. Figure 5E shows a representative pixel-to-pixel correlation plot of AT. A strong linear correlation was identified, indicating the correspondence between activation sequences. In further support of this, the pseudoECG morphology during the premature beat and VT was consistent, whereas the S1 triggered beats with distinct origins of activation showed a clear nonconformity (figure 5F). The incidence of VT supported by the MB was assessed across all experiments for each pacing protocol. VT was observed across all pacing

protocols, however the incidence was 2-fold greater for S1S2MB and 8-fold greater for S1RV-S2MB (Figure 6).

Underlying electrophysiological substrates of ventricular tachycardia

To understand the role of the electrophysiological substrate of the MB during VT, ERP and repolarization properties of the MB were assessed. Measurements across all experiments showed that ERP was not significantly different between the MB and RV (figure 7A). However, considering the variability of MB thickness, complexity of the MB macrostructure (figure 2) and variability of muscle/Purkinje fiber ratios (supplemental figure 2), the ERP may be influenced by variations of electrotonic loading, which is sensitive to tissue mass¹⁴ and coupling¹⁵. Therefore, ERP of the MB was compared against MB thickness (figure 7B). A strong linear relationship was identified, whereby thicker MBs were associated with shorter ERP. It was found that the vulnerability for VT to S1S2 stimulation was also dependent upon MB thickness. Inducible preparations had MB thicknesses ≥ 3.2 mm. A significant difference between ERP of the RV and MB was revealed for inducible (303.3 ± 45.0 ms vs. 334.4 ± 25.3 ms, $P=0.015$) but absent in non-inducible experiments (322.5 ± 17.6 ms vs. 348.8 ± 59.7 ms, $P>0.05$). The difference in ERP was explained by a concordant short ARI in the MB of inducible preparations ($86 \pm 15\%$) vs. RV (figure 7C). No difference was observed in non-inducible preparations.

Simulations of VT

In order to further understand the mechanism underlying VT observed in experiments, similar pacing protocols were assessed in computer models. Models permitted investigation of the effects of premature beats arising from the MB during sinus rhythm, which was not feasible in experimental wedge preparations. VT susceptibility was assessed initially in a homogeneous model with respect to differences of ionic properties between the MB and myocardium. The Purkinje network was paced at

the proximal end of the His bundle during S1 stimulation (figure 8A and supplemental video 1). S2 stimulation of the muscular compartment of the MB propagated preferentially in the anterograde direction in to the RV free wall. Re-activation of the MB could be achieved from the septal insertion of the MB however functional block at the insertion with the RV free wall terminated the wave front due to insufficient loading capacity of the distal MB, shown by a reduced AP amplitude (figure 8B).

The same protocol was assessed in the heterogeneous model, whereby APD of MB muscle was reduced by 21% to mimic experimental observations. Figure 8C and supplemental video 2 shows that reentry in to the MB following S2 persisted by exiting in to the RV free wall and repetitive re-activation of the MB from the septum gave rise to a sustained macroreentrant circuit. Figure 8D shows the window of vulnerability of S1S2 pacing intervals to induce VT was considerably greater in the heterogeneous model (16 ms vs. 2 ms). The role of the MB as substrate for macroreentrant arrhythmia was demonstrated by blocking conduction through the MB after the arrhythmia was established and at a moment when the MB was in a repolarized state ($t=300$ ms) (figure 8E and supplemental video 3). The existing wave front could no longer re-excite the MB, preventing further re-entry. To support experimental stimulation protocols, simulations were also carried out using S1 pulses of the RV free wall and MB (see supplemental materials).

Discussion

Novel VT macroreentrant pathway

Macroreentry is a well-established mechanism for ventricular tachycardia^{16, 17}. It is characterized by a recurrent circus activation around an inexcitable obstacle or anatomical feature. For this to occur, a tract of myocardium that is insulated from the surrounding conductible tissue except for an entry and exit site is required to permit re-excitation of the bulk myocardium. Conduction along the isthmus, therefore, must be sufficiently slow or long as to allow recovery of the myocardium at the exit site. Macroreentry in the ventricles commonly results from channels of surviving myocardium in an ischemic zone¹⁶ or retrograde conduction of the distal Purkinje network¹⁶⁻¹⁸.

The present study identified a novel macroreentry circuit through the myocardial compartment of the MB in the RV. With proximal and distal insertions at the anterior septal and RV papillary muscles, the MB provides a conducting link between these intracavity structures and a circuitous pathway anteriorly along the RV free wall and posteriorly within septum. Macroreentry was established upon premature activation of the MB and uni-directional propagation towards, and eliciting activation of, the RV free wall. Re-excitation of the MB at the septal end provided the isthmus for reentry in to the RV free wall. Macroreentry was inducible preferentially in populations with heterogeneous action potential durations between the MB and RV free wall. In support, simulations also showed that a shorter APD in the MB increased the vulnerability window for VT.

Conduction in the MB

The unique structure of the MB contains a rapid conduction pathway via Purkinje fibers and a relatively slower myocardial pathway. We identified that the myocardial compartment of the MB could be activated independently of the Purkinje (figure 3). Histological assessment of both sheep and human MB identified common structural features including a thick collagenous sheath surrounding Purkinje fiber bundles and an absence of abutting myocardium or transitional cells, which form the

junctioning termini of Purkinje to the myocardium¹⁹. Therefore, relatively slow propagation of wave fronts within the myocardial compartment could be tolerated without pre-excitation of the downstream tissue in the RV free wall of sheep. In conjunction, the relatively long free-running path length of the MB (2.3 ± 0.25 cm) provided a means for substantial latency of activation of the RV free wall, fulfilling prerequisites for the maintenance of reentry.

Dynamic interplay of conduction and repolarization gradients

VT was established predominantly from short delays of premature activation of the MB, near to the ERP. The direction of propagation during S1 determined the gradient of RT (figure 4). A sufficiently short-coupled S2 stimulus could subsequently trigger uni-directional propagation towards early repolarized tissue (figure 8). Inducibility of VT was further determined by repolarization heterogeneity between the MB and RV (Figure 7). The safety factor for conduction decreases when propagating from thin to larger well coupled structures²⁰. Therefore the shorter ERP (longer diastolic interval) of the heterogeneous models likely enabled sufficient reactivation of Na^+ current in distal MB cells to overcome high electrotonic loading at the insertion. Thus achieving conduction from the MB to the RV free wall and complete reentry.

The MB provides both structural and functional substrate for VT

In this study we observed that MB thickening was associated with short ERP and an increased propensity for arrhythmias. MB thickness and myocardial content was variable (see supplemental figure 2) but thickening showed increased myocardial density and increased cellular/extracellular ratios. Conductivity is therefore likely to be reduced in thinner MBs, which in turn prolongs the minimum coupling cycle length required for propagation¹⁵. Non-cellular constituents, such as lipid deposits, were also identified and likely further modulates loading conditions for conduction²².

Clinical relevance

It has been shown that PVCs can originate from RV papillary muscles^{23, 24} and the MB^{6, 10}. The prevalence of, and success of ablation of PVCs originating in the MB are limited. However, Sadek¹⁰ recently identified PVCs originating from the MB in 10 out of 394 idiopathic ventricular fibrillation patients (2.5%). Some 50% of cases were not attributed to the Purkinje network. A second retrospective study of patients with VT by⁶, identified 7 out of 190 patients (3.8%) presenting VT where radiofrequency ablation was targeted to the MB. Interestingly, the cohort of patients for MB origins of VT was larger than that of other endocavity structures, including papillary muscles (5 patients) and free-running Purkinje fibers (3 patients).

Clinical morphologies of PVCs originating from the MB are presented by a left bundle branch block-like ECG for both myocardial-related and Purkinje-related origins¹⁰. But how the macroreentry circuit proposed here manifests clinically is thus far unknown. However, we have identified both structural and electrophysiological markers that increase the susceptibility to VT involving the MB. These are: Increased MB thickness and shorter ERPs and ARIs in the MB than RV free wall. Importantly, the mean MB thickness in humans reported previously and the thicknesses of those measured within this study were greater the threshold of macroreentrant VT induction observed in sheep.

Limitations

Experiments were performed in a novel ventricular wedge configuration in order to have a complete intact MB and simultaneous access to the endocardium. It is conceivable that reentry circuits may be impacted by removal of the posterior aspect of the ventricles. However, using simulations we assessed the impact of the whole ventricle geometry compared to wedge geometry on macroreentrant VT via the MB. We observed little or no changes to either electrophysiological dynamics of the macroreentrant circuit or the vulnerability windows of VT. This study did not investigate trigger mechanisms of VT but provided mechanistic insight in to the role of the MB as substrate.

Conclusions

Short coupled activation of the muscular compartment of the MB can trigger macroreentrant arrhythmias by abridging the RV free wall and septum via the MB. The vulnerability to VT via this mechanism is dependent upon decreasing APD gradients from the RV free wall to the MB. Similar structural compartmentalization to the sheep MB shows potential for the human MB as a substrate for macroreentry.

Competency in Medical knowledge

Ventricular tachycardia following premature ventricular contractions (PVC) has been increasingly recognized as a potential risk for sudden cardiac death. PVCs originating from the moderator band in patients suffering from idiopathic ventricular tachycardia may have either Purkinje or myocardial sources. The moderator band was found to support uni-directional propagation through the slower conducting myocardial compartment that could evolve in to sustained macroreentry through the right ventricular free wall, septum and moderator band.

Translational Outlook

Markers of susceptibility to macroreentrant arrhythmias through the moderator band included increased thickness of the moderator band and earlier recovery from activation compared to the right ventricular free wall.

References

1. Haissaguerre M, Shoda M, Jais P, Nogami A, Shah DC, Kautzner J, Arentz T, Kalushe D, Lamaison D, Griffith M, Cruz F, de Paola A, Gaita F, Hocini M, Garrigue S, Macle L, Weerasooriya R, Clementy J. Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* 2002;**106**(8):962-7.
2. Nogami A, Sugiyasu A, Kubota S, Kato K. Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation from the Purkinje system. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2005;**2**(6):646-9.
3. Van Herendael H, Zado ES, Haqqani H, Tschabrunn CM, Callans DJ, Frankel DS, Lin D, Garcia F, Hutchinson MD, Riley M, Bala R, Dixit S, Yadava M, Marchlinski FE. Catheter ablation of ventricular fibrillation: importance of left ventricular outflow tract and papillary muscle triggers. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2014;**11**(4):566-73.
4. Callans DJ, Menz V, Schwartzman D, Gottlieb CD, Marchlinski FE. Repetitive monomorphic tachycardia from the left ventricular outflow tract: electrocardiographic patterns consistent with a left ventricular site of origin. *Journal of the American College of Cardiology* 1997;**29**(5):1023-7.
5. Movsowitz C, Schwartzman D, Callans DJ, Preminger M, Zado E, Gottlieb CD, Marchlinski FE. Idiopathic right ventricular outflow tract tachycardia: narrowing the anatomic location for successful ablation. *American heart journal* 1996;**131**(5):930-6.
6. Abouezzeddine O, Suleiman M, Buescher T, Kapa S, Friedman PA, Jahangir A, Mears JA, Ladewig DJ, Munger TM, Hammill SC, Packer DL, Asirvatham SJ. Relevance of endocavitary structures in ablation procedures for ventricular tachycardia. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2010;**21**(3):245-54.
7. Gettes L, Surawicz B. Effects of low and high concentrations of potassium on the simultaneously recorded Purkinje and ventricular action potentials of the perfused pig moderator band. *Circulation research* 1968;**23**(6):717-29.
8. Morita T, Shimada T, Kitamura H, Nakamura M. Demonstration of connective tissue sheaths surrounding working myocardial cells and Purkinje cells of the sheep moderator band. *Archives of*

histology and cytology 1991;**54**(5):539-50.

9. Gettes LS, Morehouse N, Surawicz B. Effect of premature depolarization on the duration of action potentials in Purkinje and ventricular fibers of the moderator band of the pig heart. Role of proximity and the duration of the preceding action potential. *Circulation research* 1972;**30**(1):55-66.
10. Sadek MM, Benhayon D, Sureddi R, Chik W, Santangeli P, Supple GE, Hutchinson MD, Bala R, Carballeira L, Zado ES, Patel VV, Callans DJ, Marchlinski FE, Garcia FC. Idiopathic ventricular arrhythmias originating from the moderator band: Electrocardiographic characteristics and treatment by catheter ablation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2015;**12**(1):67-75.
11. Aslanidi OV, Stewart P, Boyett MR, Zhang H. Optimal velocity and safety of discontinuous conduction through the heterogeneous Purkinje-ventricular junction. *Biophysical journal* 2009;**97**(1):20-39.
12. Panfilov AV. Is heart size a factor in ventricular fibrillation? Or how close are rabbit and human hearts? *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2006;**3**(7):862-4.
13. Vigmond EJ, Clements C. Construction of a computer model to investigate sawtooth effects in the Purkinje system. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2007;**54**(3):389-99.
14. Walton RD, Benson AP, Hardy ME, White E, Bernus O. Electrophysiological and structural determinants of electrotonic modulation of repolarization by the activation sequence. *Frontiers in physiology* 2013;**4**:281.
15. Liu Y, Li H, Xia W, Yu S, Huang C, Huang H. Electrophysiological effect of rotigaptide in rabbits with heart failure. *Archives of medical science : AMS* 2014;**10**(2):374-80.
16. Arnar DO, Bulling JR, Martins JB. Role of the Purkinje system in spontaneous ventricular tachycardia during acute ischemia in a canine model. *Circulation* 1997;**96**(7):2421-9.
17. Berenfeld O, Jalife J. Purkinje-muscle reentry as a mechanism of polymorphic ventricular arrhythmias in a 3-dimensional model of the ventricles. *Circulation research* 1998;**82**(10):1063-77.
18. Costeas C, Peters NS, Waldecker B, Ciaccio EJ, Wit AL, Coromilas J. Mechanisms causing sustained ventricular tachycardia with multiple QRS morphologies: results of mapping studies in the infarcted canine heart. *Circulation* 1997;**96**(10):3721-31.

19. Trandum-Jensen J, Wilde AA, Vermeulen JT, Janse MJ. Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. *Circulation research* 1991;**69**(2):429-37.
20. Wang Y, Rudy Y. Action potential propagation in inhomogeneous cardiac tissue: safety factor considerations and ionic mechanism. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2000;**278**(4):H1019-29.
21. Uehara M, Takaoka H, Ozawa K, Kobayashi Y, Funabashi N. Clinical significance of fat infiltration in the moderator band and right ventricular myocardium in multislice CT, and its association with abnormal conduction seen in electrocardiogram. *International journal of cardiology* 2013;**168**(1):352-6.
22. Pouliopoulos J, Chik WW, Kanthan A, Sivagangabalan G, Barry MA, Fahmy PN, Midekin C, Lu J, Kizana E, Thomas SP, Thiagalingam A, Kovoor P. Intramyocardial adiposity after myocardial infarction: new implications of a substrate for ventricular tachycardia. *Circulation* 2013;**128**(21):2296-308.
23. Crawford T, Mueller G, Good E, Jongnarangsin K, Chugh A, Pelosi F, Jr., Ebinger M, Oral H, Morady F, Bogun F. Ventricular arrhythmias originating from papillary muscles in the right ventricle. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2010;**7**(6):725-30.
24. Santoro F, L DIB, Hranitzky P, Sanchez JE, Santangeli P, Perini AP, Burkhardt JD, Natale A. Ventricular tachycardia originating from the septal papillary muscle of the right ventricle: electrocardiographic and electrophysiological characteristics. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2015;**26**(2):145-50.

Figure legends

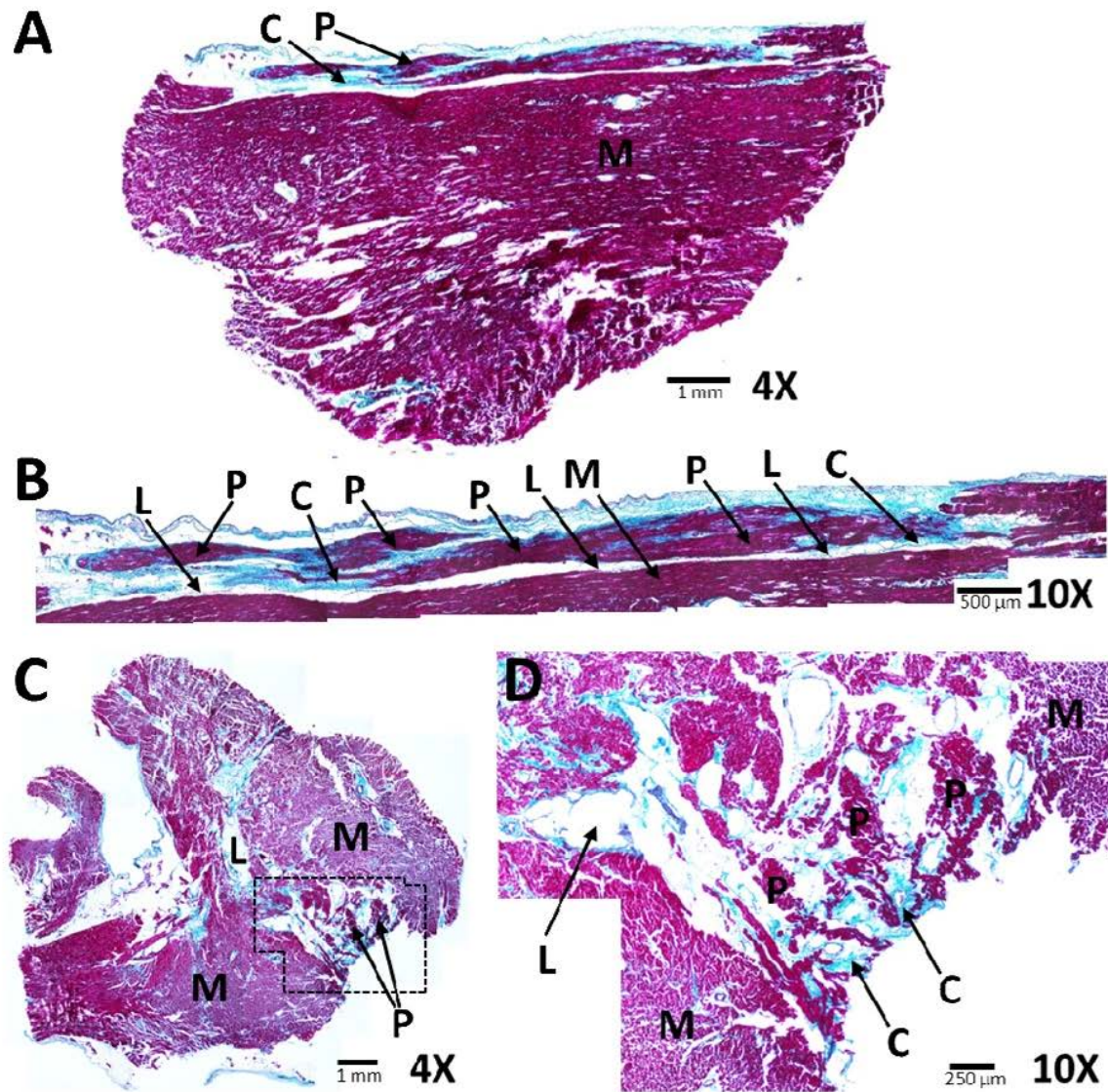


Figure 1. Structure of the human MB. Montages of: MB cross-sections along its longitudinal axis at 4x (A) and 10x (B) and transverse axis at 4x (C) and 10x (D). Cellular and extracellular constituents are: collagen, C; Lipid droplets, L; myocardium, M; Purkinje fibers, P and vasculature, V.

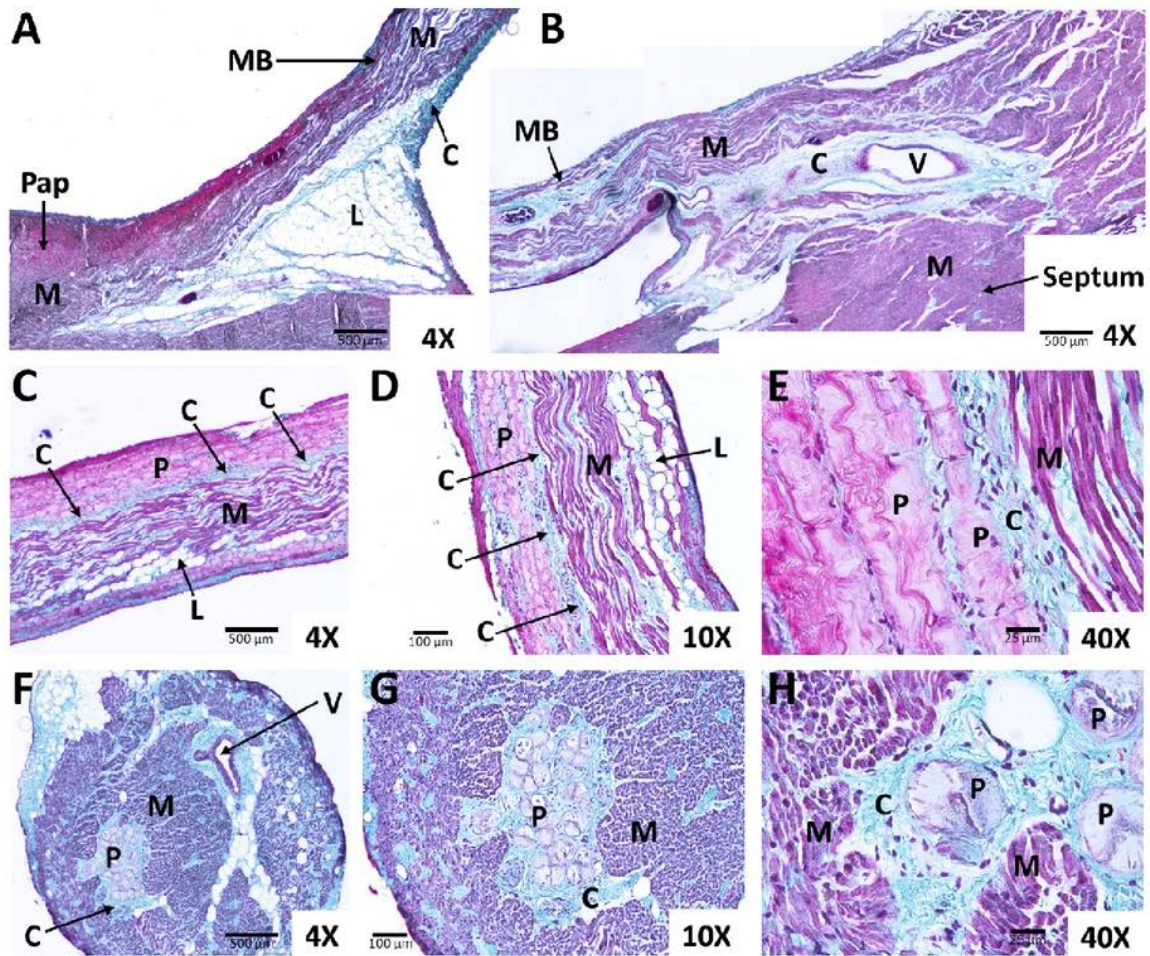


Figure 2. Structure of the sheep MB. Montages of: MB insertions at the RV (A) and septum (B); longitudinal cross-sections of the MB at 4x (C), 10x (D) and 40x (E) and transverse cross-sections of the MB at 4x (F), 10x (G) and 40x (H). Labels are the same as for figure 1.

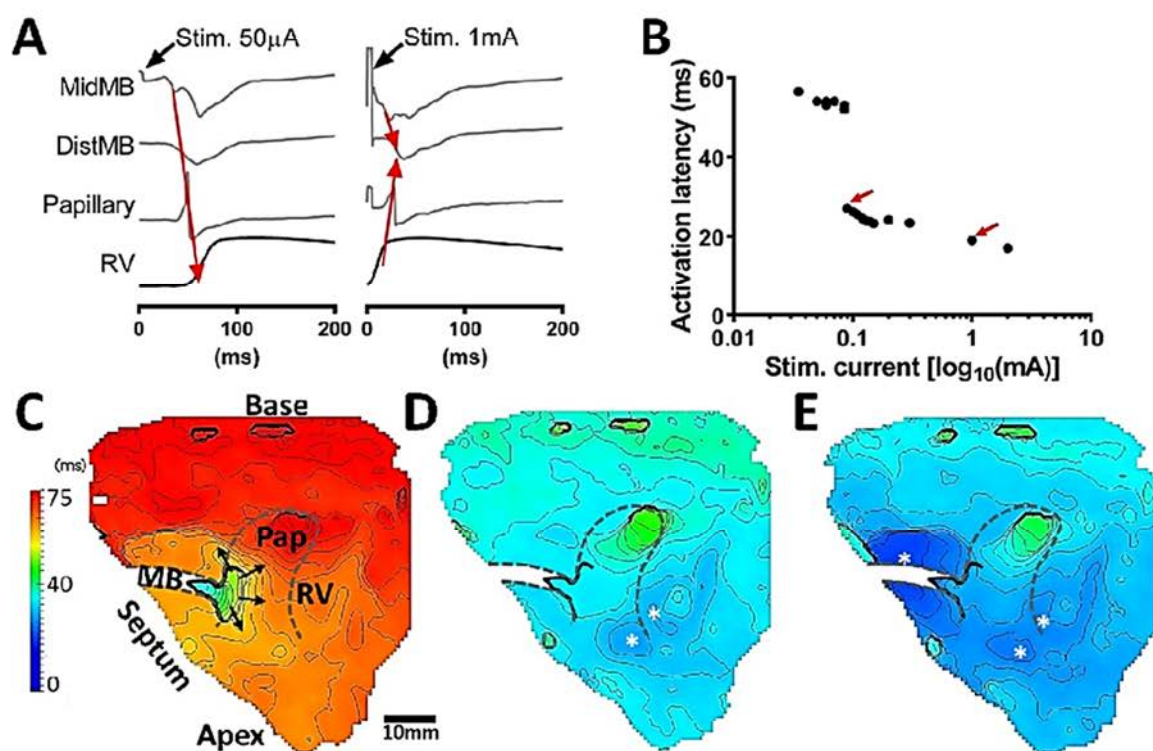


Figure 3. RV AT latency following MB stimulation. A) MB pacing at 50 μ A and 1000 μ A stimuli currents. Red arrows indicate the direction of propagation. B) Step-wise changes (red arrows) of activation latency of the RV free wall with stimulation current. AT maps of the RV free wall are shown for 35 μ A (C), 90 μ A (D) and 1 mA (E). Focal activation sites are indicated by *. Stimulus occurred at $t=0$ s.

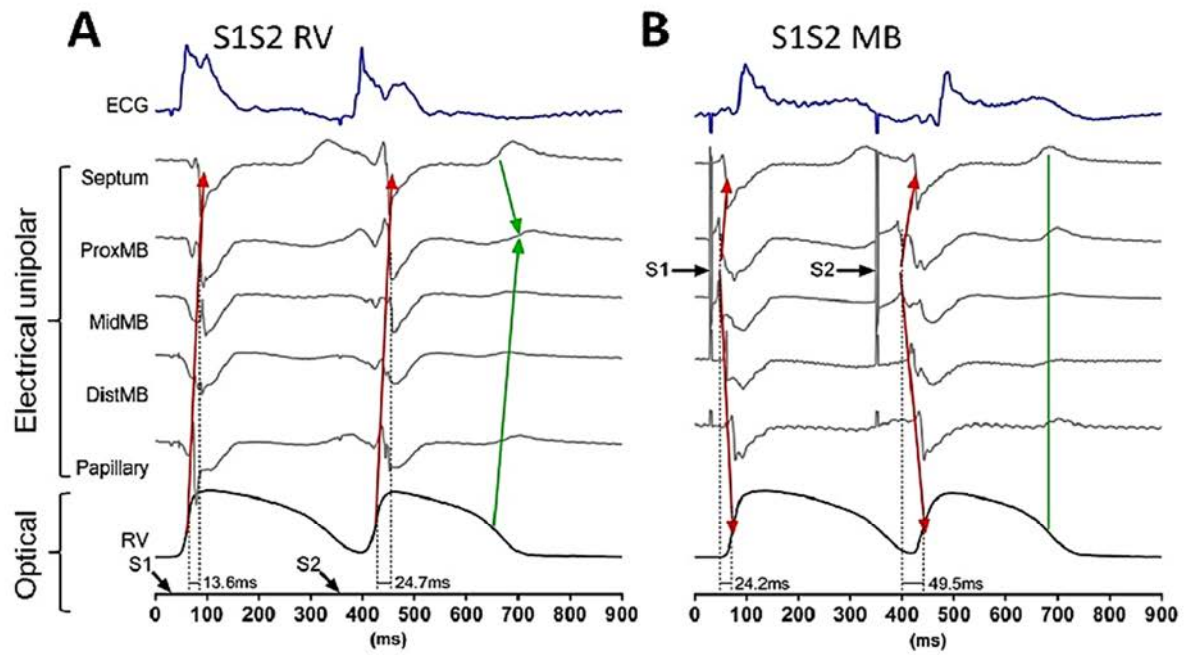


Figure 4. Short coupled S1S2 pacing intervals. The last of a train of S1 pulses and the S2 beat from the ERP were captured by unipolar recordings and simultaneous optical mapping of the RV free wall for RV (A) and MB (B) pacing (black arrows). Directions of propagation (red arrows) and repolarization (green arrows and line) are also shown.

