

Molecular mechanisms underlying atrial remodeling.

By

Sophie Cardin

Department of Pharmacology and Therapeutics

Faculty of Medicine

McGill University

McIntyre Medical Building

3655 Sir William Osler Promenade

Montreal, Quebec, Canada H3G 1Y6

© Sophie Cardin, February 2010

Molecular mechanisms underlying atrial remodeling.

By

Sophie Cardin

A thesis submitted to McGill University in partial fulfillment
of the requirements of the degree of

Doctor of Philosophy

Permission has been granted to McGill University to make this thesis available to readers in the McGill University Library or other libraries, to the National Library of Canada, to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats, and University Microfilms to publish an abstract of this thesis.

The author reserve other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed otherwise reproduced without the author's written permission.

Contribution of authors

In accordance with the Faculty Graduate and Post-Doctoral Studies, the candidate selected the option of producing a thesis including, as part of the thesis, the text of one or more papers submitted, for publication, or the clearly-duplicated text of one or more published papers. In the case of manuscripts co-authored by the candidate and others, the candidate is required to make explicit statements to who contributes to such a work and to which extent.

The thesis is composed of the following 2 published and 1 submitted papers, and one work in progress. Each paper is co-authored by the candidate and others, as listed above:

Paper 1 (Chapter 3)

Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, Léger J, Demolombe S, Ponton A, Glass L, Nattel S. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. *Circ Res.* 2007 Feb 16; 100(3): 425-33. Epub 2007 Jan 18.

The candidate generated the idea with the help of the supervisor (Stanley Nattel) and designed the protocol with advice from André Ponton regarding the technical aspects of gene-chip analysis. The candidate performed the in vivo experiments, the cell isolations, the RNA and protein extraction and quantification. The candidate performed Real-Time PCR experiments with Sabrina Le Bouter and Western Blot experiments with Patricia Pelletier. The candidate participated in group discussion with Eric Libby, Leon Glass and Stanley Nattel on the cDNA microarray data analysis. Eric Libby performed the bioinformatics. The candidate participated in figure creation and wrote the first draft of the manuscript.

Paper 2 (Chapter 4)

Cardin S, Pelletier P, Libby E, Le Bouter S, Xiao L, Kääh S, Demolombe S, Glass L, Nattel S. Marked differences between atrial and ventricular gene-

expression remodeling in dogs with experimental heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2008 Dec;45(6)821-31. Epub 2008 Aug 30.

The candidate generated the idea with the help of the supervisor (Stanley Nattel) and designed the protocol with advice from André Ponton regarding the technical aspects of gene-chip analysis. The candidate performed the in vivo experiments, the cell isolations, the RNA and protein extraction and quantification. The candidate performed Real-Time PCR experiments with Sabrina Le Bouter and Western Blot experiments with Patricia Pelletier. The candidate participated in group discussion with Eric Libby, Leon Glass and Stanley Nattel on the cDNA microarray data analysis. Eric Libby performed the bioinformatics. The candidate performed the pathway analysis and built up the gene network maps. The candidate participated in figure creation and manuscript writing.

Paper 3 (Chapter 5)

De Souza A*, **Cardin S***, Wait R, Chung YL, Vijayakumar M, Camm JA, Nattel S. Proteomic and metabolomic analysis of atrial profibrillatory remodeling in congestive heart failure. [JMCC, In Revision]

Along with the first author Ayesha De Souza, the candidate generated the idea and designed the protocol (objectives, groups, methods) with the help of the supervisor (Stanley Nattel). The candidate performed all in vivo experiments (dog surgeries, hemodynamic measurements, electrophysiological measurements) and the cell isolation and purification for proteomic experiments. The candidate designed and executed the specific immediate-freezing methods for tissue collection on beating dog hearts for metabolomic experiments. The candidate participated in figure creation and manuscript writing.

Paper 4 (Chapter 6)

Cardin S, Luo X, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure: could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention? (in progress)

The candidate generated the idea and designed the protocol (objectives, groups, methods) with the help of the supervisor (Stanley Nattel). The candidate developed the rat infarct-CHF model, performed animal surgeries, treatments and hemodynamic measurements. Based on the results of MAP-kinase analyses, the candidate developed the specific hypothesis regarding the role of miR-21 for testing. The candidate designed the approach for miR-21 knockdown and for assessing the dosing regimen to be used in the knockdown studies, as well as the measures of efficacy. The candidate performed electrophysiological measurements with the help of Khai Le Quang using the software designed by Philippe Comtois. The candidate assisted YanFen Shi in echocardiography measurements. The candidate performed Western blot experiments and assisted Xiaobin Luo in Real-Time PCR experiments. The candidate created all the figures and wrote the major part of the manuscript.