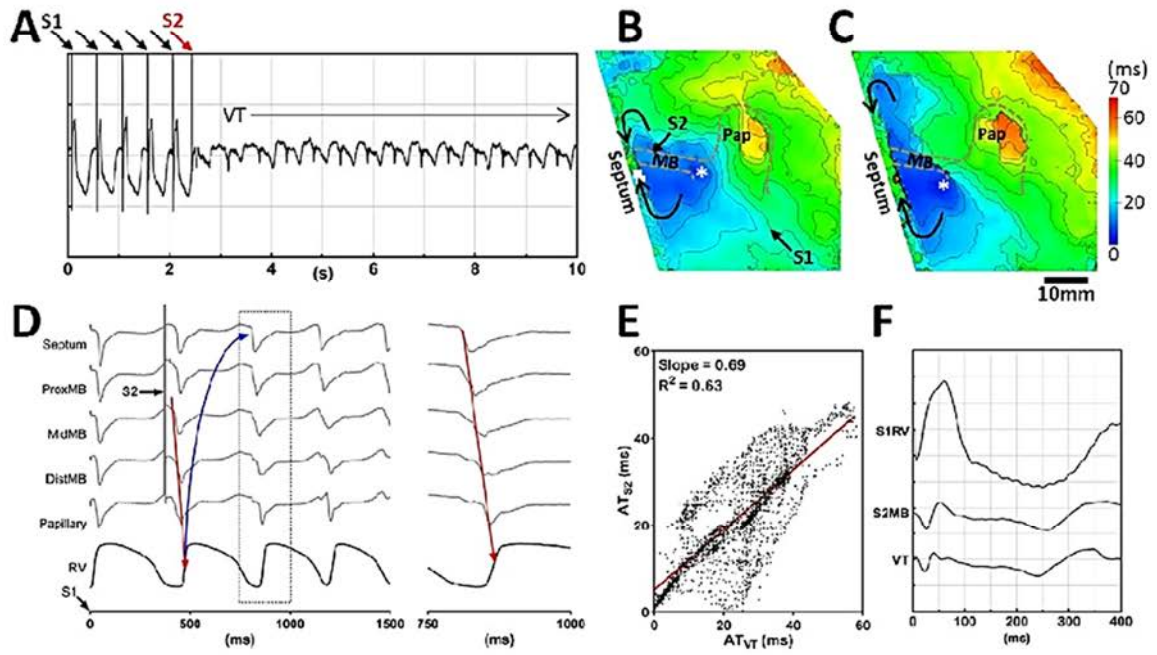


Figure 5. Macroreentrant VT. A) PsuedoECG of sustained VT triggered by a short coupled S2 with interval of 365 ms. AT maps of S2 stimulated beat (B) and the third cycle of VT (C). D) Unipolar and optical traces of the last S1 beat, S2 and the first two cycles of VT. Red arrows indicate the direction of propagation. Blue arrow shows the reentrant circuit. The right panel shows an expanded view of the dotted box during the first cycle of VT. E) Pixel-to-pixel correlation plot of AT for S2 and VT. F) ECG traces of single cycles of S1, S2 and VT are overlaid.

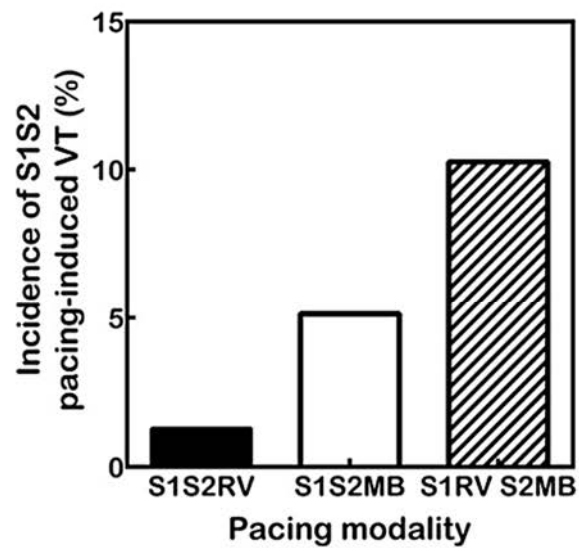


Figure 6. Incidence of VT. The frequency of VT induced by S1S2 pacing configurations.

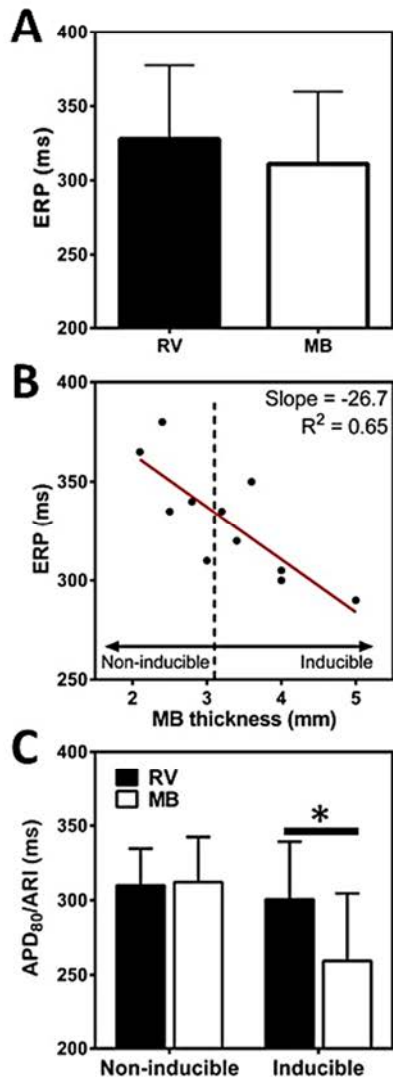


Figure 7. Repolarization characteristics. A) Comparisons of ERP between the MB and RV free wall. B) Linear correlation of ERP at the MB and MB thickness. C) Data were separated in to inducible and non-inducible for VT during S1S2 pacing. The APD for optical recordings and ARI for unipolar recordings were compared for two groups at the basic S1 pacing cycle length. Statistical differences were determined by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *P<0.05.

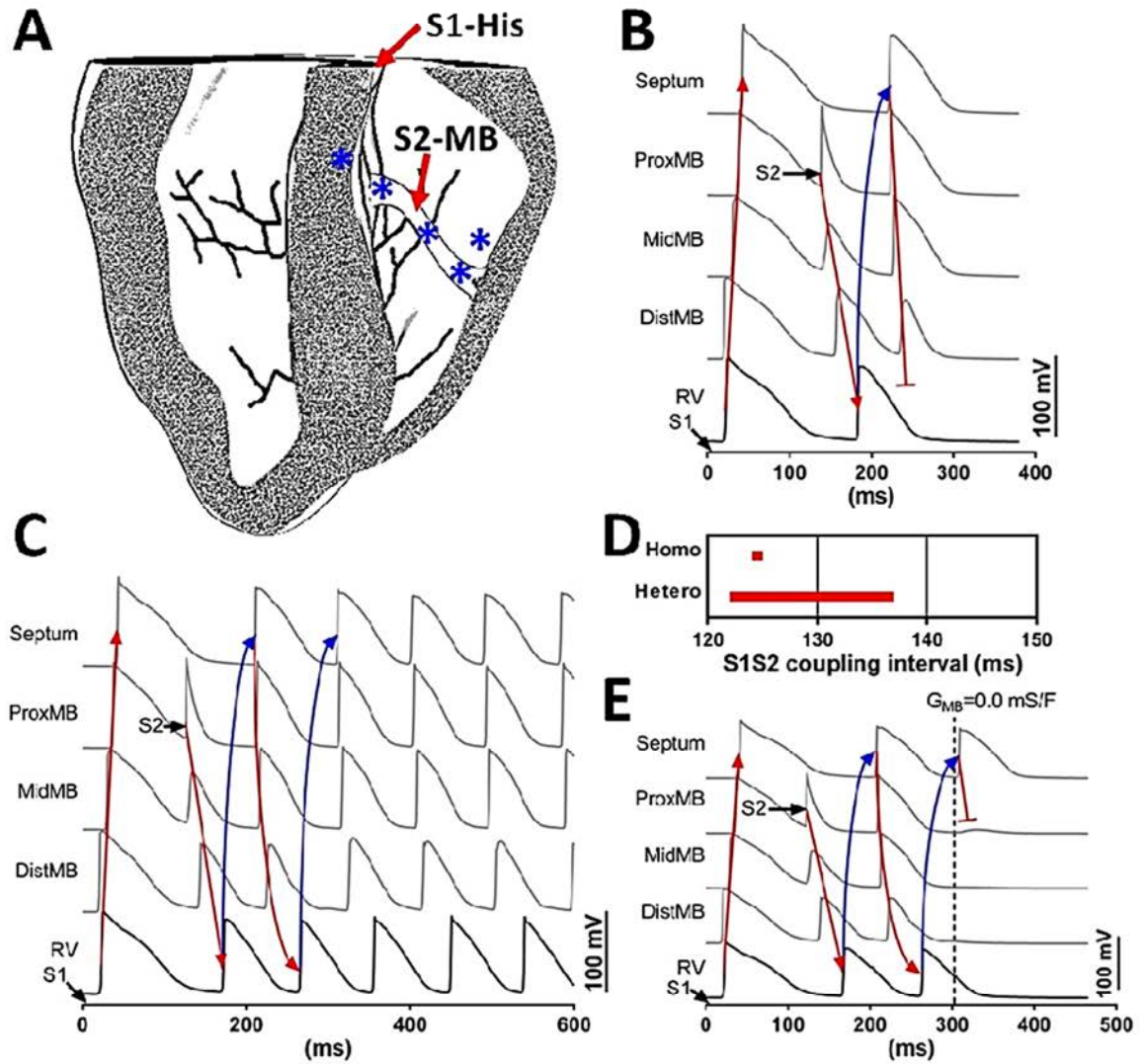
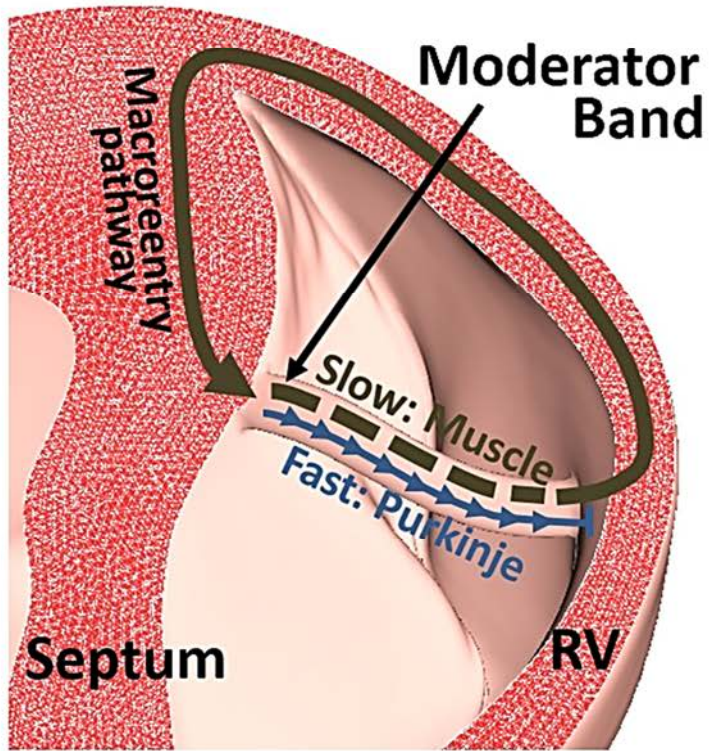


Figure 8. Simulations of the vulnerability to VT. Sinus rhythm in a whole ventricle model was simulated with a short coupled S2 pulses from the MB. A) Cross-section of the whole heart geometry. Simulations of S1S2 pacing in models with either homogeneous ionic properties in the myocardium (B), or heterogeneous short APD in the myocardial compartment of the MB (C). Nodes where electrical AP traces were extracted for comparison are indicated by * in A and correspond with locations in experiments (figures 4 and 5D). Directions of propagation and reentry are indicated with red and blue arrows, respectively. D) Windows of vulnerability of VT throughout S1S2 coupling intervals. E) The conduction of the MB was blocked during reentry by the reduction of G_{Na} to zero in MB myocardial nodes at $t = 300 \text{ ms}$. Locations of traces are as for panels B and C.



Central illustration.

4.3. Résultats complémentaires

4.3.1. *Différence de structure entre le ventricule gauche de brebis et le ventricule gauche humain*

La structure isolée de la BM a permis de faciliter l'identification des cellules de Purkinje (CP) au trichrome de Masson, de par leur isolement du reste des cardiomyocytes par du collagène.

Cependant, la localisation de ces cellules au sein du myocarde ventriculaire humain reste moins évidente voire impossible avec ce type de coloration (figure 38). Contrairement au modèle de brebis où les CP sont rapidement identifiables de par leur plus grande taille, leur coloration distincte et leur isolement des myocytes ventriculaires par le collagène (figure 39), les CP humaines ne possèdent pas de différence visuelle de taille ou de coloration permettant de les différencier du reste du myocarde, comme décrit précédemment (Lee et al 2004, Ono et al 2009). Néanmoins, la coloration des CP chez le myocarde de brebis a permis de confirmer leur localisation transmurale ainsi que leur co-localisation avec les vaisseaux sanguins (figure 39 A-B). La présence d'un tapis de CP à la surface de l'endocarde a également été mise en évidence, cependant, l'identification des PMJs ou des cellules de transition au sein du ventricule gauche de brebis n'a pas été possible avec la coloration au trichrome de Masson (figure 40). C'est pourquoi la technique de clarification optique a été utilisée.

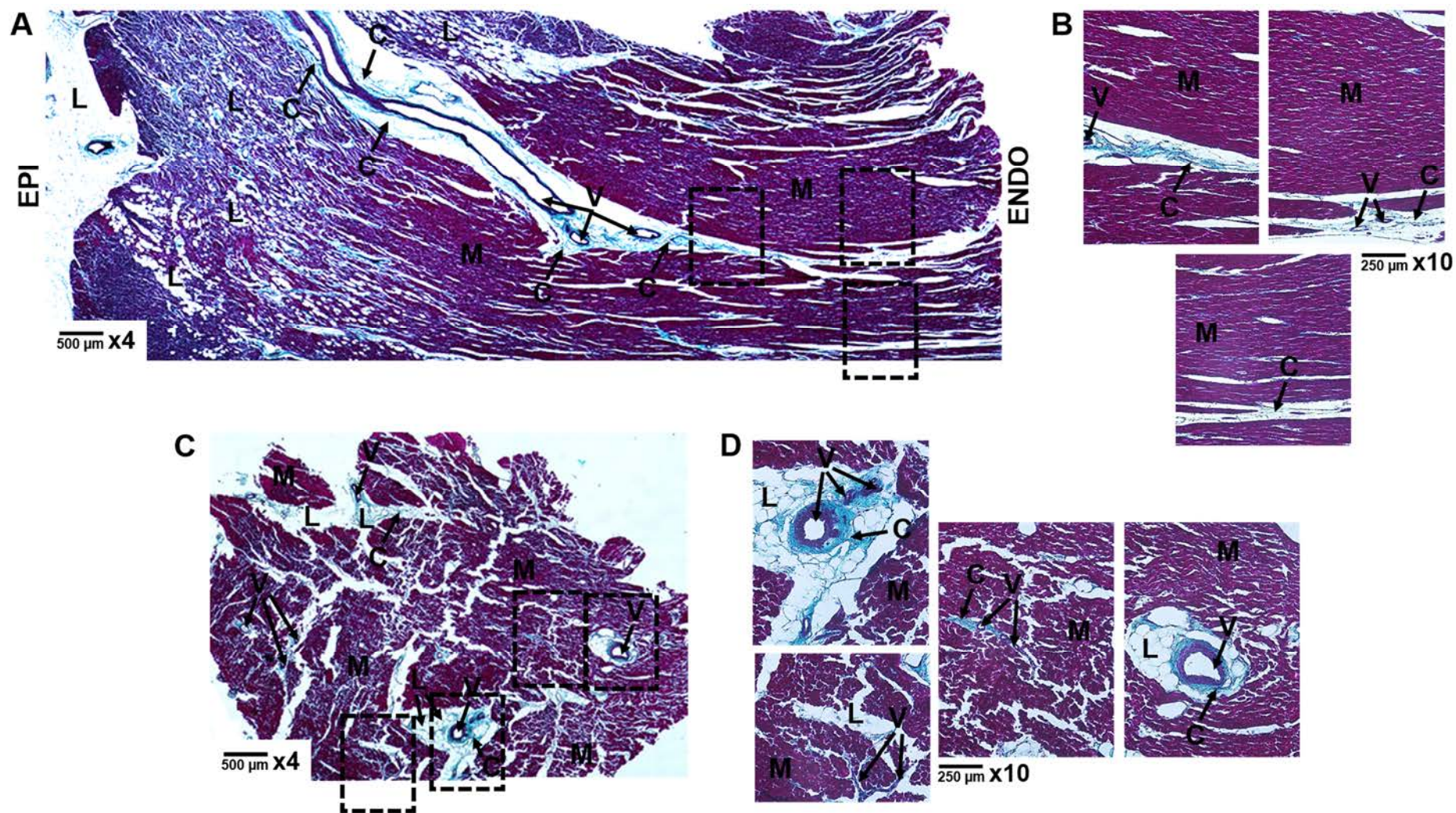


Figure 38 : Coloration du ventricule gauche humain au trichrome de Masson. Coupes transversales au x4 (A) et x10 (B) et coupes longitudinales au x4 (C) et x10 (D). C : collagène, L : lipides, M : myocarde, V : vaisseaux sanguins.

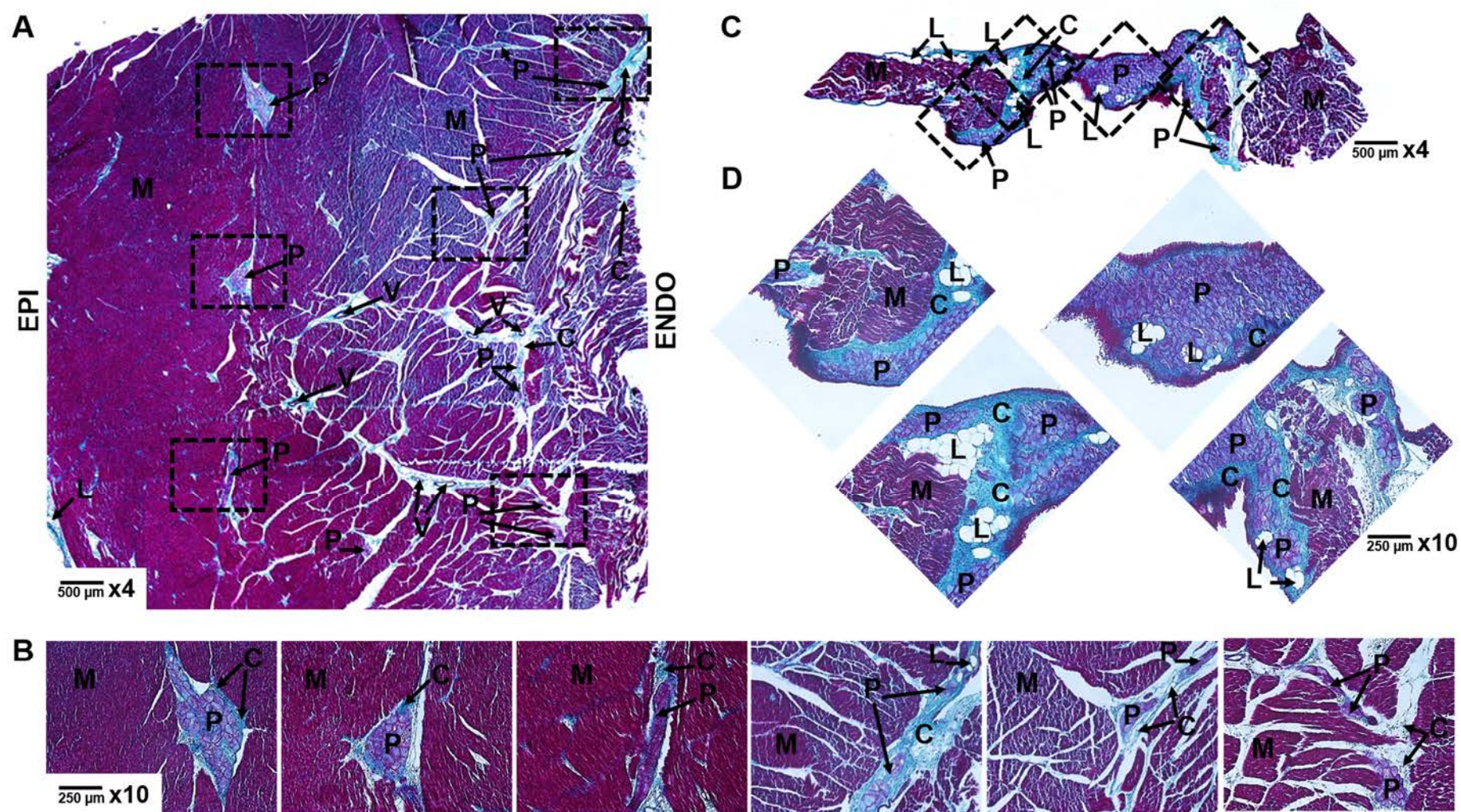


Figure 39 : Coloration du ventricule gauche de brebis au trichrome de Masson. Coupes transversales au x4 (A) et x10 (B) et coupes longitudinales au x4 (C) et x10 (D). C : collagène, L : lipides, M : myocarde, P : cellules de Purkinje, V : vaisseaux sanguins.

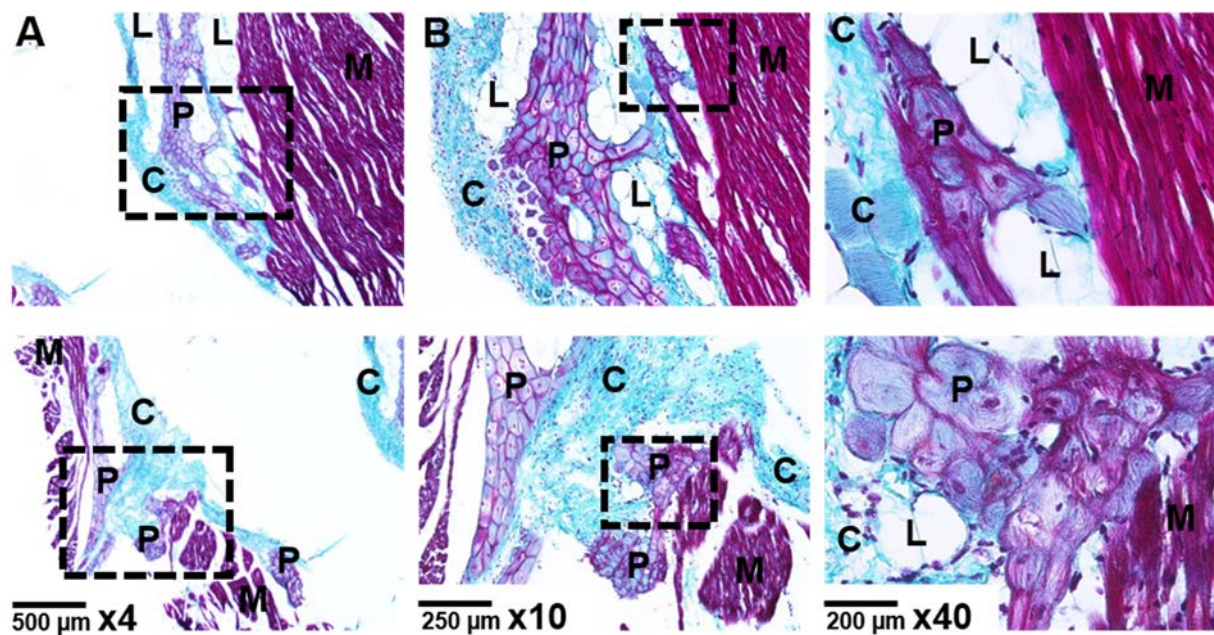


Figure 40 : Coupes longitudinales du ventricule gauche de brebis au x4 (A), x10 (B) et x40 (C).

C : collagène, L : lipides, M : myocarde, P : cellules de Purkinje.

4.3.2. Résultats préliminaires de la reconstruction en trois dimensions de la paroi libre du ventricule gauche de brebis et du ventricule gauche humain

Dans le cadre d'un projet de collaboration internationale avec l'Université d'Auckland en Nouvelle Zélande, la technique de clarification optique du tissu au salicylate de méthyle a pu être mise en place. Cette méthode couplée à la microscopie confocale a permis d'obtenir des premiers résultats concernant l'architecture en trois dimensions du myocarde ventriculaire, via un marquage spécifique du plasma membranaire des myocytes du ventricule. En effet, l'utilisation d'un anticorps, le WGA (pour « wheat germ agglutinin ») conjugué Alexa Fluor® 633 (Invitrogen), qui se fixe spécifiquement aux glycoprotéines des membranes cellulaires (dilution 1 : 200) a permis la visualisation au microscope confocal (excitation : 635nm, émission : 650 nm avec un filtre passe-haut) de la paroi libre du ventricule gauche chez la brebis (figure 41) mais aussi chez l'homme (figure 42), avec une résolution de $0,41 \times 0,41 \times 2 \mu\text{m}$ et une profondeur maximale de la surface vers l'intérieur du tissu respectivement de 129 et 136 μm .

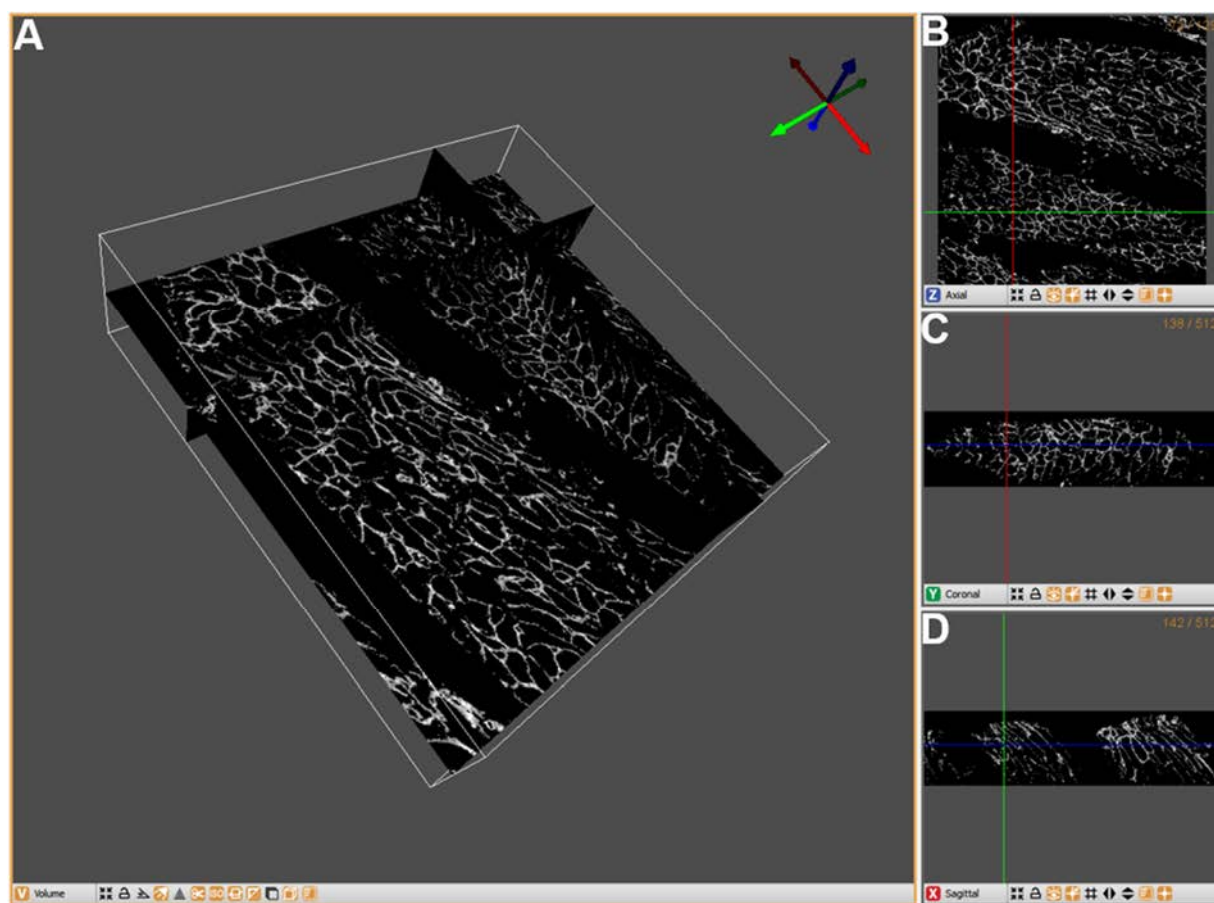


Figure 41 : *Reconstruction en trois dimensions de la paroi libre du ventricule gauche de brebis. Marquage du plasma membranaire (blanc) par le WGA au x60, en volume (A), en coupes axiale (B), coronale (C) et sagittale (D).*

Ces résultats préliminaires montrent une nouvelle possibilité pour obtenir la caractérisation des PMJs dans le futur. En effet, cette technique couplée à d'autres anticorps, tels que les anticorps anti-connexines 40 et 43, permettrait de mieux comprendre et interpréter la configuration des PMJs et des cellules voisines. Ici, il s'agit simplement d'illustrer nos résultats via un logiciel de visualisation Seg3D2® (National Institutes of Health), cependant, des mesures plus quantitatives peuvent également être effectuées via l'utilisation d'autres logiciels comme ImageJ (National Institutes of Health). Cette technique permettrait d'approfondir et de compléter certains paramètres pour les modèles de simulations informatiques dans le but de déterminer la fonction et les caractéristiques des jonctions actives.

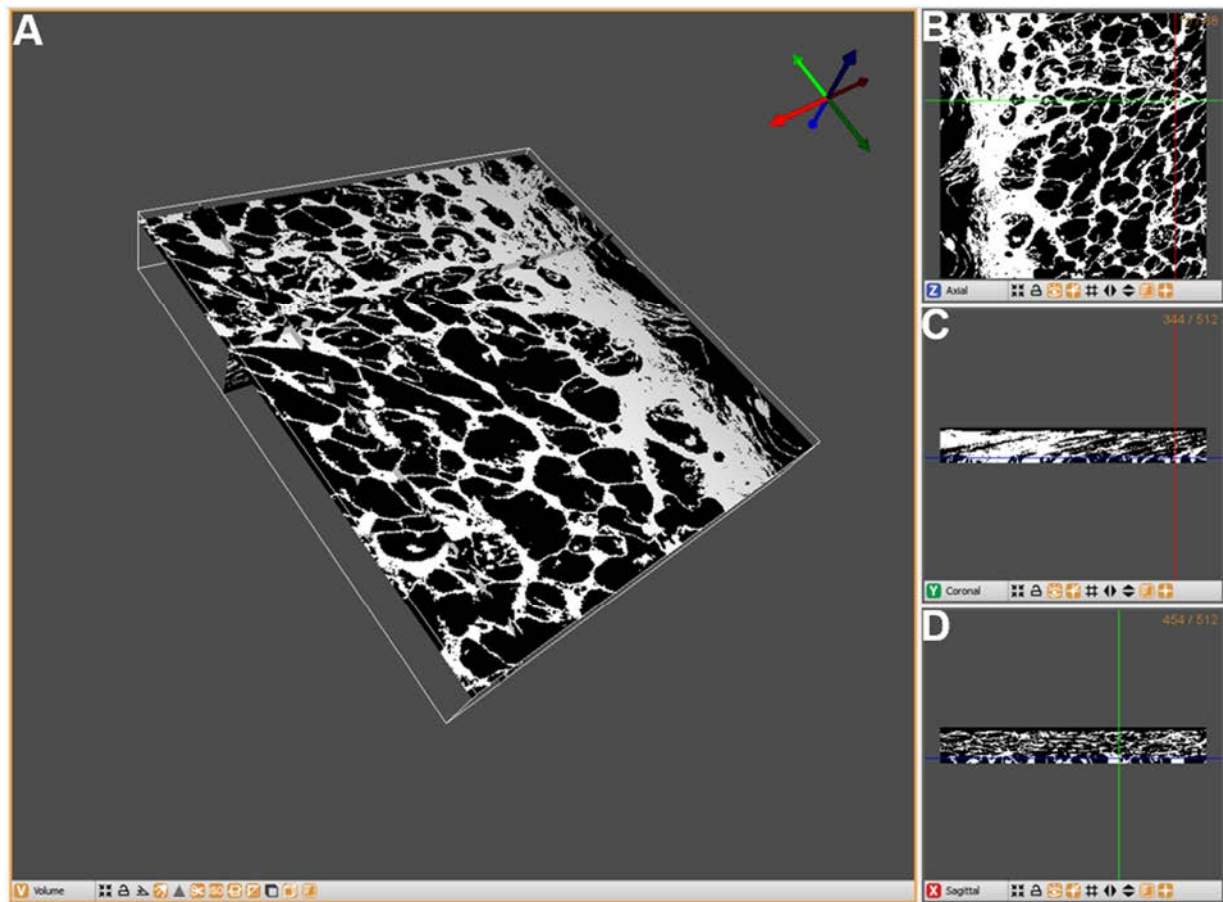


Figure 42 : *Reconstruction en trois dimensions de la paroi libre du ventricule gauche.*

Marquage du plasma membranaire (blanc) par le WGA au x60, en volume (A), en coupes axiale (B), coronale (C) et sagittale (D).