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

La fibrillation auriculaire est l'arythmie supra-ventriculaire soutenue la plus commune et associée à un taux élevé de morbidité et de mortalité. Plusieurs pathologies, telles que les valvulopathies, les cardiomyopathies, l'hypertension et le diabète augmentent le risque de développer une fibrillation auriculaire. Pourtant, les traitements pharmacologique actuels demeurent inefficaces et entraînent parfois même une augmentation du risque d'arythmies ventriculaires. Les études effectuées sur différents modèles animaux ont démontré que la fibrillation auriculaire était associée à un remodelage auriculaire qui favorisait son induction et son incidence. Il semblerait cependant que les mécanismes de remodelage auriculaire diffèrent selon la pathologie sous-jacente. En effet, le remodelage auriculaire induit par une tachycardie auriculaire ou une fibrillation auriculaire serait principalement électrique, associé à l'altération de l'expression et de la fonction de canaux ioniques. Ces changements se reflèteraient au niveau électrophysiologique par un raccourcissement des périodes réfractaires, une diminution d'adaptation au rythme et un ralentissement de la vitesse de conduction. Mis ensemble, ces changements augmenteraient l'incidence de la fibrillation auriculaire. L'insuffisance cardiaque, une cause importante de la fibrillation auriculaire, induirait un remodelage auriculaire de nature différente. Ce remodelage serait principalement caractérisé par une hétérogénéité de conduction associée à une altération des propriétés structurelles de l'oreillette. Notamment, la fibrose interstitielle jouerait un rôle majeur dans la stabilisation de circuits de réentrée et la prolongation de la durée de la fibrillation auriculaire.

Bien que plusieurs études aient décrit un grand nombre de changements associés à chacun de ces types de remodelage, les mécanismes qui sous-tendent ces changements demeurent mal connus. Dans notre première étude, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le remodelage auriculaire induit par la tachycardie auriculaire et celui induit par une défaillance cardiaque

diffèreraient au point de vue de l'évolution temporelle et de la nature des changements au niveau génomique. Nous avons constaté que les changements d'expression génique induits par la tachycardie auriculaire et par la tachycardie ventriculaire étaient qualitativement différents et évoluaient de façon différente dans le temps.

Comparativement aux changements survenant au niveau auriculaire, les changements ventriculaires observés au point de vue biochimique et histopathologique différaient en terme d'intensité et de progression temporelle. Dans notre deuxième étude, nous avons émis l'hypothèse que l'insuffisance cardiaque induite par une tachycardie soutenue (la « tachycardiomyopathie » entraînait des changements d'expression génique qui diffèreraient entre les oreillettes et les ventricules et ces changements seraient évolutifs avec la progression de la pathologie. Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'implication des voies de signalisations telles que la voie des MAP kinases, l'apoptose et le système ubiquitine/protéosome au niveau auriculaire et certaines voies métaboliques (système de transport d'électron, cycle de Krebs) au niveau ventriculaire.

Bien que l'étude à large spectre des changements d'expression génique nous permette de mettre en évidence certaines voies de signalisation, les changements survenant au niveau post-transcriptionnel ne sont pas toujours détectables par une approche génomique. Dans notre troisième étude, nous avons donc émis l'hypothèse que l'insuffisance cardiaque induite par une tachycardie ventriculaire soutenue entraînait un remodelage auriculaire qui impliquerait des changements évolutifs importants d'expression de protéines de différents groupes fonctionnels, modulant la physiopathologie sous-jacente. Nos résultats ont montré principalement un changement au niveau de protéines liées au stress oxydatif, au métabolisme et aux protéines contractiles.

Dans notre dernière étude, nous avons décidé d'explorer une nouvelle avenue thérapeutique dans le traitement préventif de la fibrillation auriculaire. Nous avons donc suggéré que la fibrose interstitielle pourrait être prévenue par la modulation de mécanismes de régulation de l'expression de gènes par des

microARN, permettant ainsi de réduire l'inductibilité et le maintien de FA en contexte d'insuffisance cardiaque. Notre étude n'est pas complétée mais les résultats préliminaires suggèrent un effet bénéfique du traitement anti-miR21 pour réduire la fibrillation auriculaire.

GENERAL SUMMARY

Atrial fibrillation (AF) is the most sustained arrhythmia in the population and is associated with increased morbidity and mortality. A variety of cardiac disease entities, including valve disease, cardiomyopathies, hypertension and diabetes increase the risk of AF. However, present drug therapies are ineffective and can even increase the risk of dangerous ventricular tachyarrhythmias. Studies in animal models show that AF is associated with atrial remodeling that favors AF induction and maintenance. The mechanisms of atrial remodeling depend on the underlying pathology. Atrial remodeling caused by atrial tachycardia or AF itself is primarily electrical, associated with changes in the expression and function of ion channels. These changes are reflected in decreased atrial refractory periods, impaired refractoriness adaptation to rate and conduction slowing. Together, these electrical changes increase the incidence of AF. Heart failure (HF), an important cause of AF, induces another type of atrial remodeling. HF-remodeling is characterized by conduction heterogeneity and altered atrial structural properties. In particular, interstitial fibrosis plays a major role in the stabilization of reentry circuits and prolongation of AF duration.