4.4. Conclusion

La première partie des résultats de cette étude met en évidence un nouveau mécanisme par lequel la BM fournit elle-même un substrat pour la tachycardie ventriculaire. Les résultats complémentaires de cette étude montrent la difficulté d'identification du Purkinje entre les espèces mais également la complexité de mise en évidence des PMJs. Pour la suite de nos expériences, une étude comparative chez l'homme constituait une réelle opportunité dans la compréhension de mécanismes sous-jacents à certains médicaments ou pathologies cardiaques, impossible à caractériser lors de l'analyse clinique.

5. Modulation de l'hétérogénéité transmurale de la durée du potentiel d'action par la flécaïnide chez l'homme

5.1. Contexte et objectif

Comme il a été démontré lors des deux premières études, l'hétérogénéité transmurale de l'APD joue un rôle important dans la coordination de la repolarisation des ventricules. Cependant, une hétérogénéité anormale de l'APD des ventricules peut contribuer au déclenchement de l'arythmie (Glukhov et al 2010, Kuo et al 1983). De plus, il a été prouvé que ce gradient d'APD pouvait être modulé par la séquence d'activation chez le petit animal (Myles et al 2010, Walton et al 2013) et les résultats de la seconde étude ont également démontré que la séquence d'activation jouait un rôle important dans la dispersion transmurale chez la brebis, notamment par l'activation du système de Purkinje qui peut moduler les gradients de repolarisation transmurale.

Dans le cadre du projet de recherche commun de l'IHU-LIRYC avec le CHU de Bordeaux sur des cœurs de donneurs humains rejetés pour la transplantation cardiaque (*Cf. Méthodes 6*), l'opportunité unique s'est présentée de mettre en place les protocoles expérimentaux appliqués chez l'animal directement sur des cœurs humains afin d'obtenir des données comparables.

Le but de l'étude était donc de déterminer l'influence de la séquence d'activation sur le gradient transmural de l'APD chez le cœur humain, mais également de s'intéresser à l'effet d'un médicament, la flécaïnide, un agent anti-arythmique de classe 1c, sur la repolarisation ventriculaire. La flécaïnide, qui est un inhibiteur non spécifique des canaux sodiques, est un traitement largement utilisé contre la fibrillation des oreillettes. Cependant, elle peut avoir des effets secondaires pro-arythmogènes dans certaines pathologies cardiaques comme l'infarctus du myocarde (Andrikopoulos et al 2015). Des études récentes ont notamment suggéré des effets inhibiteurs de ce médicament sur les canaux potassiques (Andrikopoulos et al 2015, Tamargo et al 2004), mais son potentiel impact sur la repolarisation des ventricules humains reste inconnu à ce jour. Il s'agissait donc de réaliser les mêmes expériences de cartographie optiques que chez la brebis, à partir de ventricules isolés et perfusés, stimulés sur l'endocarde ou l'épicarde, avant et après ajout de flécaïnide (1 μ M) (Andrikopoulos et al 2015).

L'ensemble de mes travaux pour cette étude a consisté à participer aux expériences de cartographie optique sur les ventricules gauches humains ainsi qu'à l'analyse préliminaire des données obtenues.

5.2. Résultats préliminaires

5.2.1. Données cliniques des donneurs

Les cœurs des donneurs ne possédaient pas d'anomalies structurelles et leur fraction d'éjection était normale ($> 40\%$), ils ont été rejetés pour la transplantation cardiaque en raison de leur âge trop avancé (> 65 ans) (figure 43).

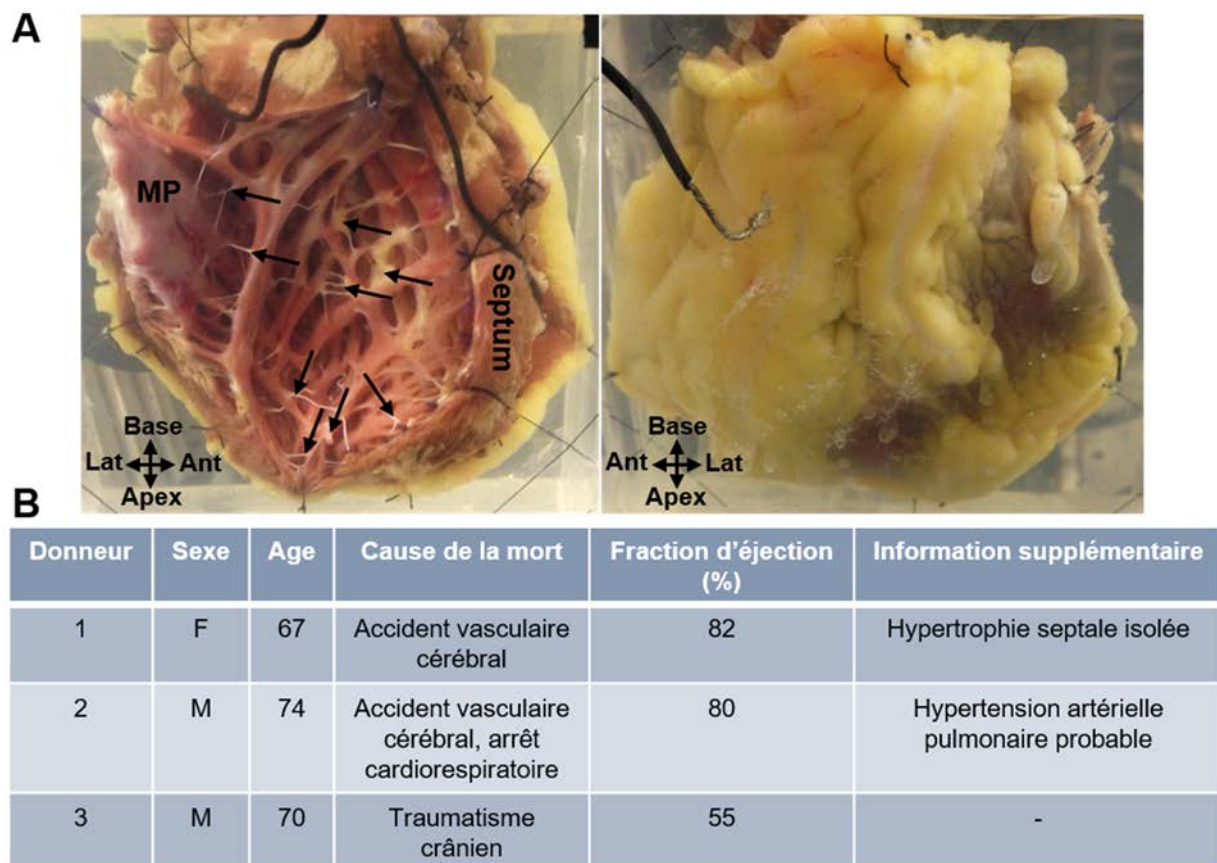


Figure 43 : **A.** Ventricule gauche coté endocardique et épicaudique. MP : muscle papillaire, flèches : fibres de Purkinje. **B.** Tableau récapitulatif des informations cliniques des donneurs.

5.2.2. Donneur n°1 : femme de 67 ans

Après normalisation et filtrage des signaux optiques (Cf. Méthodes 2.6), l'extraction des valeurs d'APD pour chaque pixel de la surface endocardique ou épocardique a été générée via l'utilisation d'un programme personnalisé (Pv-Wave 9.5, Rogue Wave Software, Inc). Ces premiers résultats correspondent donc à une analyse spatiale de l'APD dans l'axe transmural sur l'ensemble de la préparation.

Les cartes d'activation (AT) de l'endocarde et de l'épicarde ont révélé une augmentation de l'AT total après 15 minutes de perfusion avec la flécaïnide (73 ms versus 85 ms et 34 ms versus 57 ms ; respectivement) lors de la stimulation de l'endocarde à 1 Hz (figure 44 A). Concernant la mesure des APDs globales, une différence significative entre les APD₉₀ de l'endocarde (397 ± 41 ms) et de l'épicarde (274 ± 76 ms) a été observée en condition contrôle lors de la stimulation à 1 Hz de l'endocarde. Cette différence significative a également été retrouvée lors de la stimulation de l'endocarde à 2,5 Hz (endocarde : 276 ± 36 ms, épicarde : 175 ± 44 ms). Après ajout de la flécaïnide, le gradient significatif entre les APD₉₀ de l'endocarde et de l'épicarde est toujours maintenu à 1 Hz ($p < 0,05$), même si diminué. De manière surprenante, à 2,5 Hz, ce gradient toujours significatif s'est retrouvé inversé après perfusion de la flécaïnide (endocarde : 251 ± 47 ms, épicarde : 330 ± 86 ms) (figure 44 B).

5.2.3. Donneur n°2 : homme de 74 ans

Les cartes d'AT de l'endocarde et de l'épicarde du second donneur ont montré, tout comme chez le premier donneur, une augmentation de l'AT total après perfusion de la flécaïnide (44 ms versus 73 ms et 25 ms versus 45 ms ; respectivement) (figure 45 A). Cependant, à 1 Hz la différence significative entre les APD₉₀ de l'endocarde (435 ± 69 ms) et de l'épicarde (364 ± 60 ms) est moins prononcée en condition contrôle par rapport au premier donneur. Ce gradient significatif est maintenu après ajout de la flécaïnide mais comme pour le premier donneur, il est diminué. A 2,5 Hz en condition contrôle, le gradient est toujours significatif mais se retrouve inversé (endocarde : 282 ± 32 ms, épicarde : $\pm 290 \pm 59$ ms) et après perfusion de la flécaïnide il disparaît (figure 45 B).

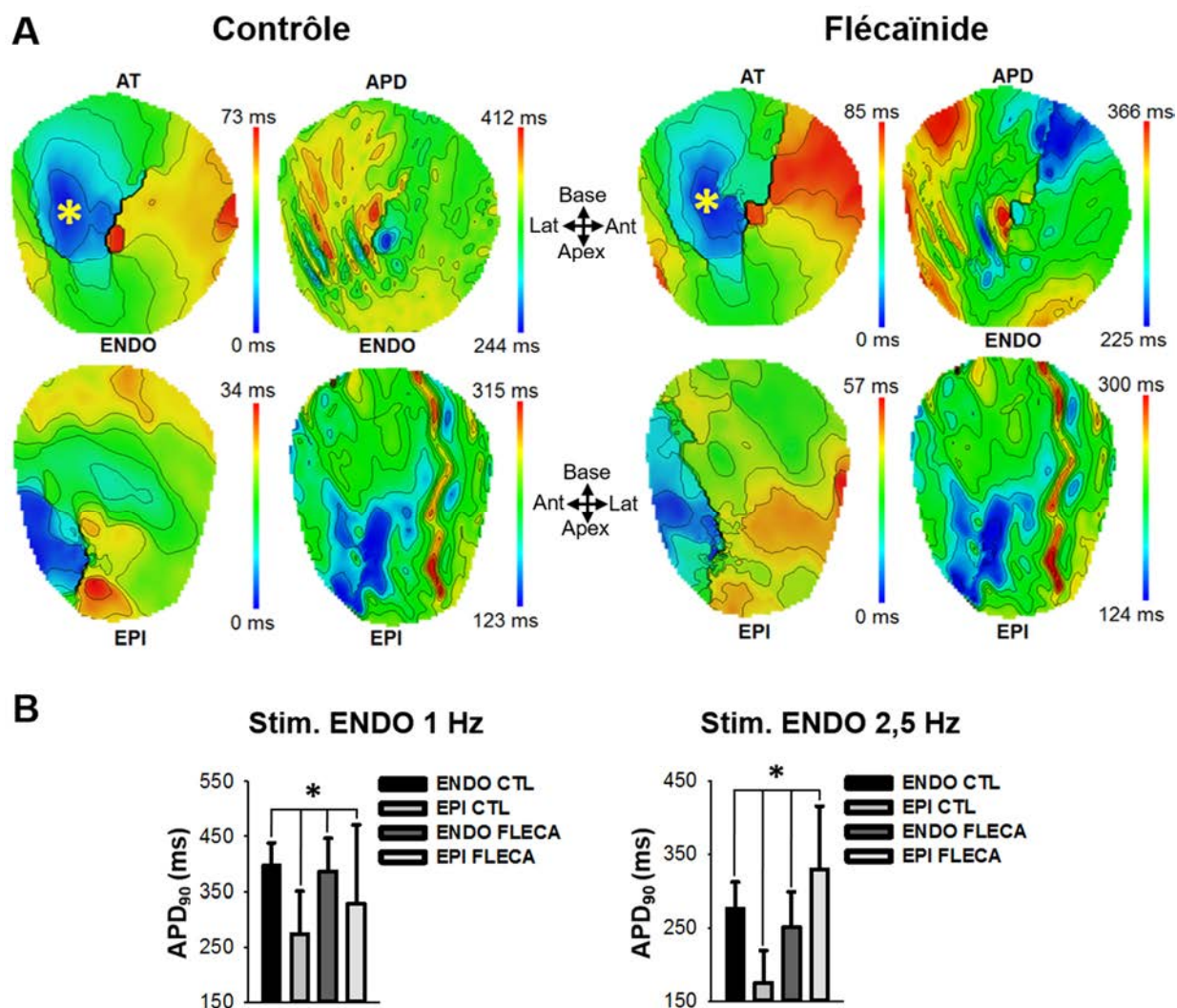


Figure 44 : **A.** Cartes d'AT et d'APD de l'endocarde (ENDO) et de l'épicarde (EPI) lors de stimulations de l'ENDO à 1 Hz, marqué par (*), en condition contrôle (CTL) et après perfusion de flécaïnide (FLECA) durant 15 minutes. Les isochrones correspondent à 10 ms d'espacement.

B. Moyenne $\pm$ SD des APD₉₀ de l'ENDO et de l'EPI pour une stimulation de l'ENDO à 1 ou 2,5 Hz, avant et après perfusion de FLECA. * indique $p < 0,05$.

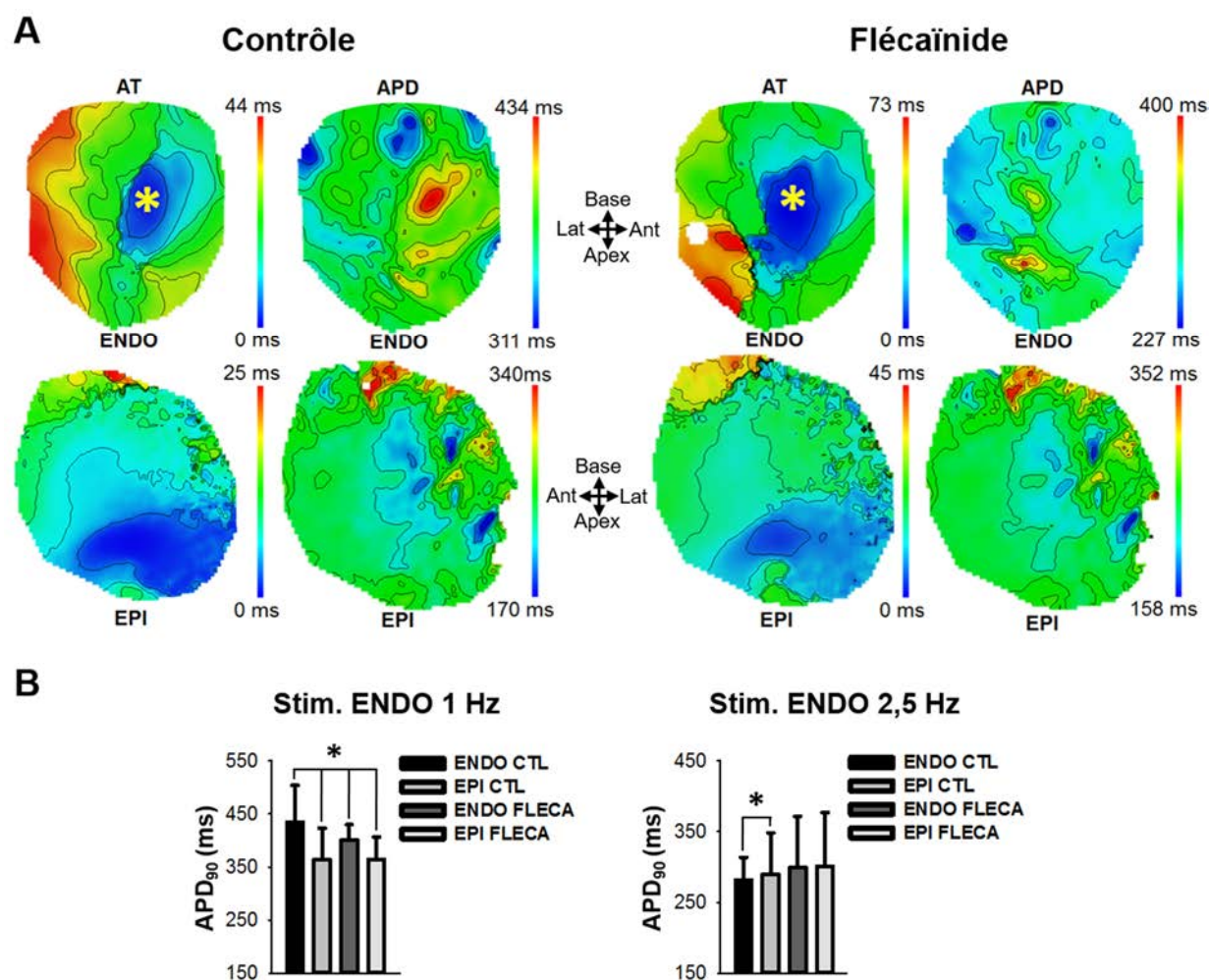


Figure 45 : A. Cartes d'AT et d'APD de l'ENDO et de l'EPI lors de stimulations de l'ENDO avant et après ajout de FLECA. **B.** Moyenne $\pm$ SD des APD₉₀ globales de l'ENDO et de l'EPI pour une stimulation de l'ENDO à 1 ou 2,5 Hz, avant et après perfusion de FLECA.

* indique $p < 0,05$.

5.2.4. Donneur n°3 : homme de 70 ans

Des résultats similaires au second donneur ont été retrouvés chez le troisième donneur, avec une différence significative entre les APD₉₀ de l'endocarde (420 ± 33 ms) et de l'épicarde (394 ± 42 ms) lors de la stimulation à 1 Hz de l'endocarde. Cette différence était aussi moins prononcée par rapport à celle observée chez le premier donneur. Après perfusion de la flécaïnide, ce gradient était fortement réduit à 2 Hz (endocarde : 442 ± 22 ms, épicarde : 421 ± 33 ms) par rapport à la condition contrôle (endocarde : 446 ± 25 ms, épicarde : 404 ± 36 ms) (figure 46).

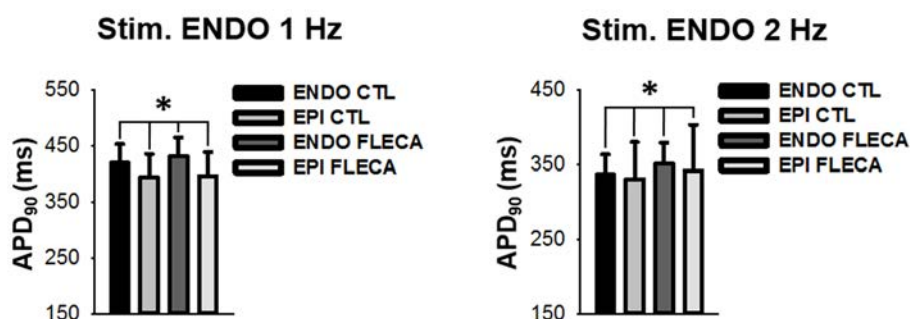


Figure 46 : Moyenne $\pm$ SD des APD₉₀ globales de l'ENDO et de l'EPI lors de stimulations de l'ENDO à 1 ou 2 Hz, avant et après perfusion de FLECA. * indique $p < 0,05$.

5.2.5. Gradients transmuraux des trois donneurs

A 1 Hz, aucune modification du gradient transmural de l'APD₉₀ n'a été observée après perfusion de la flécaïnide (73 ± 49 ms versus 43 ± 13 ms). De manière intéressante, à une fréquence de stimulation plus élevée (> 2 Hz) le gradient de l'APD₉₀ est retrouvé inversé (33 ± 59 ms versus -24 ± 48 ms). Cet effet était le plus prononcé chez le premier donneur (101 ms versus -79 ms) (figure 47).

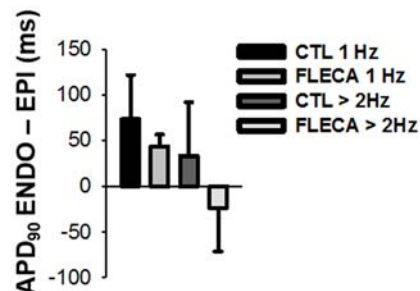


Figure 47 : Moyenne $\pm$ SD des gradients transmurales de l'APD₉₀ des 3 donneurs, en condition CTL ou FLECA et pour une stimulation de l'ENDO à 1 Hz ou > 2 Hz.

5.3. Discussion et conclusion

Les résultats préliminaires suggèrent un rôle de la flécaïnide dans la modulation du gradient transmural d'APD chez le ventricule gauche humain et ce, de manière dépendante de la fréquence de stimulation. Ces premiers résultats mettent en évidence un effet potentiellement inhibiteur de la flécaïnide sur les canaux potassiques et de préférence dans l'épicarde. Par ailleurs, il semblerait exister une différence potentielle entre les hommes et les femmes, cet argument doit évidemment être confirmé par d'autres expériences. L'influence de la séquence d'activation suivant le site de stimulation (épicarde et fibres de Purkinje) doit également être étudiée et envisagée dans les prochaines expériences.

6. Substrat électrophysiologique du syndrome de repolarisation précoce chez l'homme

6.1. Contexte et objectif

Le syndrome de repolarisation précoce (ou ERS pour « Early Repolarization Syndrome ») est associé à une augmentation du risque de développer une fibrillation ventriculaire (FV) précédant la mort subite cardiaque, avec une prévalence comprise entre 3-24% dans la population générale et plus élevée chez les athlètes (~ 36%) ou les survivants à de la FV idiopathique (31-42%) (Biasco et al 2013, Haissaguerre et al 2008, Nam et al 2008, Rosso et al 2008, Serra-Grima et al 2015). L'ERS correspond à des anomalies électrocardiographiques caractérisées par une ascension du point J (jonction entre le QRS, onde de dépolarisation et contraction des ventricules, et le ST, repolarisation des ventricules), une onde J avec ou sans élévation du segment ST ou un empâtement terminal du complexe QRS (figure 48).

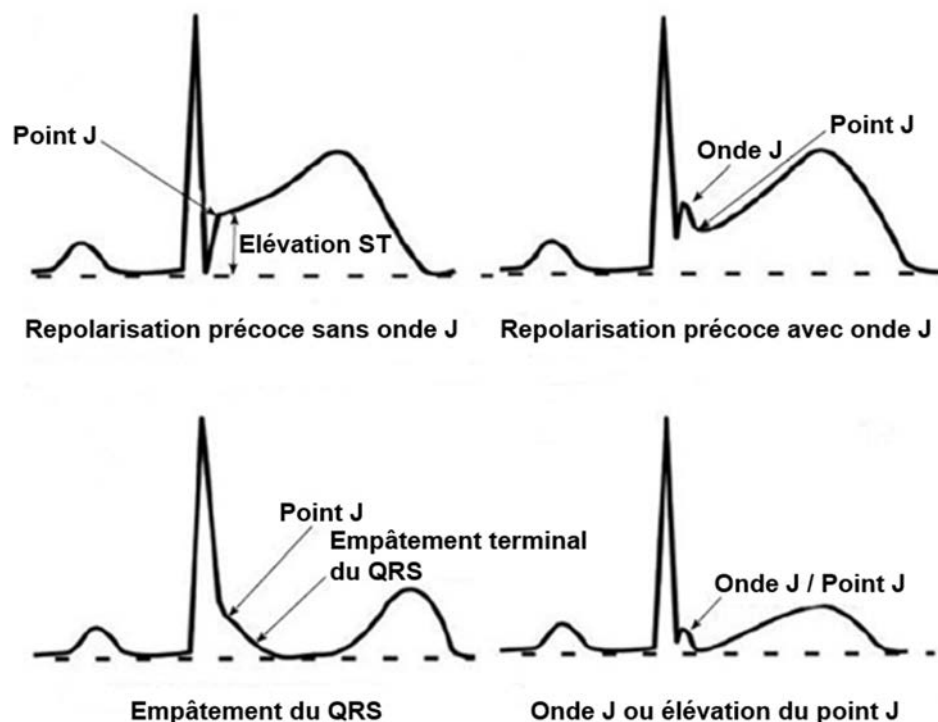


Figure 48 : Différents types d'électrocardiogrammes présentant une repolarisation précoce.

Adapté de Perez et al 2012.

Le substrat sous-jacent à l'ERS est actuellement en cours de débat et se divise en deux hypothèses, la repolarisation précoce ou l'activation tardive. Dans la première hypothèse, l'onde J serait le résultat d'une augmentation du gradient transmural, principalement due au courant I_{to} lors de la phase 1 de repolarisation précoce qui résulterait en une perte du dôme et un fort raccourcissement du PA de l'épicarde (*Cf. Introduction 2.2*). Dans la seconde hypothèse, l'élévation du segment ST et l'empâtement du QRS seraient la conséquence d'une augmentation de la complexité de la séquence d'activation avec des différences locales du AT transmural résultant de sites avec une activation tardive (Boineau 2007)

Le but de cette étude était de comprendre les mécanismes contribuant à l'ERS qui sont impossibles à déterminer seulement à partir de données cliniques. Il s'agit pour la première fois, de l'examen détaillé d'un cœur humain présentant un ERS. Ce cœur a été étudié de manière *ex vivo* en utilisant un éventail d'approches pour déterminer ses propriétés génétiques, fonctionnelles et structurelles sous-jacentes. Ce cas a été comparé directement aux cœurs de donneurs de trois individus en bonne santé.

L'ensemble de mes travaux pour cette sixième étude s'est tourné vers l'analyse histologique des ventricules gauches des différents donneurs afin de déterminer s'il existait un remodelage structurel du tissu chez le cœur présentant un ERS par rapport aux trois cœurs des donneurs en bonne santé.

6.2. Résultats

6.2.1. Données cliniques des donneurs

Les cœurs des différents donneurs provenaient de deux femmes et deux hommes possédant un âge comparable (69 ± 4 ans). Cependant, le cœur du donneur présentant un ERS présentait des dysfonctions hémodynamiques avec une fraction d'éjection basse de 30% et des dysfonctions électriques avec des contractions ventriculaires prématurées mais surtout l'élévation du segment ST, identifiée par des flèches sur les tracés de l'électrocardiogramme (ECG) et localisée dans la partie latérale du ventricule gauche (VG). Les trois autres cœurs des donneurs ne présentaient pas d'anomalies cardiovasculaires antérieures (figure 49).

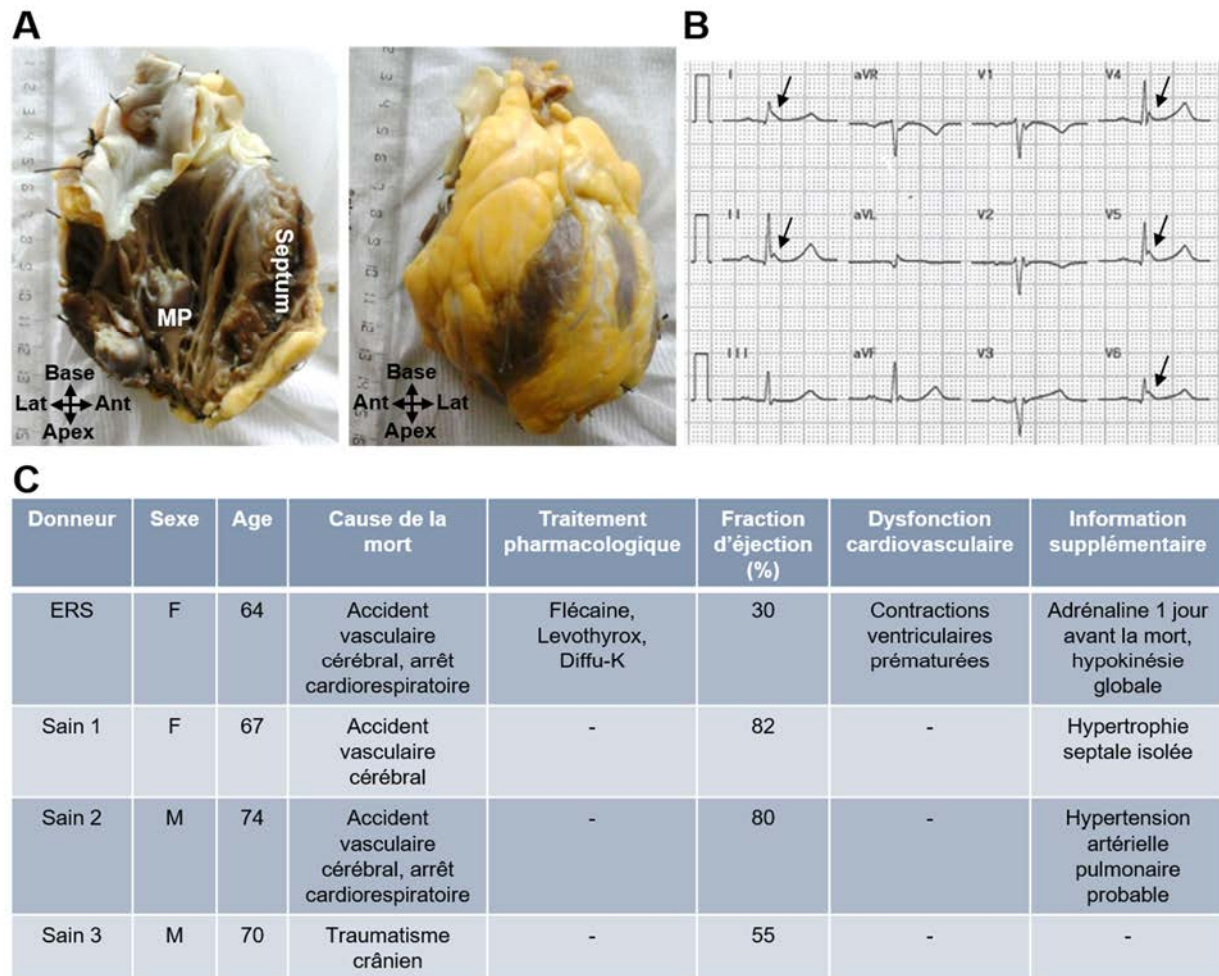


Figure 49 : A. Ventricule gauche coté endocardique et épicaudique. MP : muscle papillaire.

B. Electrocardiogramme du donneur présentant un ERS. C. Tableau récapitulatif des informations cliniques des donneurs.

6.2.2. Différence d'expression des ARNs transmuraux

Des échantillons très fins de l'endocarde et de l'épicarde des VGs des différents donneurs ont été prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les tissus ont ensuite été stockés à - 80°C jusqu'à analyse de l'expression de leurs ARNs selon la technique de puce à ADN. Cette méthode repose sur le principe de transcription inverse des ARNs en ADN complémentaires (ADNc) et sur l'hybridation de ces ADNc aux différentes sondes que possède la puce à ADN (Charron et al 2015).

Une augmentation significative de l'expression des ARNs codants pour le courant I_{to} a été observée avec un effet plus prononcé au niveau de l'épicaarde, ce qui peut correspondre à un argument en faveur d'une repolarisation précoce chez le VG du donneur présentant un ERS. Il a également été observé une augmentation significative de l'expression des ARNs codants pour les connexines 40 et 43 au sein de l'épicaarde, traduisant une augmentation de l'hétérogénéité de l'activation mais aussi un gradient potentiel entre l'épicaarde et l'endocarde qui peut être un argument contraire à une activation tardive de l'endocarde. De manière surprenante, une augmentation significative des ARNs codants pour le courant I_{Ca} avec une prédominance au sein de l'épicaarde a été démontrée, cela s'oppose à l'augmentation de I_{to} mais aussi à l'hypothèse d'une repolarisation précoce. La diminution significative des ARNs codants pour le courant I_{Kr} ne définit pas de gradient entre l'épicaarde et l'endocarde, quand à la diminution significative de l'expression de l'ARNs de la SERCA, elle traduit potentiellement une modification régionale de la libération de calcium (figure 50).

Gène	Courant	EPI	ENDO
Cx43	I_{GJ}	↑↑↑	↔
Cx40	I_{GJ}	↑↑↑	↔
KCNA4	I_{to}	↑↑↑	↔
KCND2	I_{to}	↑↑↑	↑↑↑
KCND3	I_{to}	↑↑↑	↑↑↑
KCNH2	I_{Kr}	↓↓↓	↓↓↓
CACNA1C	$I_{Ca(L)}$	↑	↔
CACNA1H	$I_{Ca(T)}$	↑↑↑	↑↑↑
CACNA2D1	I_{Ca}	↑↑↑	↑↑↑
SERCA2	I_{SERCA}	↓	↔

Figure 50 : Différences d'expression des ARNs de l'épicaarde (EPI) ou de l'endocarde (ENDO) entre les ventricules gauches du donneur présentant un ERS et des donneurs sains 1 et 2.

↑ ou ↓ indique $p < 0,05$ et ↑↑↑ ou ↓↓↓ indique $p < 0,0001$.

6.2.3. Facteurs de repolarisation précoce

Une diminution significative de l'APD₈₀ globale (235 ± 32 ms) a été observée chez le VG du donneur présentant un ERS en comparaison des VGs des donneurs en bonne santé (donneur sain 1 : 256 ± 17 ms, donneur sain 2 : 262 ± 19 ms, donneur sain 3 : 313 ± 17 ms) lors de stimulations de l'endocarde à 2 Hz. De la même manière, un raccourcissement apparent de l'APD₂₀ globale et ainsi de la phase 1 de repolarisation précoce a également été observé avec une diminution significative de la triangulation de l'APD chez le VG du donneur ERS ($p < 0,0001$) (figure 51 B). Par ailleurs, les cartes d'APD ont également montré un gradient d'APD avec une préférence d'APD plus courte au niveau la paroi libre latérale du VG du donneur ERS ce qui correspond bien à l'ECG clinique (figure 51 A).

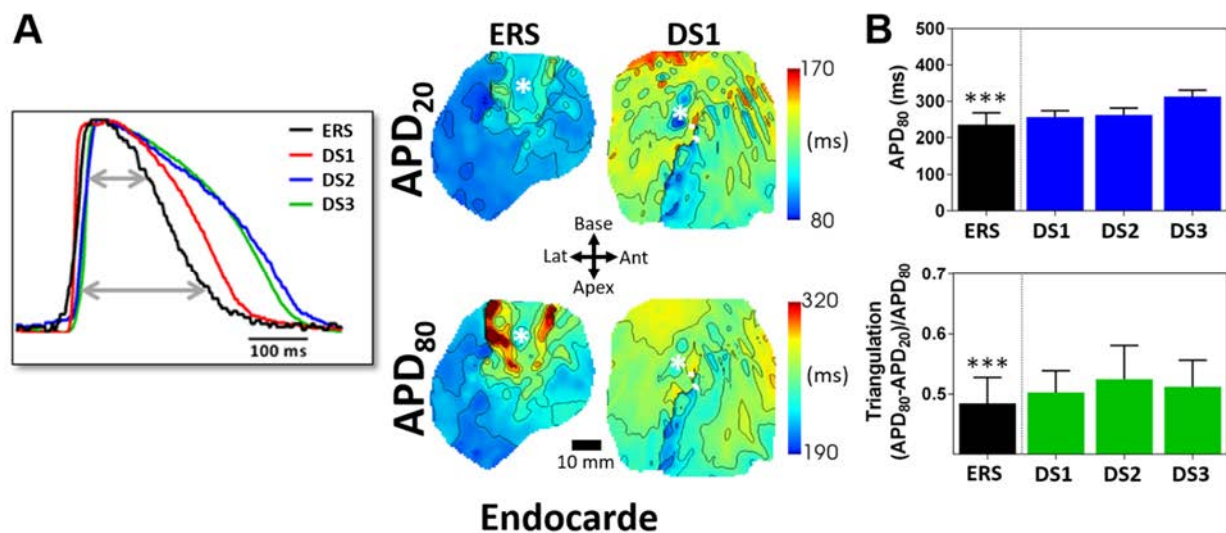


Figure 51 : **A.** Potentiels d'action du donneur ERS et des donneurs sains (DS) et cartes d'APD₈₀ et d'APD₂₀ pour les ventricules gauches du donneur ERS et du DS1 lors de stimulations de l'endocarde à 2 Hz, marqué par (*). Les isochrones sont de 20 ms d'espacement. **B.** Moyenne $\pm$ SD des APD₈₀ et de la triangulation des APDs pour les différents donneurs. *** indique $p < 0,0001$.

6.2.4. Facteurs d'activation tardive

Les cartes d'activation correspondantes, lors de la stimulation de l'endocarde à 2 Hz, ont démontré la présence d'une ligne de bloc de conduction dans la partie latérale du VG du donneur ERS, ce qui se traduit par un prolongement de l'AT total (167 ms) comparé aux VGs des trois autres donneurs (donneur sain 1 : 102 ms, donneur sain 2 : 72 ms, donneur sain 3 : 123 ms) (figure 52 A). De manière intéressante, lors de la stimulation de l'épicarde à 2,5 Hz du VG du donneur ERS, des alternances de conduction ont été observées. Il s'agit d'alternances entre deux PAs successifs avec un profil d'activation différent : présence ou absence du bloc de conduction précédemment observé (figure 52 B). La stimulation épicaudique surmonterait ainsi partiellement ce bloc de conduction.

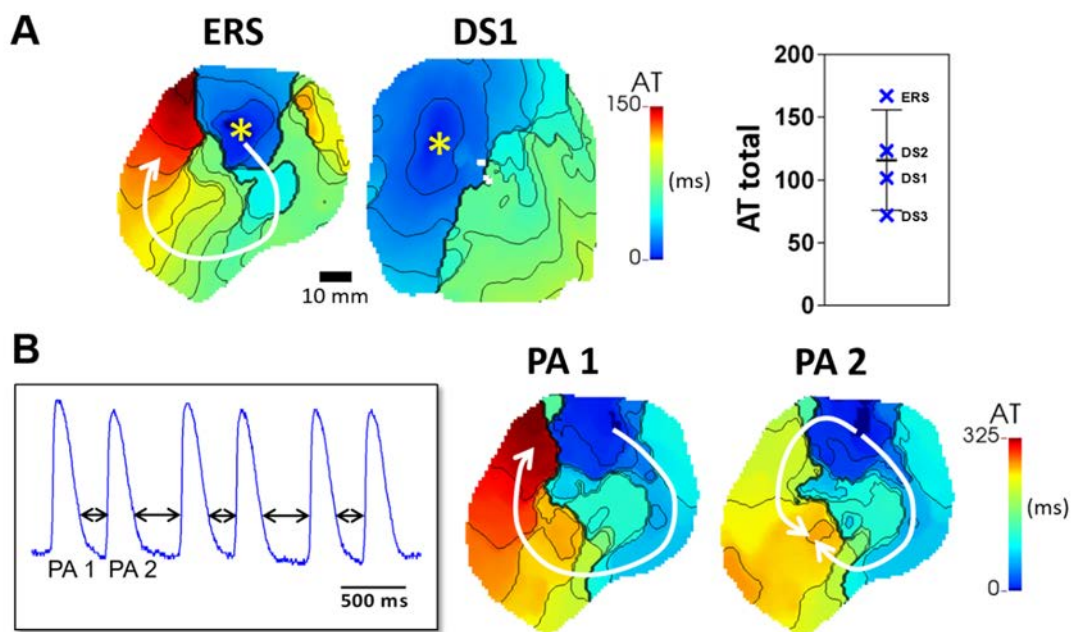


Figure 52 : A. Cartes d'AT des ventricules gauches du donneur ERS et du donneur sain (DS1) et AT total sur tout le champ de vue pour les différents donneurs lors de stimulations de l'endocarde à 2 Hz. B. Alternances de conduction observées chez l'ERS lors de stimulations de l'épicarde à 2,5 Hz. Les isochrones sont de 10 ms d'espacement.

6.2.5. Absence de remodelage structurel

Après l'acquisition optique, les différents VG ont été fixés dans du formaldéhyde 4% durant 4 heures par perfusion des coronaires puis conservés à 4°C sous agitation. Le VG du donneur ERS a ensuite été immergé dans une huile Fomblin qui augmente le contraste entre le tissu et l'extérieur, avant d'être placé dans une IRM de 9.4 Tesla (Bruker Corporation) permettant d'acquérir des données de haute résolution isotrope de 200 μm .

Les images IRM, obtenues d'après la méthode d'acquisition FLASH qui permet de différencier le tissu adipeux du muscle (Hauger et al 1999), ont permis de démontrer l'absence de différence de contraste au sein du myocarde qui se traduit par une absence de fibrose et donc de remodelage structurel pour le VG du donneur ERS (figure 53).

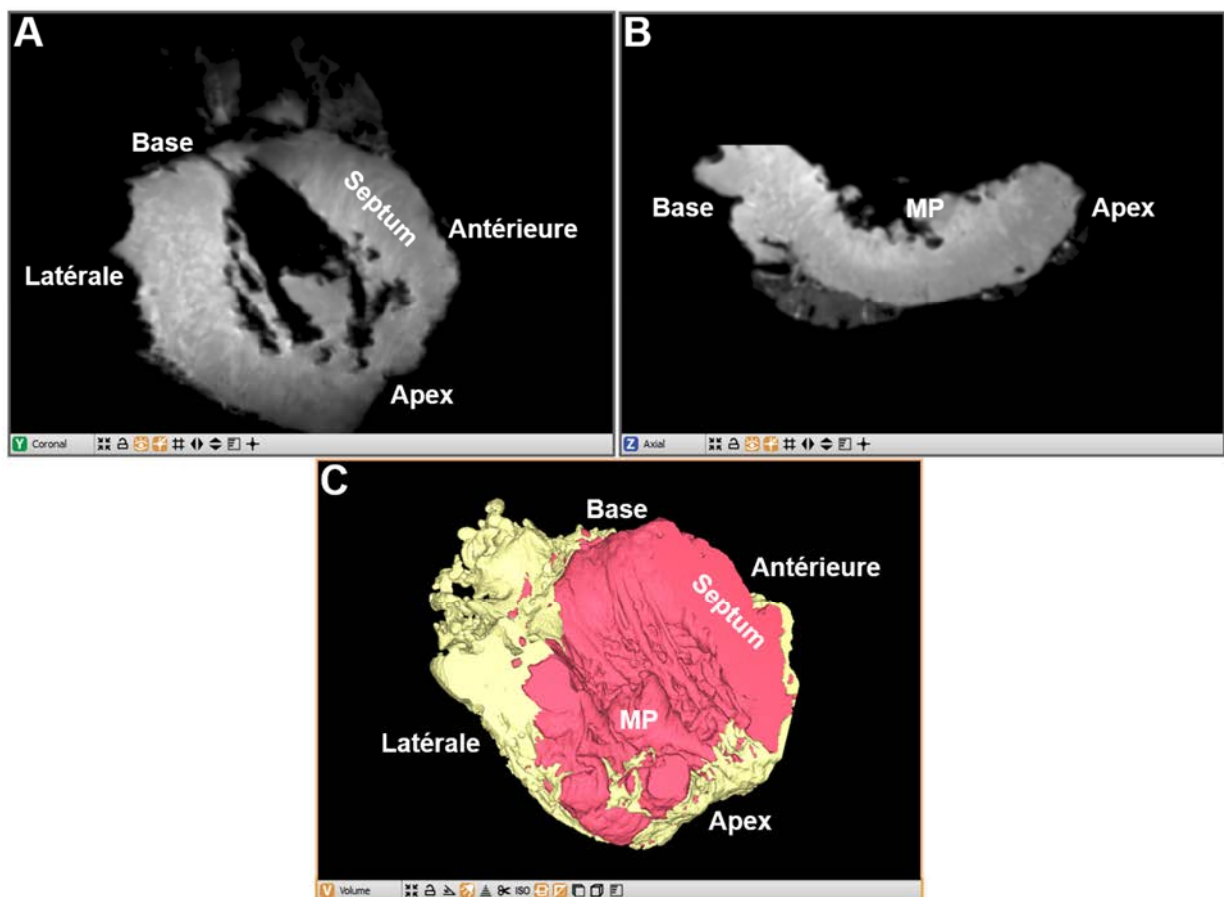


Figure 53 : Images IRM du ventricule gauche du donneur présentant un ERS en coupes coronale (A) et axial (B) et en volume (C) séparé suivant un seuil d'intensité pour le myocarde (rose) et les composants extramusculeux (jaune).

La paroi libre des VGs des donneurs sains ainsi que la paroi libre latérale du VG du donneur ERS, après acquisition IRM, ont été soumises à une analyse histologique au trichrome de Masson. Les résultats permettent de confirmer l'observation par IRM, malgré un dépôt de lipides observé chez tous les VGs donneurs, aucune fibrose n'a été observée sur le VG du donneur ERS. Il n'y a donc pas de remodelage de la structure de la partie latérale du VG du donneur ERS (figure 54). Notons que la structure de ce dernier semble moins bien préservée que celle des autres donneurs en raison de l'utilisation de la Fomblin pour l'acquisition IRM. L'analyse histologique du VG du donneur sain 1 a précédemment été illustrée dans la quatrième étude et présente les mêmes observations que sur les autres cœurs (*Cf. Résultats complémentaires, figure 38*).

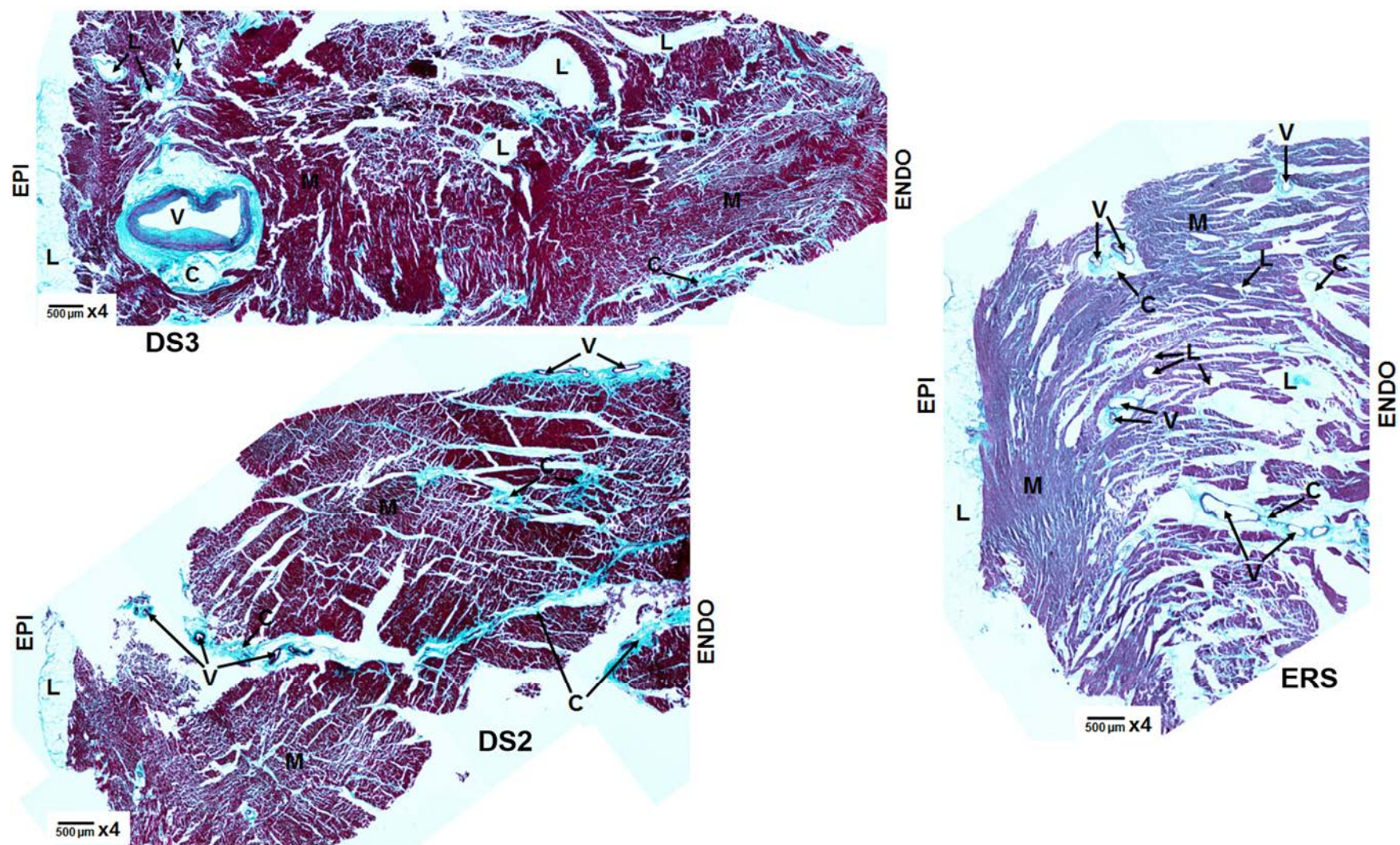


Figure 54 : Coloration du ventricule gauche des cœurs des donneurs sains 2 et 3 (DS2 et DS3) et du donneur ERS (partie latérale).
Coupes transversales au x4. C : collagène, L : lipides, M : myocarde, V : vaisseaux sanguins.

6.3. Discussion et conclusion

L'analyse transcriptomique a démontré une modulation du gradient transmural d'expression de l'ARN des canaux ioniques impliqués dans la repolarisation chez le VG du donneur présentant une ERS. Il est donc important d'approfondir ces résultats, notamment, avec des analyses protéomiques afin de confirmer le remodelage génétique observé.

Par ailleurs, la mesure des PAs a démontré une diminution significative de la triangulation de l'APD compatible avec un raccourcissement local de la phase précoce de repolarisation chez le VG du donneur ERS. De plus, chez ce même donneur, il a été démontré la présence d'une séquence d'activation complexe avec un AT considérablement prolongé dû à un bloc de la conduction qui n'était cependant pas structurel. En effet, les analyses IRM et histologiques n'ont pas mis en évidence de remodelage de la structure de la paroi latérale du VG du donneur ERS.

Ainsi, dans ce cas précis d'ERS, les substrats électrophysiologiques semblent correspondre à une combinaison des deux facteurs, repolarisation précoce et activation tardive, sans remodelage structurel.

7. Résultats en cours

7.1. Contexte et objectif

Durant les expériences de cartographie optique, la mesure de l'activité électrique provenant directement du réseau de Purkinje n'a pas été possible. En effet, le signal fluorescent trop faible provenant du Purkinje était masqué par celui du myocarde. C'est pourquoi l'utilisation de la technique de microélectrode couplée à la cartographie optique a été envisagée pour la suite de nos expériences. La microélectrode permettrait ainsi d'obtenir des informations électriques provenant directement du système de Purkinje et de les comparer aux informations de l'ensemble du tissu acquises par la cartographie optique.

Le but final est d'obtenir des données expérimentales comparables aux données cliniques où il a été observé la présence de battements prématurés provenant du réseau de Purkinje et précédant la fibrillation (Haissaguerre et al 2002a) (*Cf. Introduction 4.4.1*).

Les travaux préliminaires ont été réalisés sur des ventricules gauches de brebis isolés et perfusés dans les mêmes conditions que la cartographie optique.

7.2. Résultats préliminaires

Les résultats présentés ici correspondent à la mise en place du système de microélectrode dans le développement de la capacité à mesurer les PAs provenant du Purkinje. En effet, cette étude préliminaire consistait à identifier les PAs des cellules du Purkinje (CP) par rapport aux PAs des cellules ventriculaires (CV) du ventricule gauche de brebis. Cette identification a été réalisée à l'aide du logiciel LabChart, tout d'abord, par observation de la morphologie du PA et plus précisément, de la phase 1 de repolarisation précoce qui permet de distinguer rapidement les CP des CV car cette phase est bien plus prononcée chez le Purkinje (*Cf. Introduction 4.2*). Puis, l'identification a été confirmée par calcul grâce au logiciel LabChart de la vitesse de dépolarisation maximale du PA (V_{max}) qui est bien plus importante chez les CP (~ 400 V/s) par rapport aux CV (~ 100 V/s) (figure 55) (Sugi et al 1987, Yeh et al 1998). La phase 2 de plateau plus importante et la durée plus longue du PA des CP par rapport aux CV ont été confirmées lors de l'analyse du PA.

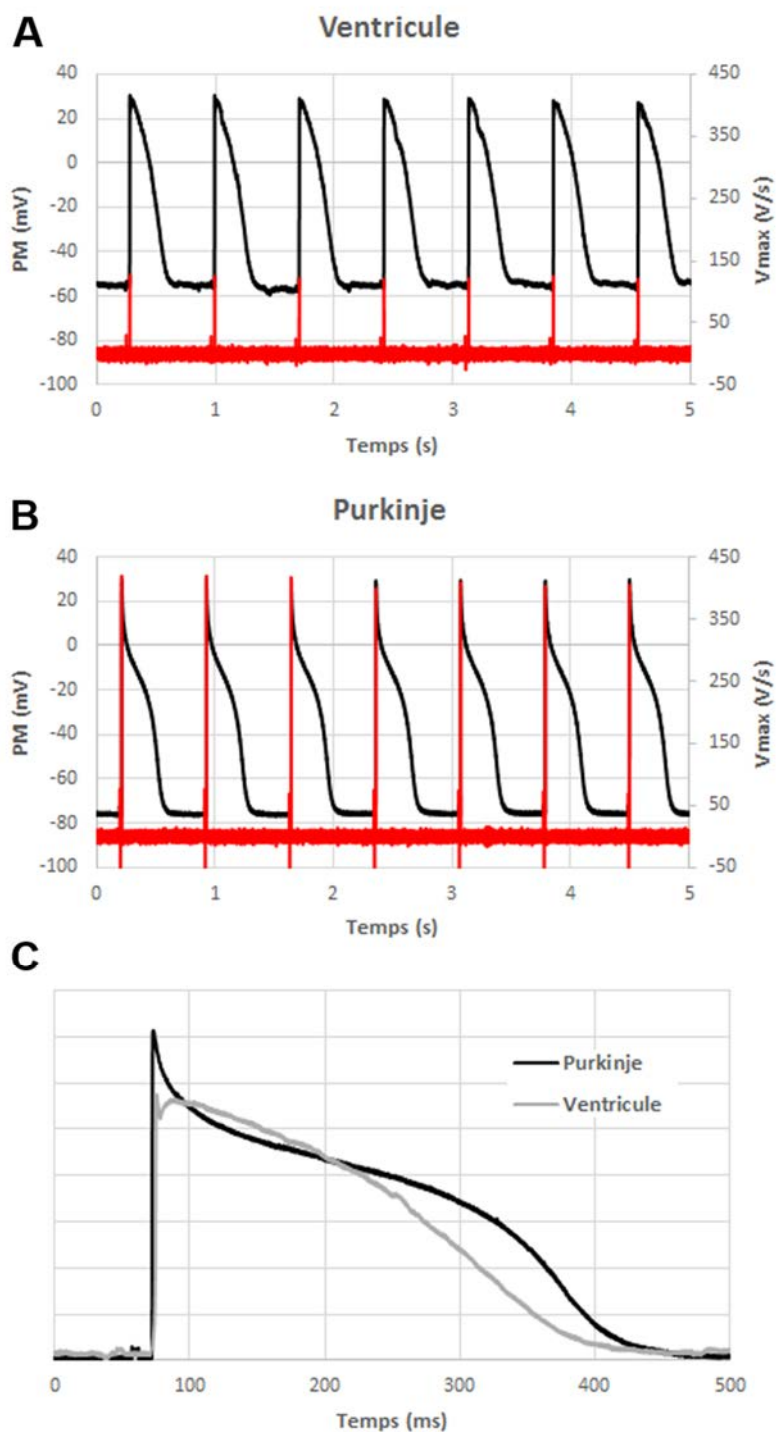


Figure 55 : Potentiels d'action et V_{max} correspondantes, d'une cellule de ventricule (A) et d'une cellule de Purkinje (B) mesurés par microélectrode lors de stimulations à 2 Hz de l'endocarde d'un ventricule gauche de brebis. C. Normalisation et alignement d'un potentiel d'action provenant du Purkinje et du ventricule. PM : potentiel membranaire.

7.3. Conclusion

Il s'agit simplement de résultats préliminaires concernant la validation et l'utilisation de la technique de microélectrode dans le modèle d'étude de ventricule gauche de brebis. Cependant, la mesure des PAs provenant directement du réseau de Purkinje permettrait pour la suite des expériences, de venir compléter les données acquises par cartographie optique et d'obtenir ainsi plus d'informations pour comprendre les mécanismes d'arythmie au sein de ce réseau.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

4.1. Résumé des travaux

D'après Coumel, trois composants sont nécessaires pour générer une arythmie : le substrat arythmogénique, le facteur déclencheur et le facteur modulateur (*Cf. Introduction 3.1*) (Farre & Wellens 2004). A la vue des résultats, il est intéressant de se demander quelle contribution apporte chacun à la compréhension des mécanismes arythmogènes en lien avec le système de Purkinje ?

La première étude avait comme hypothèse l'existence d'un couplage entre les cellules de Purkinje et les myocytes ventriculaires au sein des jonctions Purkinje-muscle (PMJs) qui pouvait conduire à une augmentation locale de la durée de potentiel d'action (APD) ventriculaire. Le but de la seconde étude était de déterminer si la séquence d'activation pouvait jouer un rôle important dans la dispersion transmurale chez les grands mammifères. Les résultats de ces deux premières études, utilisant la technique de cartographie optique sur des ventricules gauches de brebis combinée à des simulations informatiques, ont permis de mettre en évidence la présence d'un couplage entre le système de Purkinje et le myocarde qui module localement l'APD au niveau du PMJ. Ces résultats révèlent également l'importance de l'activation à travers le réseau de Purkinje qui contribue à la mise en place d'hétérogénéités transmursales de repolarisation à la fois chez le cœur sain et pathologique.

L'hypothèse de la troisième étude était que le système de Purkinje pouvait participer au maintien de la fibrillation ventriculaire (FV) par le biais de ces PMJs. Les résultats préliminaires de cartographie optique sur le myocarde de brebis ont suggéré que la modulation de la dispersion de repolarisation par le système de Purkinje était directement impliquée dans le maintien de la FV à travers ces PMJs actives et que l'ablation de ces jonctions réduisait la fibrillation.

Le but de la quatrième étude était d'étudier le couplage qui existe entre la bande modératrice (BM), le septum et la paroi libre du ventricule droit, mais également de développer une étude histologique de la paroi libre du ventricule gauche de la brebis et de l'homme.

Les résultats de cette étude ont permis de démontrer, à la fois sur le ventricule droit de la brebis et de l'homme, que l'épaisseur de la BM combinée à la compartimentation du Purkinje et du myocarde pouvait fournir un substrat de réentrée, en lien avec l'hétérogénéité de repolarisation qui existe entre la bande et le myocarde du ventricule droit. Les résultats complémentaires ont également montré par l'étude histologique, la difficulté d'identification du Purkinje entre les espèces et donc de la mise en évidence des PMJs.

La cinquième étude avait pour but de déterminer l'influence de la séquence d'activation sur le gradient transmural de l'APD chez le cœur humain, mais également de s'intéresser à l'effet d'un médicament, la flécaïnide, sur la repolarisation ventriculaire. Les résultats préliminaires de cartographie optique sur les ventricules gauches humains ont suggéré un rôle potentiel de la flécaïnide dans la modulation du gradient transmural d'APD et dépendant de la fréquence de stimulation.

Pour finir, le but de la sixième étude était de comprendre les mécanismes contribuant au syndrome de repolarisation précoce, impossibles à définir seulement à partir de données cliniques. Les résultats ont permis d'identifier les substrats électrophysiologiques comme étant une combinaison de deux facteurs, la repolarisation précoce et l'activation tardive, mais sans remodelage structurel du ventricule gauche.

4.2. Discussion

Traditionnellement, le facteur déclencheur et le substrat arythmogénique sont considérés comme des entités indépendantes. Les déclencheurs comme les post-dépolarisations précoces (EADs) et tardives (DADs) peuvent induire des battements ectopiques tandis que le substrat correspond à des anomalies structurelles et électrophysiologiques comme une dispersion de la conduction ou de la repolarisation prédisposant à la réentrée. Cependant, le déclencheur peut lui-même produire le substrat nécessaire à la réentrée, par exemple, les DADs peuvent induire un bloc unidirectionnel de la conduction (Liu et al 2015). A l'inverse, la réentrée peut aussi être l'événement déclencheur d'une arythmie (Lukas & Antzelevitch 1996) en produisant des extrasystoles étroitement couplées à la génération d'une fibrillation précédant la mort subite.

SYSTEME DE PURKINJE A LA FOIS SUBSTRAT ARYTHMOGENIQUE ET FACTEUR MODULATEUR

Des études antérieures expérimentales et de simulations informatiques chez différentes espèces, ont déjà fait mention de l'existence d'une hétérogénéité de repolarisation au sein des PMJs, suffisamment importante notamment dans certaines pathologies pour induire un bloc de conduction et prédisposer ainsi la formation de réentrées (Berenfeld & Jalife 1998, Myerburg et al 1970, Trandum-Jensen et al 1991). D'autres études ont par ailleurs montré chez plusieurs espèces (Antzelevitch & Fish 2001) y compris l'homme (Rouzioux 1990) l'existence de régions localisées associées à un prolongement de l'APD, les cellules M, qui possèdent des propriétés intermédiaires entre les cellules de Purkinje et les myocytes ventriculaires (Antzelevitch & Fish 2001, Antzelevitch et al 1991). Cependant, leurs caractéristiques électrophysiologiques restent incomplètes et controversées à ce jour.

Les résultats des deux premières études ont confirmé le rôle crucial du couplage aux PMJs dans la modulation de l'hétérogénéité de l'APD chez le myocarde sain et pathologique, et proposent ainsi une origine supplémentaire voire complémentaire d'hétérogénéité de repolarisation aux cellules M précédemment identifiées. En effet, il a été montré que ces îlots d'APD longue se chevauchent avec l'emplacement des jonctions des fibres de Purkinje couplées au myocarde ventriculaire (Yan & Antzelevitch 1998, Yan et al 1998). De plus, la seconde étude témoigne de l'importance de l'activation à travers le réseau de Purkinje dans la mise en place des gradients transmuraux de repolarisation chez le myocarde sain et pathologique. Et, les résultats de la quatrième étude montrent que cette hétérogénéité de repolarisation en lien avec l'activation du Purkinje peut fournir un substrat de réentrée. Ainsi, le système de Purkinje constitue à la fois un substrat arythmogène à travers l'hétérogénéité locale de l'APD de ses PMJs actives, mais également un facteur modulateur important de l'arythmie à travers l'activation de son réseau pouvant moduler ses jonctions et donc influencer la dispersion de repolarisation et la dynamique de l'arythmie.

ROLE DU RESEAU DE PURKINJE DANS LE MAINTIEN DE L'ARYTHMIE

Malgré des expériences d'ablations chimiques des cellules de Purkinje par application d'une solution de Lugol (Dodd et al 2008) ou des études récentes sur des cœurs isolés de chien (Huang et al 2014), les mécanismes du maintien de l'arythmie par les fibres de Purkinje sont peu documentés (*Cf. Introduction 4.4.2*).

Ainsi, les résultats préliminaires de la troisième étude constituent pour la première fois une preuve directe de l'implication des fibres de Purkinje, à travers ses jonctions actives, dans le maintien de la fibrillation ventriculaire et confirment expérimentalement les effets bénéfiques de l'ablation ciblée par radiofréquence. Ces premiers résultats suggèrent également un rôle important des PMJs lors des premières minutes de la FV et des effets positifs d'une ablation de durée et de puissance plus faibles. Ces arguments doivent évidemment être vérifiés et approfondis par d'autres expériences mais pourraient potentiellement améliorer les paramètres du ciblage des PMJs lors de la FV en thérapie clinique.

STRUCTURE DES CELLULES DE PURKINJE

Il a été montré que le réseau complexe formé par les fibres de Purkinje variait selon les espèces, ces fibres sont localisées essentiellement sous l'endocarde chez l'homme, le lapin et le chien alors que chez le mouton et le cochon elles recouvrent toute l'épaisseur du myocarde. Par ailleurs, les cellules de Purkinje sont également isolées des autres myocytes par une gaine de réticuline constituant un tissu conjonctif (*Cf. Introduction 4.1*) (Ono et al 2009).

Les résultats de la quatrième étude ont montré que chez la brebis et l'homme la structure isolée de la bande modératrice du ventricule droit avait facilité l'identification des cellules de Purkinje au trichrome de Masson, grâce à leur isolement du reste des cardiomyocytes par du collagène. Cependant, les cellules de Purkinje de la brebis et de l'homme possèdent une morphologie différente et les résultats complémentaires ont démontré toute la complexité de la localisation de ces cellules au sein du myocarde entre les espèces. Ainsi, la coloration au trichrome de Masson ne constitue pas une bonne technique pour localiser les fibres de Purkinje chez l'homme. Néanmoins, les résultats préliminaires de clarification optique, couplés à la microscopie confocale pour une reconstruction en trois dimensions du tissu, sont prometteurs quant à l'identification et la détermination de la fonction des jonctions actives mais également dans la mise en évidence ou non de cellules de transition (*Cf. Introduction 4.3*) (Tranum-Jensen et al 1991).

HETEROGENEITE DE REPOLARISATION ET FACTEUR DECLENCHEUR ?

Les fibres de Purkinje peuvent être à l'origine des facteurs déclencheurs de l'arythmie tels que les automatismes anormaux, les EADs et les DADs, fortement liés à un dysfonctionnement de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique (*Cf. Introduction 4.3*) (Boyden et al 2010, Dobrzynski et al 2013, Ter Keurs & Boyden 2007).

Les investigations de ce travail de thèse n'ont jusqu'à présent pas conduit à la quantification de tels phénomènes, cependant, il est possible d'examiner ces facteurs déclencheurs via l'utilisation de sondes sensibles au calcium (Attin & Clusin 2009, Herron et al 2012) en parallèle de la sonde potentiométrique lors des expériences de cartographie optique. En effet, des expériences optiques dans les mêmes conditions que les études précédentes permettraient d'étudier ces déclencheurs mais également d'examiner un rôle potentiel du substrat d'hétérogénéité de repolarisation comme événement déclencheur de l'arythmie.

4.3. Limites et perspectives

LA CARTOGRAPHIE OPTIQUE

La technique de cartographie optique possède des limites bien connues, notamment, l'arrêt des contractions nécessaire à l'acquisition optique qui n'est cependant pas physiologique ou encore l'étude sur des préparations isolées qui peut être source d'instabilité. En effet, la mesure de certaines hétérogénéités d'APD locales peut être la conséquence de la dissection du tissu surtout en périphérie de ce dernier. La suture des coronaires peut également conduire à la formation de régions ischémiques générant une modulation de la distribution de l'APD. Néanmoins dans toutes les études présentées dans ce travail, la cartographie optique a été réalisée à partir de myocarde présentant une surface endocardique et épicaudique intacte préservant ainsi d'hétérogénéités de repolarisation *in situ*, contrairement à des préparations présentant une surface coupée du myocarde pour l'étude de l'activité électrique transmurale.

Par ailleurs, la mesure de potentiel d'action (PA) provenant directement du réseau de Purkinje n'a pas été possible lors des expériences de cartographie optique (signal trop faible du Purkinje et masqué par celui du myocarde). C'est pourquoi la technique de microélectrode couplée à la cartographie optique a été envisagée dans la suite des expériences.

Les résultats préliminaires quant à la validation de cette technique sont prometteurs et il serait donc intéressant de poursuivre ces expériences afin de mieux comprendre les mécanismes d'arythmie au sein du réseau de Purkinje.

Cependant, il est important de définir en priorité le potentiel arythmogénique du modèle d'étude utilisé, à savoir le ventricule gauche de brebis, suivant l'hétérogénéité qui a déjà été observée. Ainsi des protocoles de restitution S1-S2 combinant la stimulation du myocarde et du réseau de Purkinje sont à envisager afin de tester la vulnérabilité de la préparation à l'arythmie. Le protocole S1-S2 consiste à stimuler la préparation à une longueur de cycle (inverse de la fréquence) fixe (S1) suffisamment longtemps pour obtenir un état stable, puis, à venir la perturber par une stimulation (S2) de longueur de cycle variable. Ce protocole est répété plusieurs fois jusqu'à rentrer dans la période réfractaire du PA précédent le S2 (Cherry & Fenton 2007).

ORGANISATION DU RESEAU DE PURKINJE

Concernant la caractérisation de l'architecture du réseau de Purkinje, d'autres études histologiques peuvent être envisagées comme la coloration avec une solution modifiée d'acide périodique de Schiff (Ono et al 2009). Cependant, il semble plus intéressant de poursuivre les expériences de clarification optique et d'imagerie tridimensionnelle du réseau, notamment via l'utilisation de techniques comme la microtomographie aux rayons X ou encore l'IRM haute résolution couplées à des agents de contraste comme l'iodure de potassium, spécifique du Purkinje. Ces différentes techniques permettraient entre autre d'approfondir et de compléter certains paramètres pour les modèles de simulations informatiques dans le but de déterminer la fonction et les caractéristiques des jonctions actives.

Par ailleurs, il est important de noter que les simulations informatiques possèdent elles aussi des limites, notamment, le modèle ionique utilisé lors des deux premières études qui possède des différences relativement modestes d'APD intrinsèque entre le myocarde et les fibres de Purkinje.

MODELES PATHOLOGIQUES

Les modèles pathologiques testés concernent seulement des protocoles aigus ou des données informatiques. Afin d'avoir plus d'informations comparables aux données cliniques, il serait intéressant de travailler et d'étudier le remodelage sur des modèles de pathologies chroniques. Pour la suite des expériences, il est donc envisagé d'étudier un modèle chronique d'ischémie reperfusion chez la brebis, avec occlusion chirurgicale à l'aide d'un ballonnet de l'artère interventriculaire antérieure (*Cf. Méthodes 2.2*).

MODELE ANIMAL VERSUS L'HOMME

Pour les prochaines expériences de nombreux paramètres restent encore à déterminer pour une caractérisation complète des PMJs, notamment leur étude sur le cœur humain qui de manière intéressante possède une distribution du réseau différente (sous-endocardique) de celui du modèle de la brebis (transmurale). Il s'agit ici d'une limite du modèle animal étudié. Ainsi, l'influence de la séquence d'activation suivant le site de stimulation et plus particulièrement, la stimulation des fibres de Purkinje constituerait une étude importante pour la validation du modèle animal étudié.

De plus, des études protéomiques chez le cœur présentant le syndrome de repolarisation précoce semblent primordiales pour valider le remodelage génétique observé des canaux ioniques impliqués dans la repolarisation. Pour finir, les expériences de cartographie optique dans l'étude de l'influence de la flécaïnide sur la repolarisation ventriculaire chez l'homme doivent également être poursuivies. D'une manière plus générale, des études via l'utilisation d'agents pharmacologiques réduisant l'APD ou limitant la dépolarisation spontanée tels que le vérapamil ou l'ivabradine constitueraient un moyen d'étude complémentaire pour évaluer l'impact du réseau de Purkinje dans le déclenchement de l'arythmie.

4.4. Conclusion générale

Pour résumer, ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois que le système de Purkinje pouvait constituer à la fois un substrat mais également un facteur modulateur de l'arythmie. En effet, il a été montré que les fibres de Purkinje à travers leurs jonctions avec le myocarde pouvaient être à l'origine d'hétérogénéité locale de l'APD mais également de dispersion transmurale de repolarisation par l'activation de leur réseau et ce, sur le myocarde sain ou pathologique. Il est néanmoins important de poursuivre et d'approfondir l'ensemble de ces études, notamment, celles concernant l'implication des PMJs dans le maintien de la fibrillation ventriculaire ou encore, les études structurales afin de mieux comprendre les caractéristiques de ces jonctions et leur interaction avec le myocarde, mais également, les études sur les cœurs humains constituant le meilleur modèle d'approche. Ces travaux de thèse permettent néanmoins, d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement préventif des troubles du rythme ventriculaire afin de lutter contre la mort subite cardiaque (figure 56).

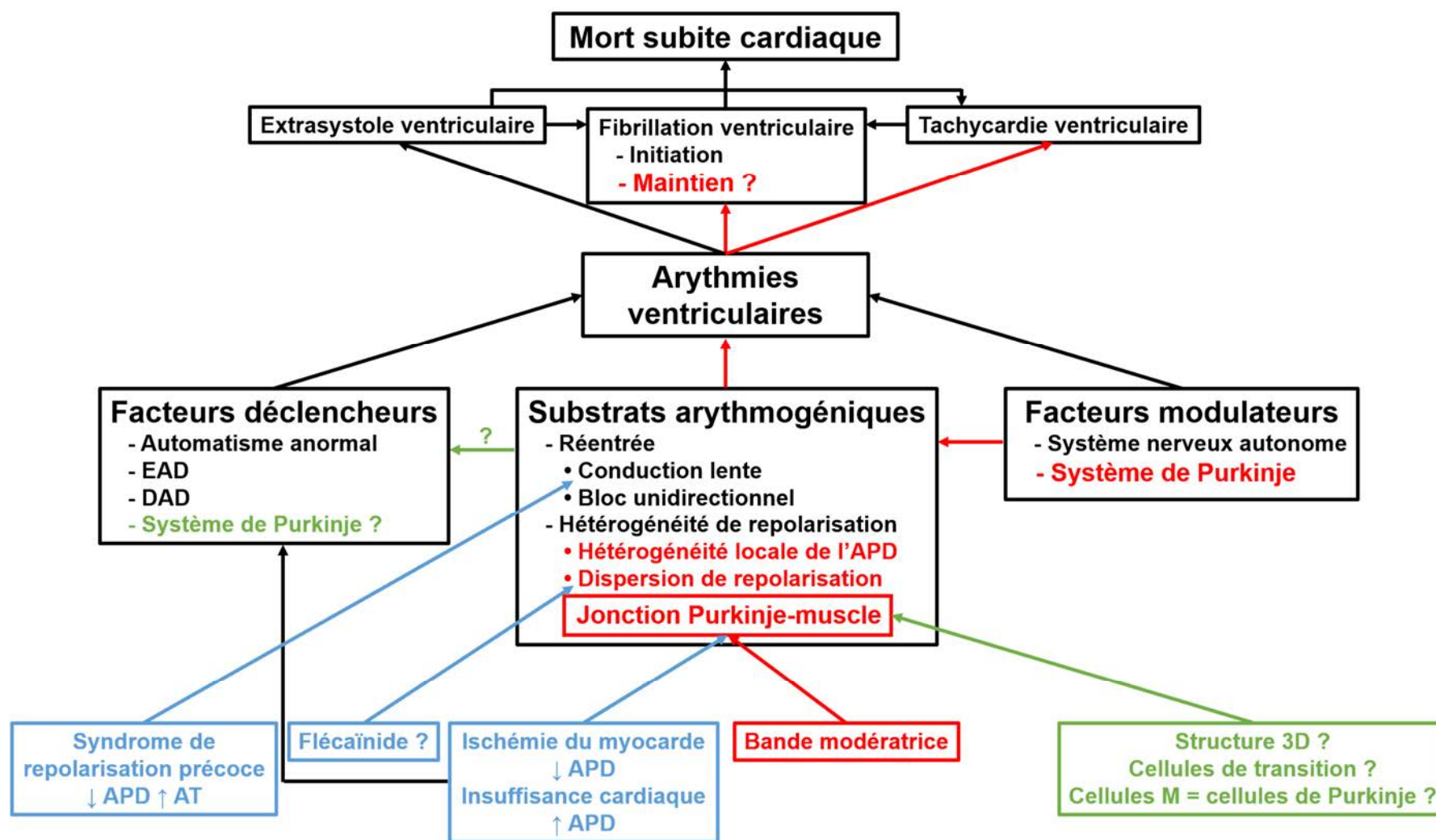


Figure 56 : Les mécanismes pro-arythmogéniques sous-jacents de la mort subite cardiaque. Noir : mécanismes connus, rouge : nouveaux mécanismes impliquant le réseau de Purkinje, bleu : pathologies et traitements cardiaques impliqués, vert : hypothèses en lien avec le Purkinje.

Références bibliographiques

- Abouezzeddine O**, Suleiman M, Buescher T, Kapa S, Friedman PA, et al. 2010. Relevance of endocavitary structures in ablation procedures for ventricular tachycardia. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 21: 245-54
- Andrikopoulos GK**, Pastromas S, Tzeis S. 2015. Flecainide: Current status and perspectives in arrhythmia management. *World journal of cardiology* 7: 76-85
- Antzelevitch C, Fish J**. 2001. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic research in cardiology* 96: 517-27
- Antzelevitch C**, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, et al. 1991. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circulation research* 69: 1427-49
- Arnold HD**. 1899. Weight of the "Normal" Heart in Adults. *J Boston Soc Med Sci* 3: 174-84
- Attin M, Clusin WT**. 2009. Basic concepts of optical mapping techniques in cardiac electrophysiology. *Biological research for nursing* 11: 195-207
- Baroldi G**, Mantero O, Scmazzone G. 1956. The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts. *Circulation research* 4: 223-9
- Basil A, Wassef W**. 2013. Confocal Endomicroscopy. In *Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences.*, ed. N Lagali, pp. 244: InTech
- Bell J**. 1811. The bones, muscles and joints; the heart and circulation; and the lungs. In *The anatomy of the human body*.
- Berenfeld O, Jalife J**. 1998. Purkinje-muscle reentry as a mechanism of polymorphic ventricular arrhythmias in a 3-dimensional model of the ventricles. *Circulation research* 82: 1063-77
- Biasco L**, Cristoforetti Y, Castagno D, Giustetto C, Astegiano P, et al. 2013. Clinical, electrocardiographic, echocardiographic characteristics and long-term follow-up of elite soccer players with J-point elevation. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 6: 1178-84
- Boineau JP**. 2007. The early repolarization variant--an electrocardiographic enigma with both QRS and J-STT anomalies. *Journal of electrocardiology* 40: 3.e1-10
- Boukens BJ**, Sulkin MS, Gloschat CR, Ng FS, Vigmond EJ, Efimov IR. 2015. Transmural APD gradient synchronizes repolarization in the human left ventricular wall. *Cardiovasc Res* 108: 188-96
- Boyden PA**, Hirose M, Dun W. 2010. Cardiac Purkinje cells. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 7: 127-35
- Cascio WE**, Johnson TA, Gettes LS. 1995. Electrophysiologic changes in ischemic ventricular myocardium: I. Influence of ionic, metabolic, and energetic changes. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 6: 1039-62
- Cerrone M**, Noujaim SF, Tolkacheva EG, Talkachou A, O'Connell R, et al. 2007. Arrhythmogenic mechanisms in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation research* 101: 1039-48

- Chan KH, Sy RW.** 2016. Catheter Ablation of Recurrent Ventricular Fibrillation: A Literature Review and Case Examples. *Heart, lung & circulation*
- Charron S, Roubertie F, Benoist D, Dubes V, Gilbert SH, et al.** 2015. Identification of Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in a Chronic Swine Model of Repaired Tetralogy of Fallot. *PLoS one* 10: e0134146
- Cherry EM, Fenton FH.** 2007. A tale of two dogs: analyzing two models of canine ventricular electrophysiology. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292: H43-55
- Cherry EM, Fenton FH.** 2011. Effects of boundaries and geometry on the spatial distribution of action potential duration in cardiac tissue. *Journal of theoretical biology* 285: 164-76
- Clark RB, Bouchard RA, Salinas-Stefanon E, Sanchez-Chapula J, Giles WR.** 1993. Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc Res* 27: 1795-9
- Deo M, Boyle PM, Kim AM, Vigmond EJ.** 2010. Arrhythmogenesis by single ectopic beats originating in the Purkinje system. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299: H1002-11
- Desplantez T, Dupont E, Severs NJ, Weingart R.** 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *The Journal of membrane biology* 218: 13-28
- Di Diego JM, Sicouri S, Myles RC, Burton FL, Smith GL, Antzelevitch C.** 2013. Optical and electrical recordings from isolated coronary-perfused ventricular wedge preparations. *Journal of molecular and cellular cardiology* 54: 53-64
- Dobrzynski H, Anderson RH, Atkinson A, Borbas Z, D'Souza A, et al.** 2013. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacology & therapeutics* 139: 260-88
- Dosdall DJ, Tabereaux PB, Kim JJ, Walcott GP, Rogers JM, et al.** 2008. Chemical ablation of the Purkinje system causes early termination and activation rate slowing of long-duration ventricular fibrillation in dogs. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295: H883-9
- Doshi AN, Walton RD, Krul SP, de Groot JR, Bernus O, et al.** 2015. Feasibility of a semi-automated method for cardiac conduction velocity analysis of high-resolution activation maps. *Computers in biology and medicine* 65: 177-83
- Dumaine R, Cordeiro JM.** 2007. Comparison of K⁺ currents in cardiac Purkinje cells isolated from rabbit and dog. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42: 378-89
- Dun W, Boyden PA.** 2008. The Purkinje cell; 2008 style. *Journal of molecular and cellular cardiology* 45: 617-24
- Efimov IR, Nikolski VP, Salama G.** 2004. Optical imaging of the heart. *Circulation research* 95: 21-33
- Farre J, Wellens HJ.** 2004. Philippe Coumel: a founding father of modern arrhythmology. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 6: 464-5
- Fedida D, Giles WR.** 1991. Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *The Journal of physiology* 442: 191-209

- Fedorov VV**, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR, et al. 2007. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 4: 619-26
- Forbes MS, Sperelakis N**. 1985. Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue & cell* 17: 605-48
- Friedman PL**, Stewart JR, Fenoglio JJ, Jr., Wit AL. 1973. Survival of subendocardial Purkinje fibers after extensive myocardial infarction in dogs. *Circulation research* 33: 597-611
- Gettes L, Surawicz B**. 1968. Effects of low and high concentrations of potassium on the simultaneously recorded Purkinje and ventricular action potentials of the perfused pig moderator band. *Circulation research* 23: 717-29
- Glukhov AV**, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, et al. 2010. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circulation research* 106: 981-91
- Gordon AM**, Homsher E, Regnier M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* 80: 853-924
- Haissaguerre M**, Derval N, Sacher F, Jesel L, Deisenhofer I, et al. 2008. Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *The New England journal of medicine* 358: 2016-23
- Haissaguerre M**, Shah DC, Jais P, Shoda M, Kautzner J, et al. 2002a. Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet (London, England)* 359: 677-8
- Haissaguerre M**, Shoda M, Jais P, Nogami A, Shah DC, et al. 2002b. Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* 106: 962-7
- Harken AH**, Honigman B, Van Way CW, 3rd. 1987. Cardiac dysrhythmias in the acute setting: recognition and treatment or anyone can treat cardiac dysrhythmias. *The Journal of emergency medicine* 5: 129-34
- Hauger O**, Delalande C, Trillaud H, Deminiere C, Quesson B, et al. 1999. MR imaging of intrarenal macrophage infiltration in an experimental model of nephrotic syndrome. *Magnetic resonance in medicine* 41: 156-62
- Herron TJ**, Lee P, Jalife J. 2012. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues. *Circulation research* 110: 609-23
- Huang J**, Dosdall DJ, Cheng KA, Li L, Rogers JM, Ideker RE. 2014. The importance of Purkinje activation in long duration ventricular fibrillation. *Journal of the American Heart Association* 3: e000495
- Huxley HE**. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science (New York, N.Y.)* 164: 1356-65
- Hyatt CJ**, Zemlin CW, Smith RM, Matiukas A, Pertsov AM, Bernus O. 2008. Reconstructing subsurface electrical wave orientation from cardiac epi-fluorescence recordings: Monte Carlo versus diffusion approximation. *Optics express* 16: 13758-72
- John RM**, Tedrow UB, Koplman BA, Albert CM, Epstein LM, et al. 2012. Ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Lancet (London, England)* 380: 1520-9
- Kleber AG, Rudy Y**. 2004. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiological reviews* 84: 431-88

- Knecht S**, Sacher F, Wright M, Hocini M, Nogami A, et al. 2009. Long-term follow-up of idiopathic ventricular fibrillation ablation: a multicenter study. *Journal of the American College of Cardiology* 54: 522-8
- Kuo CS**, Munakata K, Reddy CP, Surawicz B. 1983. Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. *Circulation* 67: 1356-67
- Laurita KR**, Girouard SD, Rosenbaum DS. 1996. Modulation of ventricular repolarization by a premature stimulus. Role of epicardial dispersion of repolarization kinetics demonstrated by optical mapping of the intact guinea pig heart. *Circulation research* 79: 493-503
- Lee FY**, Wei J, Wang JJ, Liu HW, Shih TC, Lin CI. 2004. Electromechanical properties of Purkinje fiber strands isolated from human ventricular endocardium. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 23: 737-44
- Liu MB**, de Lange E, Garfinkel A, Weiss JN, Qu Z. 2015. Delayed afterdepolarizations generate both triggers and a vulnerable substrate promoting reentry in cardiac tissue. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 12: 2115-24
- Loew LM**. 2015. Design and Use of Organic Voltage Sensitive Dyes. *Advances in experimental medicine and biology* 859: 27-53
- Lukas A**, Antzelevitch C. 1996. Phase 2 reentry as a mechanism of initiation of circus movement reentry in canine epicardium exposed to simulated ischemia. *Cardiovasc Res* 32: 593-603
- MacDonald GH**, Rubel EW. 2008. Three-dimensional imaging of the intact mouse cochlea by fluorescent laser scanning confocal microscopy. *Hearing research* 243: 1-10
- Marrouche NF**, Verma A, Wazni O, Schweikert R, Martin DO, et al. 2004. Mode of initiation and ablation of ventricular fibrillation storms in patients with ischemic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 43: 1715-20
- Marsman RF**, Tan HL, Bezzina CR. 2014. Genetics of sudden cardiac death caused by ventricular arrhythmias. *Nature reviews. Cardiology* 11: 96-111
- Martinez-Palomo A**, Alanis J, Benitez D. 1970. Transitional cardiac cells of the conductive system of the dog heart. Distinguishing morphological and electrophysiological features. *The Journal of cell biology* 47: 1-17
- McIntosh MA**, Cobbe SM, Smith GL. 2000. Heterogeneous changes in action potential and intracellular Ca²⁺ in left ventricular myocyte sub-types from rabbits with heart failure. *Cardiovasc Res* 45: 397-409
- Miller EW**, Lin JY, Frady EP, Steinbach PA, Kristan WB, Jr., Tsien RY. 2012. Optically monitoring voltage in neurons by photo-induced electron transfer through molecular wires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 2114-9
- Miquerol L**, Moreno-Rascon N, Beyer S, Dupays L, Meilhac SM, et al. 2010. Biphasic development of the mammalian ventricular conduction system. *Circulation research* 107: 153-61
- Morita T**, Shimada T, Kitamura H, Nakamura M. 1991. Demonstration of connective tissue sheaths surrounding working myocardial cells and Purkinje cells of the sheep moderator band. *Archives of histology and cytology* 54: 539-50

- Morley GE**, Danik SB, Bernstein S, Sun Y, Rosner G, et al. 2005. Reduced intercellular coupling leads to paradoxical propagation across the Purkinje-ventricular junction and aberrant myocardial activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4126-9
- Myerburg RJ**, Nilsson K, Gelband H. 1972. Physiology of canine intraventricular conduction and endocardial excitation. *Circulation research* 30: 217-43
- Myerburg RJ**, Stewart JW, Hoffman BF. 1970. Electrophysiological properties of the canine peripheral A-V conducting system. *Circulation research* 26: 361-78
- Myles RC**, Bernus O, Burton FL, Cobbe SM, Smith GL. 2010. Effect of activation sequence on transmural patterns of repolarization and action potential duration in rabbit ventricular myocardium. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299: H1812-22
- Nabauer M**, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. 1996. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 93: 168-77
- Nam GB**, Kim YH, Antzelevitch C. 2008. Augmentation of J waves and electrical storms in patients with early repolarization. *The New England journal of medicine* 358: 2078-9
- Nerbonne JM**, Kass RS. 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* 85: 1205-53
- Ono N**, Yamaguchi T, Ishikawa H, Arakawa M, Takahashi N, et al. 2009. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Archives of histology and cytology* 72: 139-49
- Pandit SV**, Jalife J. 2013. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circulation research* 112: 849-62
- Perez MV**, Friday K, Froelicher V. 2012. Semantic confusion: the case of early repolarization and the J point. *The American journal of medicine* 125: 843-4
- Rosso R**, Kogan E, Belhassen B, Rozovski U, Scheinman MM, et al. 2008. J-point elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects: incidence and clinical significance. *Journal of the American College of Cardiology* 52: 1231-8
- Rouzioux JM**. 1990. Who is responsible for what? *Fundamental & clinical pharmacology* 4 Suppl 2: 183s-87s
- Sadek MM**, Benhayon D, Sureddi R, Chik W, Santangeli P, et al. 2015. Idiopathic ventricular arrhythmias originating from the moderator band: Electrocardiographic characteristics and treatment by catheter ablation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 12: 67-75
- Sadek MM**, Marchlinski FE. 2014. Ablation of ventricular arrhythmias. *Trends in cardiovascular medicine* 24: 296-304
- Sawant P**, Kshar A, Byakodi R, Paranjpe A. 2014. Immunofluorescence in Oral Mucosal Diseases "CA Review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Radiology* 2: 6-10
- Scheinman MM**. 2009. Role of the His-Purkinje system in the genesis of cardiac arrhythmia. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 6: 1050-8
- Schmitt N**, Grunnet M, Olesen SP. 2014. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiological reviews* 94: 609-53

- Serra-Grima R**, Donate M, Alvarez-Garcia J, Barradas-Pires A, Ferrero A, et al. 2015. Long-term follow-up of early repolarization pattern in elite athletes. *The American journal of medicine* 128: 192.e1-9
- Severs NJ**. 2000. The cardiac muscle cell. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22: 188-99
- Severs NJ**, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 80: 9-19
- Shaw RM, Rudy Y**. 1997. Electrophysiologic effects of acute myocardial ischemia. A mechanistic investigation of action potential conduction and conduction failure. *Circulation research* 80: 124-38
- Silverman ME**, Grove D, Upshaw CB, Jr. 2006. Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. *Circulation* 113: 2775-81
- Silvestri L**, Costantini I, Sacconi L, Pavone FS. 2016. Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *Journal of biomedical optics* 21: 081205
- Stephenson RS**, Boyett MR, Hart G, Nikolaidou T, Cai X, et al. 2012. Contrast enhanced micro-computed tomography resolves the 3-dimensional morphology of the cardiac conduction system in mammalian hearts. *PloS one* 7: e35299
- Stuyvers BD**, Dun W, Matkovich S, Sorrentino V, Boyden PA, ter Keurs HE. 2005. Ca²⁺ sparks and waves in canine purkinje cells: a triple layered system of Ca²⁺ activation. *Circulation research* 97: 35-43
- Sugi K**, Karagueuzian HS, Fishbein MC, Mandel WJ, Peter T. 1987. Cellular electrophysiologic characteristics of surviving subendocardial fibers in chronically infarcted right ventricular myocardium susceptible to inducible sustained ventricular tachycardia. *American heart journal* 114: 559-69
- Sun Y, Weber KT**. 2005. Animal models of cardiac fibrosis. *Methods in molecular medicine* 117: 273-90
- Szumowski L**, Sanders P, Walczak F, Hocini M, Jais P, et al. 2004. Mapping and ablation of polymorphic ventricular tachycardia after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 44: 1700-6
- Tabereaux PB**, Walcott GP, Rogers JM, Kim J, Dossall DJ, et al. 2007. Activation patterns of Purkinje fibers during long-duration ventricular fibrillation in an isolated canine heart model. *Circulation* 116: 1113-9
- Tamargo J**, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. 2004. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 62: 9-33
- Tanaka H**, Hamamoto T, Takamatsu T. 2005. Toward an Integrated Understanding of the Purkinje Fibers in the Heart: The Functional and Morphological Interconnection between the Purkinje Fibers and Ventricular Muscle. *Acta Histochemica Et Cytochemica* 38: 257-65
- Ter Keurs HE, Boyden PA**. 2007. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiological reviews* 87: 457-506
- Tranum-Jensen J**, Wilde AA, Vermeulen JT, Janse MJ. 1991. Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. *Circulation research* 69: 429-37
- Tse G**. 2016. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Journal of arrhythmia* 32: 75-81

- Tsuchiya T**, Okumura K, Honda T, Iwasa A, Ashikaga K. 2001. Effects of verapamil and lidocaine on two components of the re-entry circuit of verapamil-sensitive idiopathic left ventricular tachycardia. *Journal of the American College of Cardiology* 37: 1415-21
- Tung P, Albert CM**. 2013. Causes and prevention of sudden cardiac death in the elderly. *Nature reviews. Cardiology* 10: 135-42
- Vaseghi M, Shivkumar K**. 2008. The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. *Progress in cardiovascular diseases* 50: 404-19
- Walton RD**, Benoist D, Hyatt CJ, Gilbert SH, White E, Bernus O. 2010. Dual excitation wavelength epifluorescence imaging of transmural electrophysiological properties in intact hearts. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 7: 1843-9
- Walton RD**, Benson AP, Hardy ME, White E, Bernus O. 2013. Electrophysiological and structural determinants of electrotonic modulation of repolarization by the activation sequence. *Frontiers in physiology* 4: 281
- Walton RD**, Martinez ME, Bishop MJ, Hocini M, Haissaguerre M, et al. 2014. Influence of the Purkinje-muscle junction on transmural repolarization heterogeneity. *Cardiovasc Res* 103: 629-40
- Walton RD**, Mitrea BG, Pertsov AM, Bernus O. 2009. A novel near-infrared voltage-sensitive dye reveals the action potential wavefront orientation at increased depths of cardiac tissue. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* 2009: 4523-6
- Walton RD**, Smith RM, Mitrea BG, White E, Bernus O, Pertsov AM. 2012. Extracting surface activation time from the optically recorded action potential in three-dimensional myocardium. *Biophysical journal* 102: 30-8
- Yan GX, Antzelevitch C**. 1998. Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome. *Circulation* 98: 1928-36
- Yan GX**, Shimizu W, Antzelevitch C. 1998. Characteristics and distribution of M cells in arterially perfused canine left ventricular wedge preparations. *Circulation* 98: 1921-7
- Yeh JL**, Wu JR, Lin CI, Chen IJ. 1998. Ionic effects of capsinolol, a calcitonin gene-related peptide releasing beta-adrenoceptor blocker, on isolated cardiac muscles. *General pharmacology* 31: 253-60

Annexes

Annexe 1 : Données supplémentaires de l'article 1

Supplemental materials

Methods

Optical mapping experiments

Hearts were obtained from sheep (N=5) weighing 40 to 55 kg in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and the local ethical committee. Sheep were euthanized and hearts were rapidly excised, cannulated and flushed with cold cardioplegic solution, containing (mM): NaCl, 110; CaCl₂, 1.2; KCl, 16; MgCl₂, 16; NaHCO₃, 10 and glucose, 9.01 at 4°C. The left anterior descending arterially-perfused region was dissected, coronary-perfused and leaks carefully tied-off under cold cardioplegic solution. Preparations were mounted on to a frame to stretch and expose the endocardial surface then submersed and perfused with a saline solution containing (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 24; NH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1; glucose, 5.6; KCl, 4; CaCl₂, 1.8, at 37°C. Preparations were loaded with the voltage-sensitive dye Di-4-ANBDQBS which was excited by illumination of the endocardial surface using monochromatic LEDs at 660 nm (Cain Research Ltd, Kent, UK). Optical images (100x100 pixels) of signals passed through a 715nm long-pass filter were acquired using a Micam Ultima CMOS camera (SciMedia USA Ltd, CA, USA) at 1 kHz with a spatial resolution of 0.4x0.4 mm. Optical signals were filtered using a low-pass frequency filter at 120 Hz followed by spatial averaging (kernel 1.2 mm) and temporal averaging (kernel 3 ms).

Optical activation times (AT) were determined by the time of maximal derivative during the AP upstroke and APD was determined as the difference between the time of 80% of repolarization and AT. The orientation of the wave front with respect to the endocardial surface was determined by the normalized amplitude of the maximal derivative on the AP upstroke, v_F^* ¹. Local APD differences at origins of activation were calculated from the difference between APD at the earliest locally activated pixel and a mean of APDs from pixels within a radius of 6 mm and with AT delays between 5 and 10 ms.

Ionic models

GpK was also assumed to increase, based on differences in protein expression². To maintain stability of Ca²⁺ fluxes, GpCa was increased 5-fold. Gkr and Gks were changed to match experimental APDs³. To preserve the transmural APD gradient, Gto was further reduced by 80% in the failing endocardial cell model. These changes preserved distinct electrophysiological features between the myocardium and the Purkinje cells, including AP morphology and duration, as reported experimentally³.

The Purkinje-Muscle Junction

Briefly, the terminal point of the Purkinje strand is connected to myocardial nodes within a set radius of 600 micrometers. Currents flow between the myocytes and Purkinje fibers according to intracellular voltage differences. The current at the terminal Purkinje fiber is divided by a constant to account for current amplification by terminal branching and/or transitional cells. Model parameters were optimized to recreate known physiological characteristics⁴⁻⁶, by running several simulations of anterograde and retrograde propagation.

To compare single cell APD restitution characteristics from each ionic model, an S1S2 stimulus protocol was applied. Cells were paced over 200 s at 1000 ms basic cycle lengths followed by S1S2 intervals ranging from 300 to 1000 ms. Intervals were incremented by 5 ms from 300 to 400 ms, by 25 ms until 500 ms, and then by 100 ms, until 1000 ms. For characterizing APD restitution in wedges, we paced endocardially with an S1S2 protocol

comprising a train of 10 S1 pulses followed by a single S2 pulse with S1S2 intervals ranging from 325 to 1000 ms.

In non-failing and failing models, we identified the highest Purkinje-myocyte coupling resistance, R_{PMJ} , to the nearest 50 M Ω , that permitted anterograde transmission, which were 44.85 G Ω and 24.3 G Ω , respectively. Anterograde propagation delays were on the order or several milliseconds with much shorter retrograde delays. Assigning R_{PMJ} values close to the threshold for anterograde conduction block produced PMJs that were susceptible to unidirectional block upon physiological changes in conditions that favor dissociation of the Purkinje network from the myocardium, as observed experimentally⁷⁻⁹.

Activation time was determined by a fixed threshold level of -10 mV to avoid capturing artifacts of stimulation or early depolarization of the AP foot manifest by large voltage gradients across the PMJ. APD was measured between activation and 80% return from the peak of the AP plateau.

Simulations of optical mapping of the transmural-cut surface

Fluorescence signals were calculated by solving the photon diffusion equation¹⁰. We assumed an illumination wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 669 nm. Under these conditions, typical values for the diffusion of illumination and emission light are 0.19 and 0.36 mm respectively. Absorption coefficients of 0.52 and 0.12 mm⁻¹ were used for illumination and emission respectively¹¹. The minimum resolution computed matched the simulation discretization. For coarser resolutions, spatial averages were taken.

Results

Wavefront transmission across the PMJ

Supplemental figure 2A shows the activation sequence throughout the wedge preparation following Purkinje stimulation in non-failing myocardium with the PMJ 2.5 mm from the imaged surface. An elliptical activation break-through site was observed at the endocardial surface, consistent with the fiber orientation at the surface. Activation times from a transmural cross-section at the PMJ showed activation originated from the PMJ. Transmural propagation was uninterrupted until it reached either the epicardial or endocardial surface boundaries. AP traces from myocardial nodes with the earliest activation time at the PMJ (2mm from the endocardial surface) were compared against a mid-wall location 5 mm from the endocardial surface (second from right panel). Gradients in characteristics of AP morphology were evident. At the PMJ, the AP showed a negative shift of the plateau potential and modest AP triangulation compared with the AP from the mid wall, despite each node having the same intrinsic AP properties. In addition, AP traces from the mid-point and distal nodes of the Purkinje fiber were overlaid. The distal Purkinje fiber node showed a positive shift of the plateau potential and reduced AP triangulation compared to AP from the mid-fiber node. Following rapid depolarization of the distal node of the Purkinje fiber, the activation of the myocardium at the PMJ is preceded by a slow depolarizing AP foot causing a substantial transmission delay of 8.6 ms across the PMJ. Supplemental figure 2B shows activation maps for anterograde propagation in failing myocardium. Compared to the non-failing simulation, total wedge activation time was increased. This was attributable to a reduction of conduction velocity, particularly in the transmural plane. From mid-fiber to the distal node of the Purkinje fiber, no gradient of AP morphology was observed. However, in myocardium, the plateau phase of the AP was shortened at the PMJ compared with the mid-wall. A slow depolarizing foot of the AP upstroke was considerably prolonged and the apparent V_m threshold for eliciting propagation was more positive than for non-failing simulations. As such, the transmission delay across the PMJ was 25.5 ms.

Distribution of APD following anterograde activation of the myocardium

The impact of an anterograde activation sequence on transmural distribution of APD was investigated from non-failing and failing simulations. Figure 3A shows an APD map of the surfaces and transmural cross-section through the PMJ from an anterograde activation sequence. In non-failing myocardium, APD appears to negatively correlate with activation time, as previously described^{12, 13}, whereby the longest APD was localized to the PMJ. However the maximum APD was not associated with the origin of activation, but instead was localized to the PMJ. A transmural profile of APD through the PMJ is plotted for the anterograde activation sequence (figure 3B). APD shortened with increasing distance from the PMJ. However, the spatial gradient of APD was steepest at the boundary of the PMJ, which reached a maximum of 7.97 ms/mm compared with 1.22 ms/mm at a mid-wall depth of 5 mm.

For failing myocardium, the PMJ was associated with a localized negative APD deflection (figure 3C). An anterograde activation sequence led to APD gradients that were negatively correlated to activation time at sites distant from the PMJ. A transmural profile of APD from anterograde conduction showed that APD minima co-localized to the PMJ (figure 3D). APD amplitude at the PMJ was measured relative to the maximum APD of profiles, which always corresponded to a sub-endocardial depth of 0.7 mm, superficial to the PMJ. The amplitude of APD at the PMJ was 7.4 ms. The maximal spatial gradient of APD were localized to the boundary of the PMJ for anterograde conduction, which was 9.9 ms/mm.

Determinants of APD heterogeneity

Reduced R_{PMJ} attenuated anterograde transmission delays to 3.0 ms from 8.6 ms at baseline but did not affect retrograde transmission. Increasing R_{PMJ} blocked anterograde propagation whilst retrograde conduction was unaffected. Figure 4B shows activation maps for retrograde activation and corresponding APD maps. Maps can be compared to figures 4B and 5A of the main article with baseline R_{PMJ} . Activation was unaffected by changes in R_{PMJ} . R_{PMJ} at 75% increased APD amplitude while increasing R_{PMJ} to 125% caused a modest reduction (figure 7A of the main article).

In failing simulations, anterograde, but not retrograde, transmission delays were more sensitive to differences in R_{PMJ} than for non-failing myocardium (figure 4C). Delays were 6.1 ms for R_{PMJ} of 75% compared to baseline 25.5 ms. As with non-failing myocardium, increasing R_{PMJ} blocked anterograde transmission. Figure 4D of the main article shows reducing R_{PMJ} from 125% to 75% resulted in conduction slowing on approach to the PMJ for retrograde activation. Local APD depressions were emphasized by reducing R_{PMJ} . In addition, clustering of APD isobars were observed where conduction slowed at the PMJ boundary, indicating steep gradients of APD (figure 7B of the main article).

We further investigated the influence of PS branching on local myocardial APD by altering the PMJ radius, and therefore the PMJ volume. PMJ radii of 400 μ m decreased APD amplitude by 106.7%, and 800 μ m radii increased it by 40.0% from baseline (figure 7C of the main article). Figure 5A shows relative differences in number of myocardial nodes with prolonged APDs (>315.5 ms) were positively correlated to PMJ radius. Conversely, maximum APD regions in failing simulations were associated with early activation of sub-endocardium, but not PMJ (figure 5B). However, the amplitude of APD depression in failing tissue was strongly effected by PMJ radius (Figure 7D of the main article). Decreasing PMJ radii to 400 μ m decreased local APD amplitude by 75.6% and increased by 64.3% with a radius of 800 μ m from baseline.

Transmural APD distributions were sensitive to isotropic changes in tissue conductivity. Reducing conductivity slowed conduction, increasing total activation time (figure 6A). σ_L values of 0.09 and 0.21 S/m were compared to a baseline value of 0.33 S/m. Maximum conduction velocity was decreased to 36.3 and 54.4 cm/s vs. 72.5 cm/s. Transmural APD distributions were highly dependent on conductivity. Reducing conductivity in non-failing myocardium steepened transitions of APD at interfaces between myocardial layers (figure 6B & figure 7E of the main article), and at the PMJ boundary (8.30 and 4.42 ms/mm vs. 3.68 ms/mm, respectively). APD amplitude at the PMJ was increased by 133.3% and 26.7%, respectively, compared with 2.9 ms at baseline. Consequently, transmural APD dispersions were enhanced by 31.8% and 7.8%. For failing simulations, similar behavior was observed (figure 6C & figure 7F of the main article). Maximum conduction velocity was reduced to 16.7 and 27.2 cm/s vs. 43.5 cm/s, respectively. From a baseline of 7.3 ms, APD amplitude was increased by 77.9% and 22.6%. APD dispersion was modified by 15.5% and 4.4% from a dispersion of 28.6 ms at baseline as a result of differences in APD in the sub-epicardium alone, and not to the PMJ. Conduction anisotropy, however, had only a minor role in determining transmural APD distribution. Total activation times increased with anisotropy ratio but local APD at the PMJ only marginally increased by changing ratios of anisotropy from 6:4:3 to 4:2:1 and to 9:3:1 in non-failing simulations (figure 7). The dispersions of APD were 15.9 ms, 16.8 ms and 17.4 ms for each anisotropy ratio, respectively, in non-failing myocardium (Figure 7E) and 27.6 ms, 28.6 ms and 29.6 ms in failing myocardium (figure 7F).

References

- Walton RD, Smith RM, Mitrea BG, White E, Bernus O, Pertsov AM. Extracting surface activation time from the optically recorded action potential in three-dimensional myocardium. *Biophys J* 2012;**102**:30-38.
- Maack C, Dabew ER, Hohl M, Schafers HJ, Bohm M. Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning. *Circ Res* 2009;**105**:811-817.
- Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res* 2010;**106**:981-991.
- Tranum-Jensen J, Wilde AA, Vermeulen JT, Janse MJ. Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. *Circ Res* 1991;**69**:429-437.
- Wiedmann RT, Tan RC, Joyner RW. Discontinuous conduction at Purkinje-ventricular muscle junction. *Am J Physiol* 1996;**271**:H1507-1516.
- Tan RC, Ramza BM, Joyner RW. Modulation of the Purkinje-ventricular muscle junctional conduction by elevated potassium and hypoxia. *Circulation* 1989;**79**:1100-1105.
- Joyner RW, Overholt ED. Effects of octanol on canine subendocardial Purkinje-to-ventricular transmission. *Am J Physiol* 1985;**249**:H1228-1231.
- Morley GE, Danik SB, Bernstein S, Sun Y, Rosner G, Gutstein DE, Fishman GI. Reduced intercellular coupling leads to paradoxical propagation across the Purkinje-ventricular junction and aberrant myocardial activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:4126-4129.
- Tamaddon HS, Vaidya D, Simon AM, Paul DL, Jalife J, Morley GE. High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. *Circ Res* 2000;**87**:929-936.
- Bishop MJ, Rodriguez B, Eason J, Whiteley JP, Trayanova N, Gavaghan DJ. Synthesis of voltage-sensitive optical signals: application to panoramic optical mapping. *Biophys J* 2006;**90**:2938-2945.
- Ding L, Splinter R, Knisley SB. Quantifying spatial localization of optical mapping using Monte Carlo simulations. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001;**48**:1098-1107.
- Sampson KJ, Henriquez CS. Electrotonic influences on action potential duration dispersion in small hearts: a simulation study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:H350-360.
- Walton RD, Benson AP, Hardy ME, White E, Bernus O. Electrophysiological and structural determinants of electrotonic modulation of repolarization by the activation sequence. *Front Physiol* 2013;**4**:281.
- ten Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H1573-1589.
- Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:379-385.
- Koumi S, Backer CL, Arentzen CE, Sato R. beta-Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular myocytes. Alteration in channel response to beta-adrenergic stimulation in failing human hearts. *J Clin Invest* 1995;**96**:2870-2881.
- Shang LL, Pfahnl AE, Sanyal S, Jiao Z, Allen J, Banach K, Fahrenbach J, Weiss D, Taylor WR, Zafari AM, Dudley SC, Jr. Human heart failure is associated with abnormal C-terminal splicing variants in the cardiac sodium channel. *Circ Res* 2007;**101**:1146-1154.

18. 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. *Circ Res* 2003;**92**:651-658.
19. Bundgaard H, Kjeldsen K. Human myocardial Na,K-ATPase concentration in heart failure. *Mol Cell Biochem* 1996;**163-164**:277-283.

Table Legends

Table 1. Modifiers are operands for parameters from epicardial and endocardial TT2 ionic models¹⁴ for epicardial and endocardial models in this study. The Purkinje cell model was modified from the undefined cell type TT2 ionic model. Gks, slow K⁺ conductance; Gkr, rapid K⁺ conductance; Gto, transient outward conductance; xr2_off, voltage-shift of inactivation of rapid K⁺ current; GK1, inward rectifier K⁺ conductance; GNa, Na⁺ current conductance; GCaL, L-type Ca²⁺ conductance; D_CaL_off, voltage-shift of inactivation of D-type Ca²⁺ current; Vrel, flux of triggered Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum (SR) compartment; Vleak, flux of Ca²⁺ leak from the SR; Vmaxup, flux of Ca²⁺ uptake in to the SR; GpK, conductance of the K⁺ pump; GpCa, flux of the Ca²⁺ pump; knak, flux of Na⁺-K⁺ exchanger; knaca, flux of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger; GbCa, conductance of background Ca²⁺; GbNa, conductance of background Na⁺.

Figure Legends

Figure 1. Experimental preparation. Endocardial view of a coronary-perfused left ventricular wedge preparation. Black box correlates with the image size and position of representative maps shown in figures 1 and 2 of the main article. Preparations were stimulated via either free-running Purkinje fibers or on the endocardial surface (yellow star). Free-running Purkinje fibers (PF) were easily identifiable as white collagenous structures inserting to the anterior papillary muscle (PM) or the anterior free wall of the left ventricle (LV_{ant}). A major fascicle (F) was always observed extending from the septum to the PM. Arrows correspond to origins of early activation following stimulation of Purkinje fibers (as shown in Figures 1 and 2 of the main article).

Figure 2. Conduction across the PMJ. **A**, Impulse propagation in non-failing wedge simulations was initiated at the proximal node of the Purkinje fiber for anterograde activation sequences. The PMJ was 2.5 mm from the transmural cut-surface. From left to right, panels are: activation maps on the surface of the wedge and a transmural cross-section of the wedge through the PMJ; APs from nodes positioned in the myocardium at the centre of the PMJ, at a transmural depth of 5 mm in the myocardium, the distal-most node of the Purkinje fiber and at the mid Purkinje fiber. The right most panel is an expanded view of upstrokes from APs at the PMJ. Myocardial activation initiated from the PMJ following a pronounced conduction delay between activation of the distal Purkinje fiber and the myocardium at the PMJ. **B**, Anterograde activation sequences in a failing simulation. Shown are corresponding activation maps and AP traces as in **A**. All isochrones are at 2 ms intervals.

Figure 3. The PMJ contributes to myocardial APD heterogeneity. **A**, An APD map from a transmural cross-section through the PMJ of a non-failing simulation for an anterograde activation sequence. **B**, APD profile across the transmural cross-section from endocardium to epicardium and intersecting the PMJ. Equivalent APD map (**C**) and APD profile (**D**) for a failing simulation. All isobars are at 2 ms intervals.

Figure 4. Resistance across the PMJ. R_{PMJ} was modified by 75% and 125% for simulations with PMJs at 2.5 mm below the transmural-cut surface. The resultant changes in conduction delays across the PMJ were shown by overlaying AP upstroke traces extracted from the PMJ of the myocardium (solid traces) and the distal node of the PF (dashed traces) for anterograde and retrograde activation sequences from non-failing simulations at R_{PMJ} 75%, 100% and 125% (**A**). **B**, Activation (upper panels) and APD (lower panels) maps on

transmural cross-sections that intersect the PMJ from non-failing retrograde simulations with R_{PMJ} 75% and 125%. Corresponding activation time and APD maps for R_{PMJ} at 100% are shown in figures 2 and 3. As for non-failing simulations, AP upstrokes for anterograde and retrograde activation are shown for failing simulations with R_{PMJ} modified (**C**). **D**, Equivalent activation time and APD maps are shown for failing simulations as in **A**. All activation isochrones and APD isobars have 2 ms intervals.

Figure 5. The influence of the size of the PMJ on APD maxima. The impact of PMJ radii on local APD maxima were compared for non-failing (**A**) and failing (**B**) simulations following retrograde activation sequences. Panels show nodes identified throughout the myocardium with APD greater than 315.5 ms or 365.0 ms for non-failing and failing simulations for PMJ radii of 400 μ m, 600 μ m and 800 μ m. For non-failing myocardium, nodes above the APD threshold are highly localized to the PMJ and the Purkinje fiber and increase in number with increasing size of the PMJ. In contrast, APD maxima of failing simulations are localized to regions of early activation at the endocardial surface.

Figure 6. Transmural APD heterogeneity is dependent upon myocardial coupling. Conductivity properties of the myocardium were modified by changes in σ_L at fixed anisotropy ratios of 4:2:1. **A**, Total activation time of non-failing simulations was negatively correlated to conductivity. **B**, Local APD at the PMJ was sensitive to coupling. Reduced coupling augmented spatial differences in APD at the PMJ from the surrounding myocardium with the largest APD localized at the center of the PMJ. **C**, Activation time was increased with decreased conductivity in failing simulations. Time for total activation of myocardium was considerably longer for failing than non-failing simulations, as shown in **A**. A zone of conduction slowing was apparent at the approach to the PMJ followed by rapid excitation of the PMJ zone coinciding with activation of the junctioning nodes of the Purkinje fiber. Changes in conduction velocity at the PMJ were emphasized at lower conductivities. **D**, APD depressions were also further emphasized in failing simulations due to reduced myocardial conductivity. Spatial gradients of APD were greatest at the endocardial boundary of the PMJ, co-localized to the zone of slow conduction observed in **C**. Activation isochrones and APD isobars are at 2 ms intervals.

Figure 7. Conduction anisotropy. Ratios of conduction anisotropy of 9:3:1, 4:2:1 and 6:4:3 were compared for effects on APD heterogeneity at the PMJ. **A**, Decreasing conduction anisotropy ratio decreased transmural activation time in non-failing myocardium. **B**, APD maxima were observed at the PMJ for all ratio of conductivity in non-failing simulations but amplitude and spatial gradients did not differ. **C**, As observed in non-failing simulations, reduced conduction anisotropy ratios attenuated transmural activation time in failing simulations. **D**, An APD depression was observed at the PMJ for all ratios of conductivity in failing simulations, but concordantly with non-failing simulations, APD heterogeneity at the PMJ was unaltered. Transmural APD profiles for non-failing (**E**) and failing (**F**) simulations.

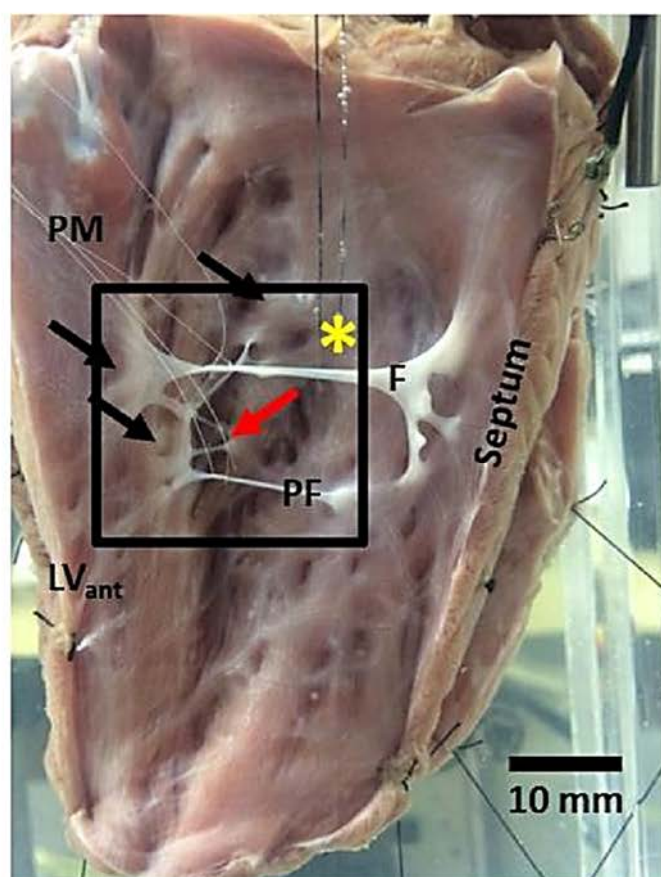
Figure 8. Optical imaging of the PMJ. **A**, APD map derived from transmembrane potentials (V_m) of non-failing simulations with a near-surface PMJ (depth of 0.25 mm). APD maps were derived from optical diffusion approximations of V_m signals for optical spatial resolutions of 100 μ m (**B**) or 500 μ m (**C**) achieved from appropriate spatial binning of the full resolution

Supplemental table 1.

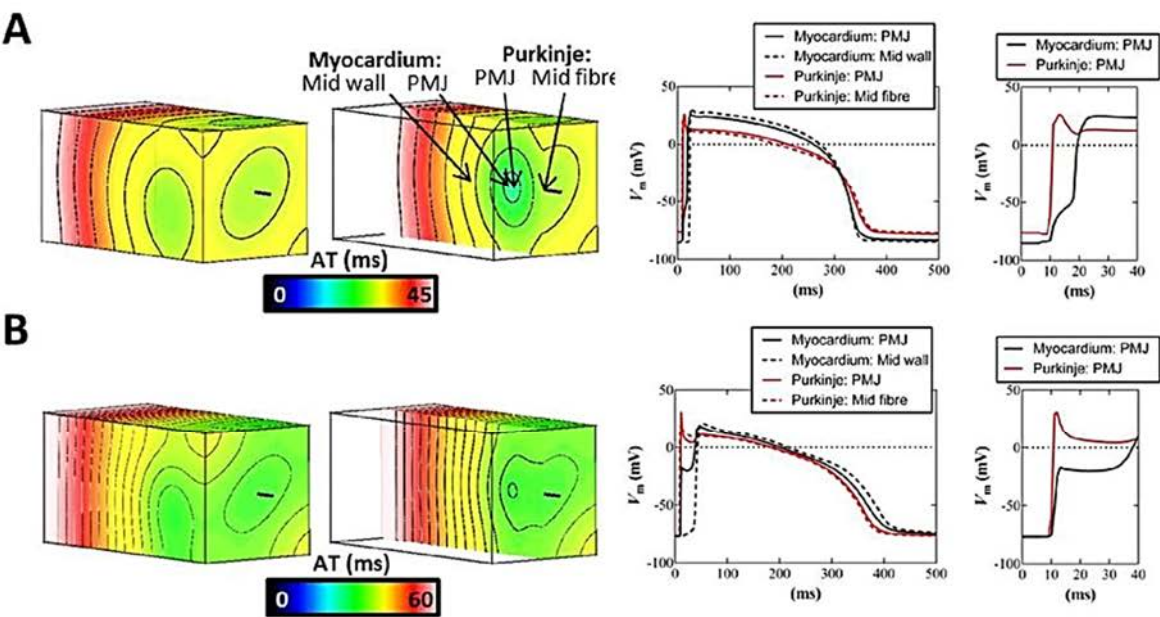
Table 1. Parameter modifiers for novel ionic models.

Parameters	Purkinje	ENDO	Failing EPI	Failing ENDO
Gks	x0.65	x0.9	x0.75	x0.75
Gkr	x0.3	x0.9	x0.75	x0.75
Gto	x0.4	x0.2	x0.636 ¹⁵	x0.127
xr2_off	-8.0			
GK1	x0.75		x0.856 ¹⁶	x0.856 ¹⁶
GNa	x2.94 ¹⁴		x0.5 ¹⁷	x0.5 ¹⁷
GCaL	x0.75			
D_CaL_off	-5.0		-5.0 ¹⁸	-5.0 ¹⁸
Vrel	x0.6		x0.56 ¹⁸	x0.56 ¹⁸
Vleak			x4.0 ¹⁸	x4.0 ¹⁸
Vmaxup	x0.6		x0.83 ¹⁸	x0.83 ¹⁸
GpK	x6.0		x1.2	x1.2
GpCa	x11.0		x5.0	x5.0
knak	x0.3		x0.75 ¹⁹	x0.75 ¹⁹
knaca	x0.3		x1.57 ¹⁸	x1.57 ¹⁸
GbCa	x11.5		x5.0	x4.3
GbNa	x0.3		x6.0	x6.0

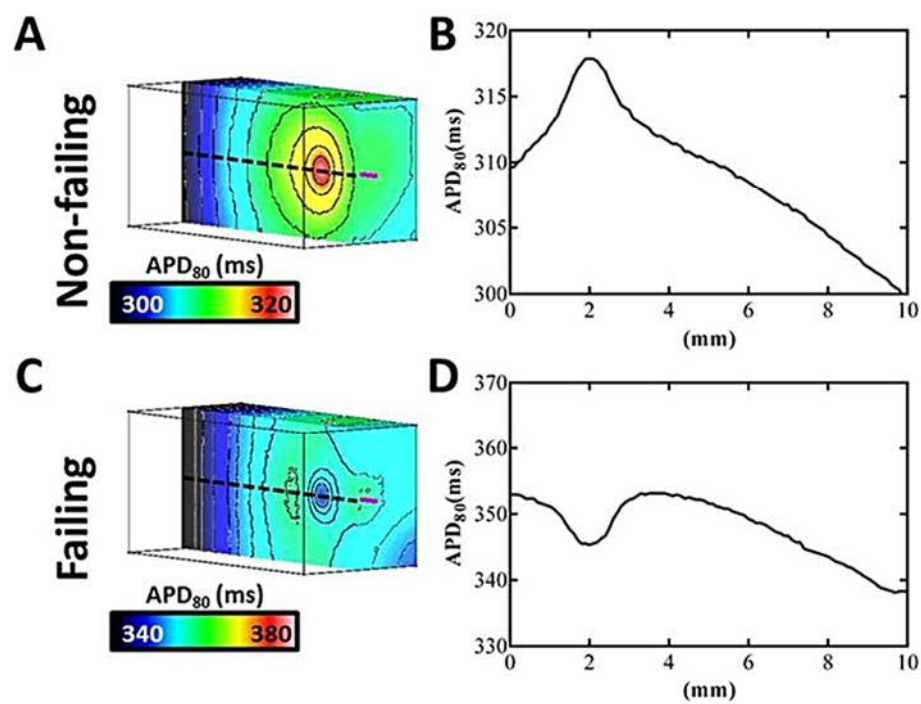
Supplemental figure 1.



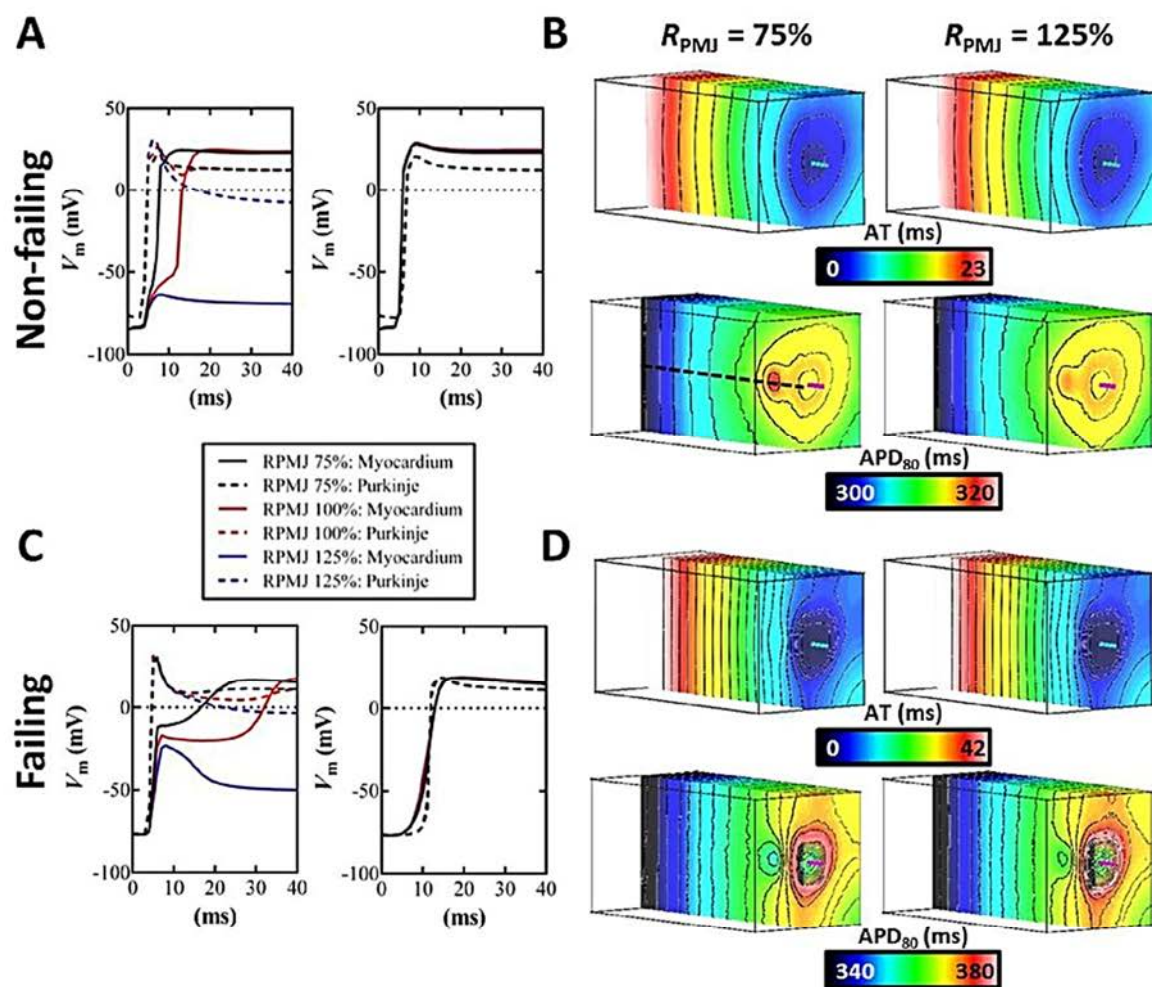
Supplemental figure 2.



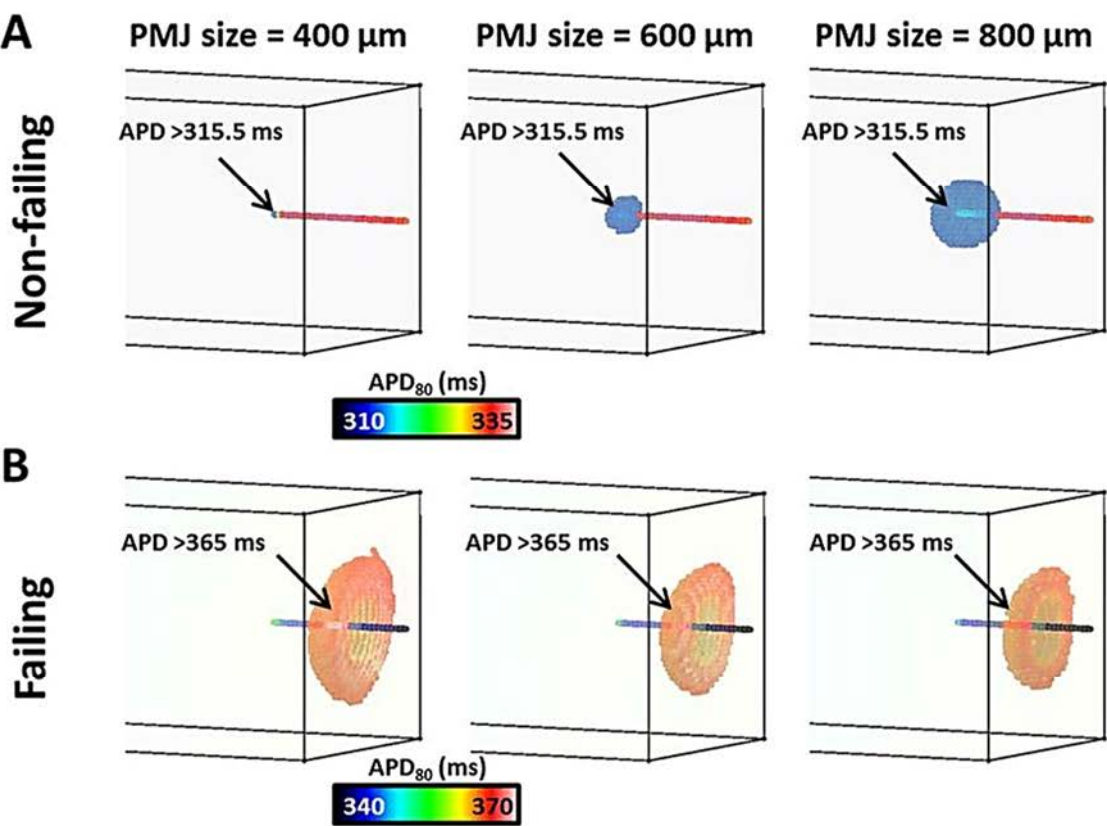
Supplemental Figure 3.



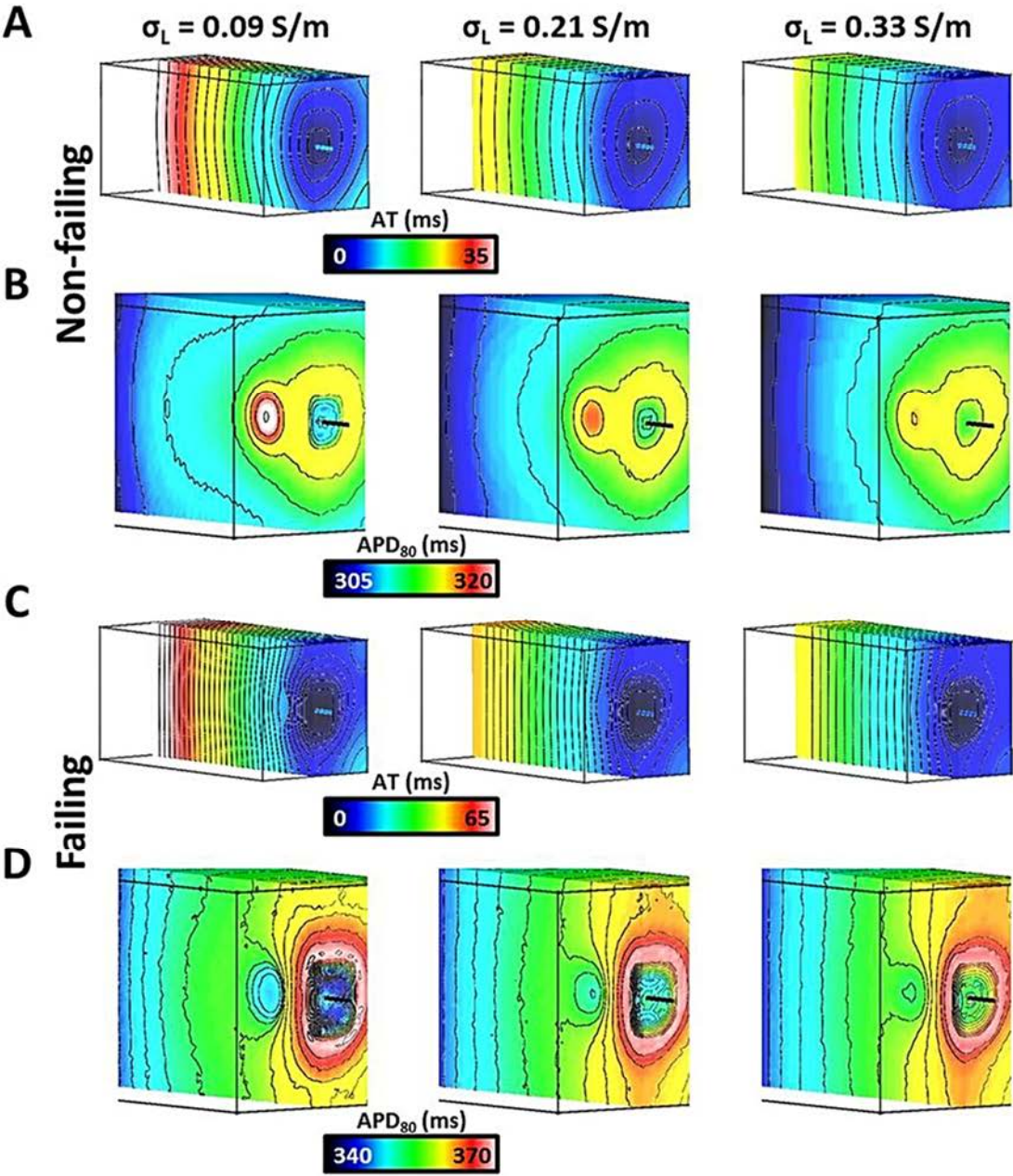
Supplemental figure 4.



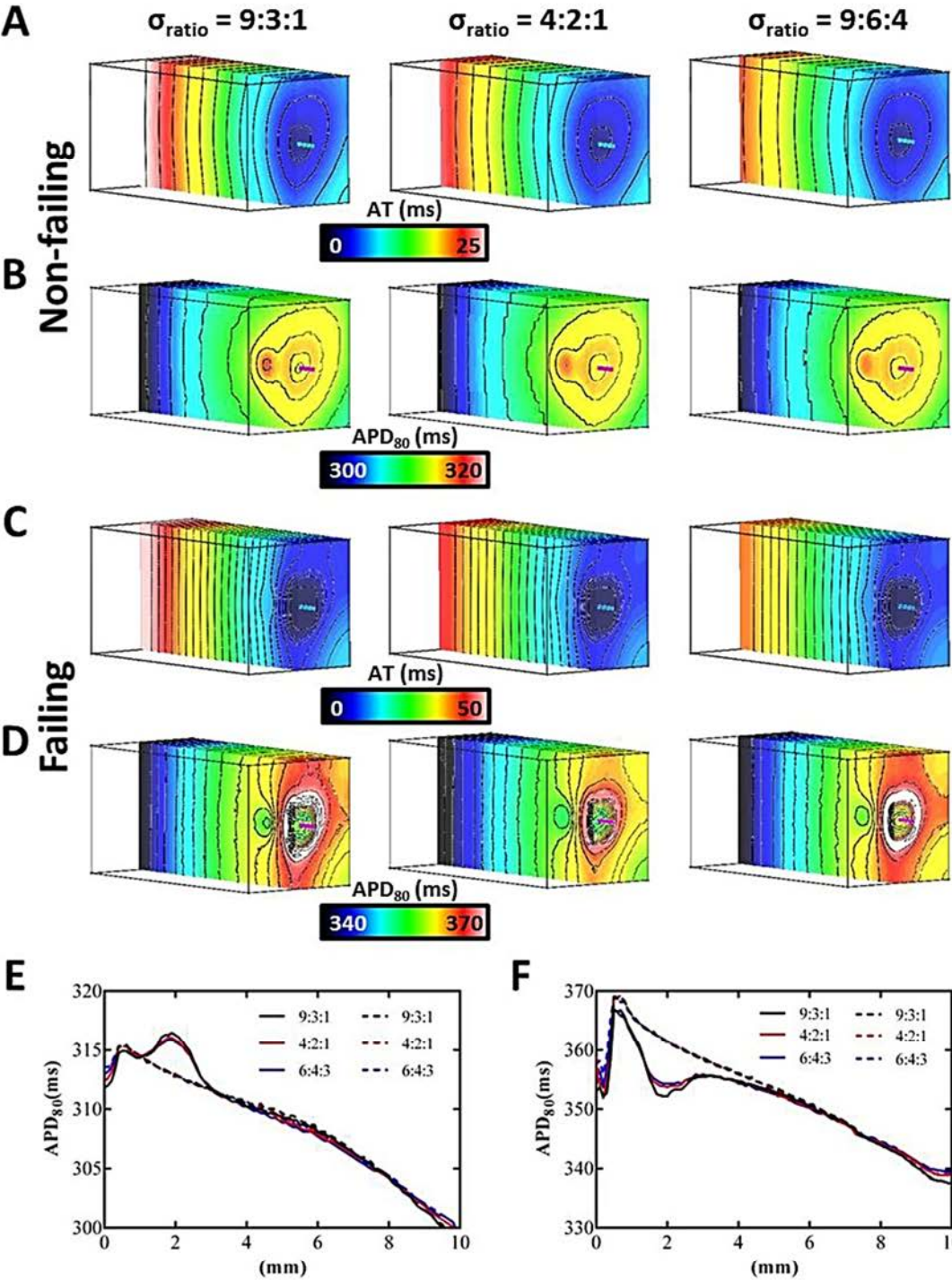
Supplemental figure 5.



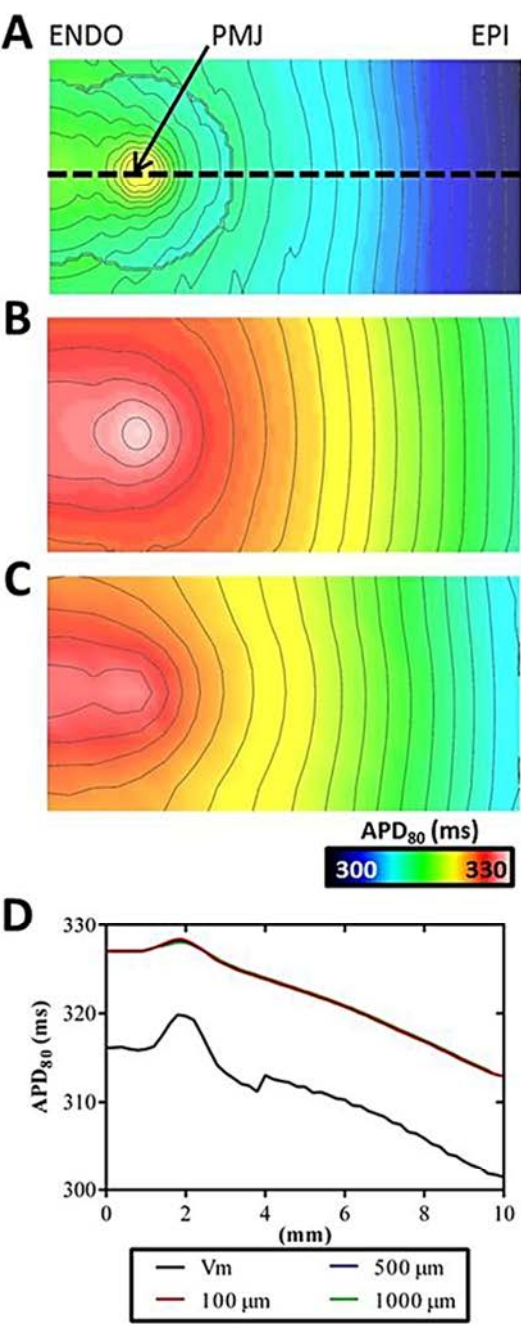
Supplemental figure 6.



Supplemental figure 7.



Supplemental figure 8.



Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article 2

Supplemental materials

Results

Two different pathways of Purkinje activation correlate to heterogeneous distribution of transmural AT

It is already known that sheep has a transmural distribution of PMJs in myocardium generating 2 types of activation, one close to the endocardial surface and the other deeper in the myocardium (figure 1A). In our experiments, free-running PF stimulation gave rise to a transmurally heterogeneous distribution profile of AT. The origins, with respect to depth from the imaged surface, of Purkinje-mediated activation were determined from the normalized amplitude of the maximal derivative of AP upstrokes (V_F) as previously shown^{1, 2}. Here, a low V_F (<0.22) corresponds to a surface activation and a high V_F (>0.22) to an intramural activation³. Finally, PMJs whereby the earliest activation was identified were selected for the study to dissociate true Purkinje-mediated activation from complex activation patterns caused by the non-uniform endocardial structure. Figure 1B, shows that for all experiments ($n=7$), of PMJs selected, 4 were identified below the V_F threshold and 3 PMJs above. PMJs with high V_F showed a higher synchronicity of endo- and epicardial activation times (8 ± 6 ms) where as low V_F PMJs had activation latency (62 ± 42 ms) at the epicardium versus the endocardium. Figure 1C shows endocardial and epicardial AT maps and endocardial V_F and APD maps for a surface or an intramural activation when pacing PF at 1 Hz. Origin of early activation are localized by arrows and breakthrough by dashed arrows. A total AT of 98 ms or 40 ms were found across the LV for the surface activation or intramural activation; respectively. Interestingly, the spatial distribution of APD₉₀ was heterogeneous for both activation types but only surface activation had a region of early activation associated with the longest APD₉₀ which corresponding to a low V_F (0.21). For intramural activation origin of the breakthrough did not seem to correlate with spatial dispersion of APD₉₀ and correspond to a high V_F (0.34).

Ionic models

Figure 2 shows that the Purkinje cell was electrophysiologically distinct from control and ischemic myocardial cells. In control myocardial cells, the Purkinje cell exhibited a more pronounced AP spike (47.3 mV) and a more negative plateau (13.4 mV) compared to ENDO (44.2 and 28.0 mV; respectively) and EPI cells (40.6 and 26.1 mV; respectively). The same Purkinje ionic model was used in control and ischemic conditions due to Purkinje resistance to ischemia^{4, 5}. Ischemia was modelled according to previously published methods⁶ and APD was modified for consistency with experiments using ionic modifies shown in supplemental table 1. The resulting AP spike and plateau amplitudes for ischemic myocardial cells with ENDO were 32.4 mV and 29.0 mV, respectively, and were 32.2 and 24.1 mV, respectively, for EPI cells. In control conditions, APDs of ENDO, EPI and PF cells were 434, 358 and 466 ms, and APDs were reduced to 346 and 296 ms in ischemia for ENDO and EPI cells.

Transmural AT heterogeneity determined by different activation pathways in simulations

Figure 3 shows AT and APD maps of transmural cross-section intersecting the PMJ and corresponding AT and APD profiles from surface or intramural activation of PMJ at 1 Hz. As shown in optical experiments, two distinct AT patterns were observed with a more pronounced surface activation latency (23 ms) between ENDO and EPI compared to intramural activation (0 ms). The maximum APD corresponded with the site of PMJ irrespective of PMJ depth (Surface: 401 and Mid-myocardium: 392 ms). For surface PMJ, the intrinsic myocardial APD gradient and AT sequence resulted in a strong shortening of APD from ENDO to EPI. Whereas, a PMJ located in mid-myocardium, showed an increasing APD trend from endocardial surface (384 ms) to the PMJ, suggesting a dominant effect of electrotonic modulation of repolarization caused by the activation sequence.

Modulation of functional PMJs by ischemia

Figure 4A indicates Mean $\pm$ SD number of activation origins when pacing PF at 1 Hz before (CTL) and after ischemia (ISC). A significant decrease of PMJ number was observed in ischemic conditions compared to control ($p=0.017$). Figure 4B shows endocardial AT maps for 3 different wedge preparations illustrating 3 different modulations of functional PMJs during ischemia, identical functional junctions (middle panel), loss of an functional junction (top panel), or new functional junction (bottom panel).

Table Legends

Table 1. Parameter modifiers for ionic models. Modifications were based upon a previous study³ but G_{Ca} and G_{Na} currents were modified to obtain similar APD values of experimental findings. G_{ks}, slow K⁺ conductance; G_{kr}, rapid K⁺ conductance; G_{to}, transient outward conductance; x_{r2_off}, voltage-shift of inactivation of rapid K⁺ current; G_{K1}, inward rectifier K⁺ conductance; G_{Na}, Na⁺ current conductance; G_{CaL}, L-type Ca²⁺ conductance; D_CaL_off, voltage-shift of inactivation of D-type Ca²⁺ current; V_{rel}, flux of triggered Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum (SR) compartment; V_{maxup}, flux of Ca²⁺ uptake in to the SR; G_{pK}, conductance of the K⁺ pump; G_{pCa}, flux of the Ca²⁺ pump; k_{nak}, flux of Na⁺-K⁺ exchanger; k_{naca}, flux of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger; G_{bCa}, conductance of background Ca²⁺; K_o, extracellular potassium ion concentration; F_{ATP}, binding kinetics of ATP to the potassium ATPase pump.

Figure Legends

Figure 1. Transmural AT heterogeneity determined by depth of the PMJ. **A**, Schematic representation of the origins of myocardial activation from the Purkinje network in sheep (yellow star). Purkinje mediated-activation showed 2 different transmural activation profiles, a surface activation or an intramural activation. **B**, Mean±SD of transmural AT delay and mean±SD of V_F for surface or intramural activation during PF pacing at 1 Hz. Transmural AT was defined as the difference between time at the origin of activation and time at the origin of breakthrough. Dashed line shows V_F threshold differentiating origins residing at the tissue surface or deeper myocardium. Statistical differences were determined by paired t-test (*p<0.05). **C**, Corresponding endocardial and epicardial AT maps, and endocardial V_F and APD maps for a short or a long transmural AT during PF stimulation at 1 Hz. Arrows show origin of early activation and dashed arrows origin of breakthrough. Isochrones are 10 ms spacing.

Figure 2. Ionic models. APs derives from human from PF, endocardial and epicardial ionic models of control (left panel) and ischemic (right panel) hearts. Shown are the last of a train of 100 APs stimulated at 1 Hz. Same PF AP was used in control and ischemic conditions due to Purkinje resistance to ischemia.

Figure 3. Transmural AT heterogeneity depending on PMJ location in human model. AT (left panel) and APD (right panel) maps in simulations from transmural cross-sections of wedges through the PMJ located at the surface (**A**) or intramurally (**B**). Models were paced at 1 Hz through the PF. Isochrones are 2 ms spacing. (**C**) Transmural APD and AT profiles.

Figure 4. Quantification of functional PMJs before and after ischemia. **A**, Mean±SD number of activation origins when pacing PF at 1 Hz. **B**, Corresponding endocardial AT maps for 3 different wedge preparations. Arrows show origins of early activation corresponding to PMJs. Isochrones are 10 ms spacing. Statistical differences were determined by paired t-test (*p<0.05).

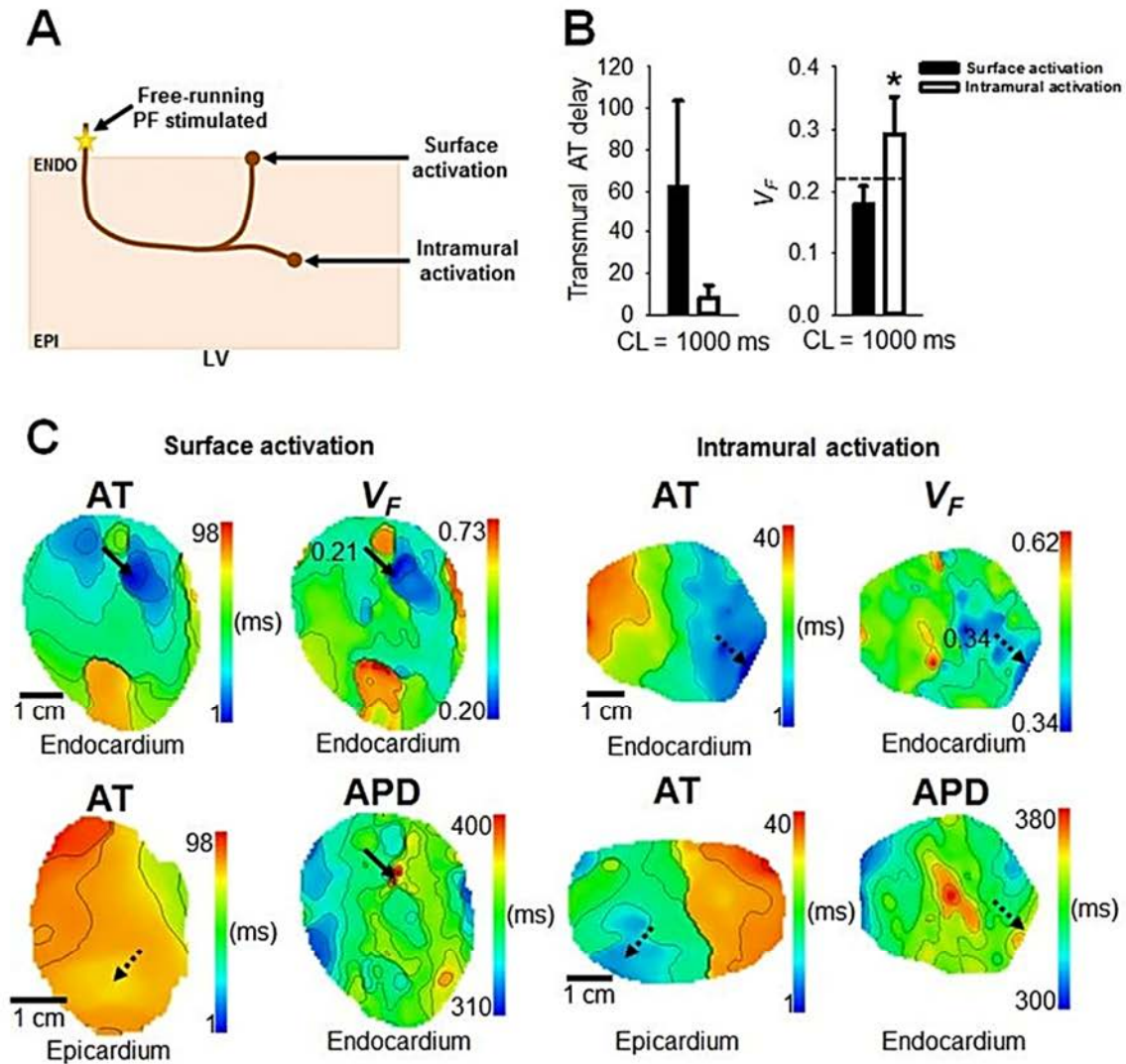
References

1. Hyatt CJ, Zemlin CW, Smith RM, Matiukas A, Pertsov AM, Bernus O. Reconstructing subsurface electrical wave orientation from cardiac epi-fluorescence recordings: Monte Carlo versus diffusion approximation. *Optics express* Sep 1 2008;16:13758-13772.
2. Walton RD, Smith RM, Mitrea BG, White E, Bernus O, Pertsov AM. Extracting surface activation time from the optically recorded action potential in three-dimensional myocardium. *Biophysical journal* Jan 4 2012;102:30-38.
3. Walton RD, Martinez ME, Bishop MJ, Hocini M, Haissaguerre M, Plank G, Bernus O, Vigmond EJ. Influence of the Purkinje-muscle junction on transmural repolarization heterogeneity. *Cardiovasc Res* Sep 1 2014;103:629-640.
4. Ono N, Yamaguchi T, Ishikawa H, Arakawa M, Takahashi N, Saikawa T, Shimada T. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Archives of histology and cytology* 2009;72:139-149.
5. Henry CG, Lowry OH. Quantitative histochemistry of canine cardiac Purkinje fibers. *The American journal of physiology* Nov 1983;245:H824-829.
6. Kazbanov IV, Clayton RH, Nash MP, Bradley CP, Paterson DJ, Hayward MP, Taggart P, Panfilov AV. Effect of Global Cardiac Ischemia on Human Ventricular Fibrillation: Insights from a Multi-scale Mechanistic Model of the Human Heart. *PLoS Comput Biol* 2014;10:e1003891.

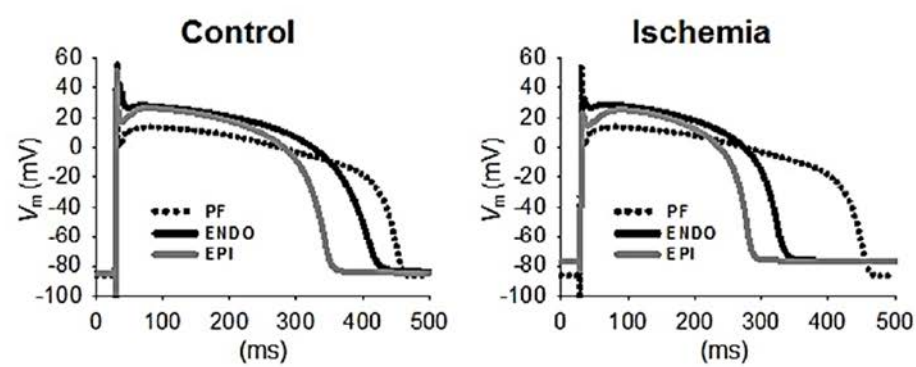
Supplemental table 1.

Flags	Purkinje	Control		Ischemia	
		ENDO	EPI	ENDO	EPI
GNa	x2.94			x0.8	x0.8
GCaL				x0.8	x0.8
D_CaL_off	-5.0				
Gto	x3.0	x0.5		x0.5	
GK1		x0.7		x0.7	
Gks	x0.2	x0.55	x0.9	x0.55	x0.9
Gkr	x0.2	x0.55	x0.9	x0.55	x0.9
Xr2_off	-8.0				
knak	x0.2				
knaca	x0.3				
GpCa	x11.0			x0.2	x0.2
GpK	x6.0			x0.5	x0.5
Vrel	x0.6				
Vmaxup	x0.6				
GbCa	x0.2				
Ko	5.4	5.4	5.4	8.0	8.0
F_ATP	0.0	0.0	0.0	x0.08	x0.08

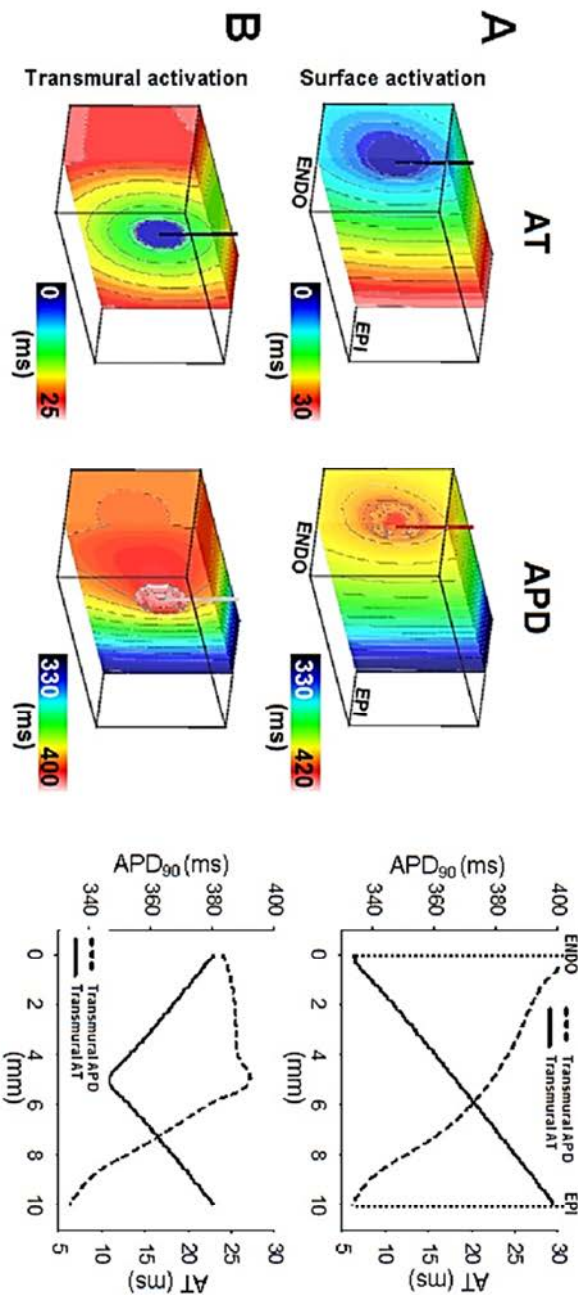
Supplemental figure 1.



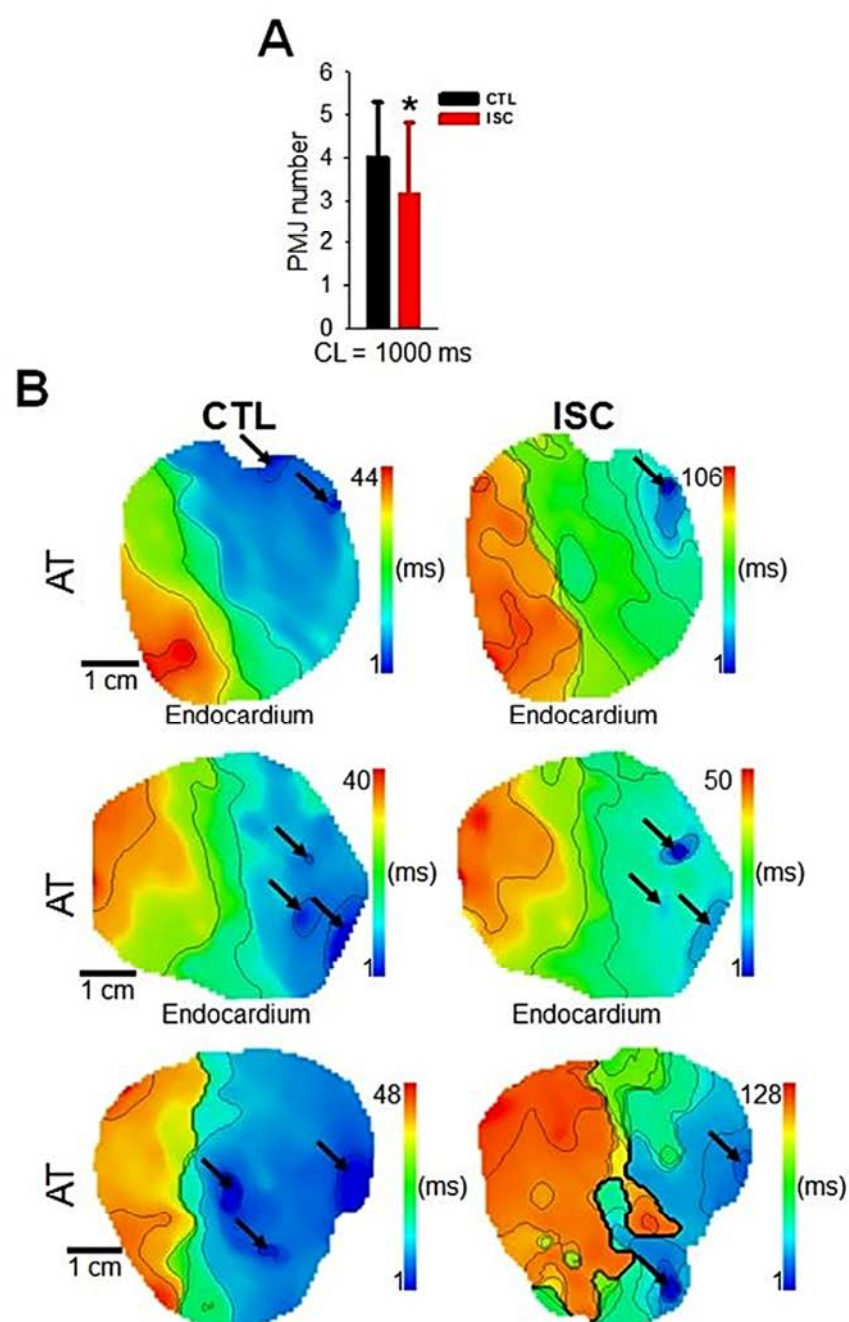
Supplemental figure 2.



Supplemental figure 3.



Supplemental figure 4.



Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article 3

Supplemental materials

Materials and methods

Histology

Tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS, pH 7.4 and agitated during 48 hrs. Samples underwent serial dehydration steps of ethanol at 70%, 80%, 95% and 100%, followed by toluene, 100%, which permitted the penetration of paraffin (warmed to 56°C) in to the sample.

Embedded samples were cooled to -4°C to accelerate solidification then stored at -20°C. Samples were sectioned at thicknesses of 8 µm using a microtome (Leica RM2255, France). Sections were treated with toluene to remove paraffin then rehydrated by serial dilutions of ethanol at 100%, 95%, 80%, followed by immersion in tap water. Sections were submitted to Masson's trichrome staining by immersing sections in: xylidine ponceau, 5 mins; rinsing with distilled water, 5 mins; Biebrich Scarlet-acid fuchsin solution, 1 min; 3% phosphomolybdic, 1 min; 1% glacial acetic acid, 1 min; 1% light green SF yellowish, 2 min and then 1% acetic acid, 1 min. Sections were again dehydrated by ethanol 95%, 6 mins and 100% ethanol, 6 mins followed by toluene, 3 mins and stored at room temperature in air. Sections were imaged using a standard binocular light microscope mounted with a high resolution CDD camera (Nikon DXM1200F, Japan).

Myocardial and Purkinje staining were quantified from histological sections using ImageJ. Purkinje and myocardium were masked and an RGB color threshold was applied to isolate myocardial-specific or Purkinje-specific staining from collagen. The quantity of each tissue component was quantified from the integral of frequency histograms of pixel intensity.

Experimental preparation of the sheep myocardium

Novel dual coronary-perfused ventricular wedges were prepared by dissecting the anterior left and right ventricles extending from the lateral left ventricular free wall to the posterior RV border while keeping the anterior two thirds of the interventricular septum (Supplemental figure 1). Both the left and right ostia of the coronary circulation from the aortic root were cannulated and perfused.

Perfusion leaks at cut surfaces were carefully tied-off or cauterized under cold cardioplegic solution and preparations mounted on to a frame, exposing the endocardial surface of the RV. Wedges were submersed and perfused with a saline solution containing (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 24; NH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1; glucose, 5.6; KCl, 4; CaCl₂, 1.8, at 37°C and pH7.4.

Optical and electrical mapping of the sheep myocardium

Novel dual coronary-perfused left anterior and right ventricular wedge preparations were imaged using optical mapping of the right ventricular endocardial surface. Preparations were loaded with the voltage-sensitive dye Di-4-ANBDQBS that was excited by illumination of the endocardial surface using monochromatic LEDs at 627 nm (Cairn Research Ltd, Kent, UK). Optical images (100x100 pixels) of signals passed through a 715nm long-pass filter were acquired using a Micam Ultima CMOS camera (SciMedia USA Ltd, CA, USA) at 2 kHz with a spatial resolution of 0.7x0.7 mm. Optical signals were filtered using a low-pass frequency filter at 120 Hz followed by spatial averaging (kernel 2.1 mm) and temporal averaging (kernel 1.5 ms).

Pseudo-ECG recordings across tissue preparations were recorded throughout experiments. In addition, to record activity along the moderator band and septum, unipolar electrograms were recorded from 5 locations simultaneously: 1) septum, close to the MB attachment; 2) proximal (septal) end of the MB; 3) mid-MB; 4) distal (RV) end of the MB and 5) the antero-lateral papillary muscle. A reference electrode was positioned far from recording electrodes. All electrical recordings were acquired at 10 kHz and signals were treated by a forward-backward Butterworth filter with a 120 Hz low-pass cut-off.

Pacing protocols

Two stimuli locations were used: endocardial surface of the RV mid-wall and the MB at approximately half of its length from the septum. Measurements of activation latency at varying

stimulation currents were recorded at a basic cycle length of 2 Hz from the stimulation threshold. S1S2 pacing was assessed for each pacing site, and a combined S1RV-S2MB protocol at twice the stimulation threshold. The stimulation sequence consisted of a train of 15 S1 stimuli at a basic cycle length of 2 Hz followed by S2. The S1S2 coupling interval was augmented until capture of an S2 beat to identify the effective refractory period (ERP). Coupling intervals were adjusted incrementally from the ERP six times by 5 ms, two times by 10 ms, two times by 25 ms and two increments of 50 ms.

Analyses and statistics

Optical activation time (AT) was the time of the maximal derivative of the fluorescent signal. RT (RT) was taken from a fixed level of 80% of repolarization. AT and RT of unipolar signals were the time of the minimum and maximum derivatives, respectively. VT involving the MB was defined as 3 or more re-entry cycles with uni-directional propagation along the MB with activation of the RV free wall originating from the insertion of the MB. The incidence of VT was determined from the frequency of occurrences throughout the S1S2 pacing protocol. Statistical differences were assessed by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test and defined by $P < 0.05$.

Ionic models

Membrane electrical activity (I_m) for myocardium was based on the Mahajan-Shiferaw cell model¹ and the Aslanidi rabbit Purkinje cell model². This ionic model is well suited for the study of arrhythmias and arrhythmia therapy³. The supplement details the changes and lists modifications for each model parameter (supplement table 2) that were applied to adjust for modeling the effective heart size (I) of sheep within the rabbit ventricular geometry for better correspondence with experiments⁴. Here, we scale the wavelength of reentry in the sheep heart to the model, preserving the patterns of ventricular fibrillation in the smaller heart geometry⁴. Parameters for calculating the effective heart size are listed in supplement table 3. I is defined as:

$$I = Fm^{1/3} \quad (1)$$

Here, F is the maximum dominant frequency (Hz) and m is heart mass (g). For sheep, we obtain $I=51.8$ by applying $F=10.1$ Hz during ventricular fibrillation⁵ and $m=0.0006 \cdot M$ as suggested by Panfilov. 2006, where $M=22,500\text{g}$ ⁵. In rabbit, I is 64% of that of sheep ($I=33.2$)⁴. Using the dimensionless parameter, $I/CV \times APD$, where CV is conduction velocity, we adjust APD by same ratio as I to obtain a model that preserves the frequencies achievable in the rabbit geometry as observed in sheep. Peak current conductance of Ca, ($G_{Ca,L}$) and K, (G_{Kr}) channels in the ionic models were changed to conserve APD. To define a heterogeneous model to reproduce experimental observations, APD were further decreased by 21% in MB nodes.

Cell models were subjected to 320 s of pacing at a basic cycle length of 320 ms for stabilization and the last AP was used for comparison. Initial states of ionic variables were captured 1 ms prior to stimulation of the last beat.

Ventricles and moderator band computer model

We used a realistic 3D rabbit ventricle finite element mesh with anisotropic fibers and Purkinje system that we have previously developed⁶. The model contained >3,000,000 tetrahedral elements with edge lengths on the order of 300 μm (supplemental figure 3A). A MB was manually added to the geometry (supplemental figure 3B). MB computational elements merged with the myocardial elements, thus making the MB electrically continuous with the adjoining myocardium. An additional branch of the Purkinje system was inserted that extended from the His bundle and followed the central axis of the MB to form junctions at the mid RV free wall with four intramural terminal points. PMJs were absent along the MB. To mimic experimental preparations, clipped wedge geometry was also used to compare with whole heart simulations (supplemental figures 3C and 3D).

We used the well-validated Purkinje-myocyte model developed by our team^{6,7}. Electrical activity was solved with the CARP simulator⁸ using the monodomain approach⁹ with nominal extracellular conductivity values of 0.625, 0.236 and 0.236 S/m in the longitudinal (σ_L), transverse (σ_T) and transmural (σ_S) directions, corresponding to a conductivity anisotropy ratio of 1:0.37:0.37. The

corresponding intracellular conductivities were 0.174, 0.019 and 0.019 S/m, respectively¹⁰. Myocardium and Purkinje fibers were pre-conditioned by states of ionic variables captured from single cell pacing during 100 beats stimuli at a basic cycle length of 320ms, determined by $I \times BCL_{expt}$ where BCL_{expt} is the basic cycle length of S1 pulses in experiments.

In silico reentry study

An S1S2 stimulus protocol was applied in the model by point stimulation of S1 pulses followed by a single S2 test pulse. S1S2 coupling intervals ranging from 100 ms were tested. Simulations were repeated while incrementing S1S2 coupling intervals by 1 ms for each iteration until a maximum of 180 ms. Re-entry was confirmed if nodes in the muscular compartment at the midpoint of the MB depolarized above a threshold of -30 mV three or more times following S2 stimuli.

Results

Simulations of S1S2RV, S1S2MB and S1RV-S2MB pacing protocols are shown in supplemental video 4-6, respectively. In each case, VT could be induced in homogeneous and heterogeneous models (supplemental figure 4A-B), but windows of vulnerability for VT were increased in the heterogeneous model. Furthermore, the direction of the reentrant circuit was reversed for S1S2RV pacing as a result of reversal of the activation and repolarization sequences of the S2 beat relative to S1S2MB and S1RV-S2MB simulations. A further model was implemented whereby the Purkinje network omitted (supplemental figure 4C and supplemental video 7). In this case, neither S1S2RV nor S1S2MB could induce VT, indicating a predominant role of Purkinje in the induction of the VT as opposed to the muscular compartment of the MB. However, inducibility of sustained stable reentrant arrhythmias was unchanged in S1RV-S2MB simulations. To examine the impact of the wedge preparation in experiments, the whole ventricle mesh was clipped to a geometry corresponding closely to experiments and zero-boundary conditions applied to clipped surfaces. In a model with homogeneous ionic properties, windows of vulnerability for each pacing protocol were largely unchanged, particularly for S1RV-S2MB pacing (supplemental figure 4D and supplemental video 8).

Tables

Table 1. Human donor information

Sex	Age	Cause of death	Pharmacological treatments	Prior CV dysfunction	Comments
M	76	Stroke	Alteis, pariet, motilium, azilect, feldene, urorex	None	Non-transplantation due to age
F	83	Stroke	Xeralto, vastarel, temerit	Atrial fibrillation	Non-transplantation due to age

Table 2. Parameter modifications for each ionic model

Parameter	Myocardium	Moderator band	Purkinje
gCa	x0.9	x0.7	
gKr	x5.0	x6.0	x5.0
gCaB			x0.9

Modifications were applied to the Mahajan-Shiferaw model for myocardium and muscular compartment of the moderator band and to the Aslanidi rabbit cell ionic model for Purkinje fibers.

Table 3. Estimating effective heart size in tourus models

Parameter	Model #1	Model #2	Model #3
APD ₈₀	150	150	90
Travel length (mm)	62.83	31.4	31.4
S1S2 dissociation (mm)	15.7	7.9	7.9
S1S2 vulnerability window for re-entry (ms)	201-205	190-196	141-149
Frequency of re-entry (Hz)	4.7	8.7	7.1
Conduction velocity (cm.s ⁻¹)	0.29	0.27	0.22
Equivalent travel length ratio	1.42	0.78	1.59

Establishing reentry in 2-dimensional tourus geometries initiated by S1S2 stimulation was assessed for two different circumferences that mimic the short axis circumference and electrophysiological properties of sheep (model #1) and rabbit (model #2) hearts. The equivalent travel length ($\lambda/APD \times CV$) of model #1 was recovered in the smaller geometry by decreasing APD to 60%.

Figure legends

Supplemental figure 1. Novel intact MB preparation. Endocardial view of a dual-coronary perfused ventricular wedge preparation of the anterior heart. Electrode impalements are: a) Septum; b) proxMB; c,d) bipolar stimulation of MB; e) midMB; f) distMB; g) papillary; h,i) RV endocardial bipolar stimulation.

Supplemental figure 2. Composition of the moderator band. Transverse cross-sections of moderator bands were stained for myocardial and Purkinje cells, collagen and nuclei for two different moderator bands (A & B). Panels from left to right are: complete moderator band cross-sections; myocardial compartments; Purkinje compartments and frequency distributions of pixel intensity for myocardial and Purkinje compartments.

Supplemental figure 3. Three-dimensional rabbit ventricular meshes. Myocardial mesh (A) complete with Purkinje system and moderator band (B) were used for the in silico study. Simulations were implemented in whole ventricles (C) and compared to wedge preparations (D) equivalent to experiments.

Supplemental figure 4. Windows of vulnerability for reentry in simulations. The windows of vulnerability for each stimulus configuration are shown for: A) a homogeneous whole heart model; B) wedge preparation; C) a heterogeneous model with reduced APD in the MB and D) a heterogeneous model in the absence of a Purkinje system.

Video legends

Supplemental video 1. S1-sinus rhythm S2-MB pacing in a homogeneous whole ventricular model. The clipped plane was for visualization of the ventricular cavities only. S1S2 coupling interval = 133 ms.

Supplemental video 2. Macroreentrant VT induced by S1-sinus rhythm S2-MB pacing in a heterogeneous whole ventricular model. S1S2 coupling interval = 122 ms.

Supplemental video 3. Macroreentrant VT in a heterogeneous model is dependent upon the MB. S1-sinus rhythm S2-MB pacing in a heterogeneous whole ventricular model inducing VT was blocked by applying $GNa=0.0$ of the myocardial compartment of the MB during VT ($t=300ms$). S1S2 coupling interval = 122 ms.

Supplemental video 4. Macroreentrant VT induced by S1S2-RV pacing in a heterogeneous whole ventricular model. S1S2 coupling interval = 133 ms.

Supplemental video 5. Macroreentrant VT induced by S1S2-MB pacing in a heterogeneous whole ventricular model. S1S2 coupling interval = 133 ms.

Supplemental video 6. Macroreentrant VT induced by S1-RV S2-MB pacing in a heterogeneous whole ventricular model. S1S2 coupling interval = 133 ms.

Supplemental video 7. Macroreentrant VT induced by S1-RV S2-MB pacing in a heterogeneous whole ventricular model in the absence of a Purkinje network. S1S2 coupling interval = 133 ms.

Supplemental video 8. Macroreentrant VT induced by S1-RV S2-MB pacing in a heterogeneous ventricular wedge model. Clipped planes are real geometry boundaries. S1S2 coupling interval = 133 ms.

References

1. Mahajan A, Shiferaw Y, Sato D, Baher A, Olcese R, Xie LH, Yang MJ, Chen PS, Restrepo JG, Karma A, Garfinkel A, Qu Z, Weiss JN. A rabbit ventricular action potential model replicating cardiac dynamics at rapid heart rates. *Biophysical journal* 2008;94(2):392-410.
2. Aslanidi OV, Stewart P, Boyett MR, Zhang H. Optimal velocity and safety of discontinuous conduction through the heterogeneous Purkinje-ventricular junction. *Biophysical journal* 2009;97(1):20-39.
3. Vadakkumpadan F, Rantner LJ, Tice B, Boyle P, Prassl AJ, Vigmond E, Plank G, Trayanova N. Image-based models of cardiac structure with applications in arrhythmia and defibrillation studies. *Journal of electrocardiology* 2009;42(2):157 e1-10.
4. Panfilov AV. Is heart size a factor in ventricular fibrillation? Or how close are rabbit and human hearts? *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2006;3(7):862-4.
5. Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E, Mironov S, Guha P, Jalife J. Effect of remodelling, stretch and ischaemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovascular research* 2005;65(1):158-66.
6. Vigmond EJ, Clements C. Construction of a computer model to investigate sawtooth effects in the Purkinje system. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2007;54(3):389-99.
7. Boyle PM, Deo M, Plank G, Vigmond EJ. Purkinje-mediated effects in the response of quiescent ventricles to defibrillation shocks. *Annals of biomedical engineering* 2010;38(2):456-68.
8. Vigmond EJ, Hughes M, Plank G, Leon LJ. Computational tools for modeling electrical activity in cardiac tissue. *Journal of electrocardiology* 2003;36 Suppl:69-74.
9. Vigmond EJ, Aguel F, Trayanova NA. Computational techniques for solving the bidomain equations in three dimensions. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2002;49(11):1260-9.
10. Clerc L. Directional differences of impulse spread in trabecular muscle from mammalian heart. *The Journal of physiology* 1976;255(2):335-46.

Figures

Figure 1

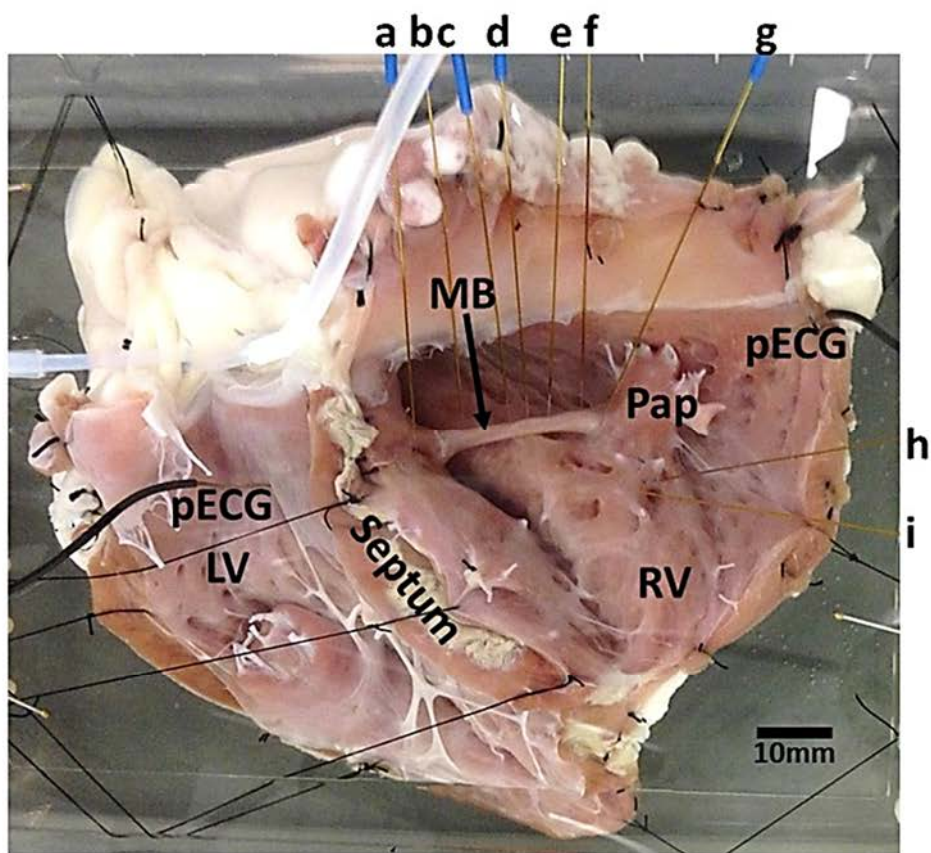


Figure 2

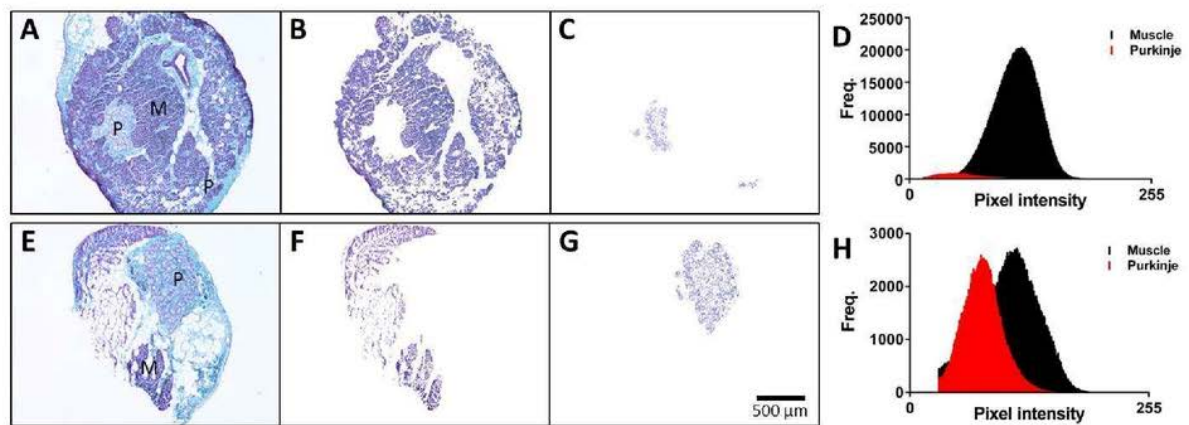


Figure 3

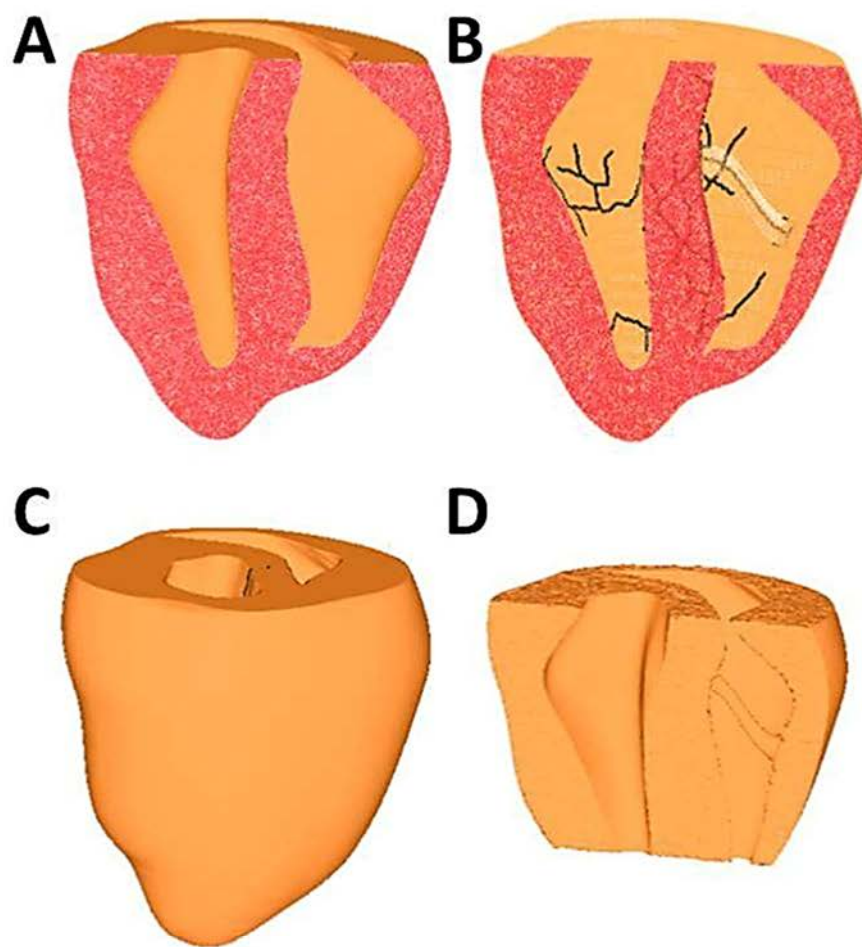


Figure 4