Although many studies have described a large number of the changes associated with each form of remodeling, the underlying mechanisms remain poorly understood. The goal of this thesis was to clarify the molecular mechanisms underlying the atrial remodeling associated with AF. In my first study, I put forward the hypothesis that atrial remodeling caused by atrial tachycardia and that resulting from HF differ in terms of the time course and nature of underlying changes in cardiac gene expression. I indeed discovered that the changes in gene expression induced by atrial tachycardia and HF were qualitatively different and evolved differently over time. The changes by atrial tachycardia were limited and showed time-dependent adaptation, whereas the changes induced by HF were qualitatively greater and more varied, and showed qualitative evolution with the development of the pathology.

In my second study, I put forward the hypothesis that HF caused by ventricular “tachycardiomyopathy” causes differential gene-expression changes in atria versus ventricles and that these changes evolve over time. This study highlighted the signaling pathways implicated in atrial remodeling like those of MAP kinases, ubiquitin/proteasome systems and apoptosis, along with specific metabolic pathways like the electron-chain transport system and Krebs cycle at the ventricular level.

Even though the large-scale study of gene-expression changes allowed us to identify certain signaling systems, they do not detect post-translational alterations. In our third study, I put forward the hypothesis that tachycardia-induced HF causes progressive changes in the proteins involved in different functional groups that play an important role in atrial pathophysiology. My results highlighted proteins linked to oxidative stress, metabolism and contractile proteins.

In my final study, I decided to explore a new therapeutic avenue for AF prevention based on the molecular pathophysiology of AF. I had identified the MAP kinase ERK as a particularly important molecule in atrial remodeling caused by myocardial infarction in the rat and I had obtained results implicating a microRNA (miR21) in signaling leading to pathological ERK hyperphosphorylation. I therefore suggested that atrial interstitial fibrosis could be prevented by targeting underlying microRNA-related mechanisms and thereby reduce the inducibility and maintenance of AF caused by HF. My study is not yet completed but the preliminary results suggest beneficial effects of anti-miR21 treatment in preventing AF.

In conclusion, my studies indicate the molecular pathophysiology underlying AF and suggest that it can be exploited to develop new therapeutic approaches.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ GÉNÉRAL	i
GENERAL SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xix
REMERCIEMENTS	xxviii
DÉDICACES	xxx

Chapître 1. Introduction **p.1**

Section 1.1. Le cœur : description anatomique et fonctions physiologiques.

1.1.1 Généralités.....	p.1
1.1.2 Le système de conduction.....	p.3
1.1.2.1 Le système cardionecteur	p.3
1.1.2.2 L'électrocardiogramme	p.6
1.1.2.3 Le potentiel d'action	p.6
1.1.2.4 Les jonctions intercellulaires	p.11
1.1.3 Le système de contraction.....	p.12
1.1.3.1 Description anatomique macroscopique	p.12
1.1.3.2 Circulation intra-cardiaque	p.14
1.1.3.3 Description anatomique microscopique	p.15

1.1.4 Couplage des systèmes de conduction et de contraction.	p.18
--	-------------

Section 1.2. La fibrillation auriculaire.

1.2.1 Historique.	p.19
1.2.2 Nosologie.	p.21
1.2.3 Épidémiologie.	p.22
1.2.4 Sémiologie.	p.23
1.2.5 Mécanismes.	p.23

1.2.5.1 Mécanismes de base des arythmies.	p.23
1.2.5.1.1 <i>Automaticité anormale.</i>	p.25
1.2.5.1.2 <i>Propagation anormale/Réentrée.</i>	p.26
1.2.5.2 Mécanismes de la fibrillation auriculaire.	p.27

1.2.6 Remodelage auriculaire.	p.30
---	-------------

1.2.6.1 Le remodelage auriculaire induit par tachycardie auriculaire ou fibrillation auriculaire.	p.30
1.2.6.1.1 <i>Altérations des propriétés électrophysiologiques.</i>	p.30
1.2.6.1.2 <i>Altérations structurelles et ultra-structurelles.</i>	p.32
1.2.6.1.3 <i>Altérations morphologiques et fonctionnelles.</i>	p.32

1.2.6.2 Le remodelage auriculaire induit par l'insuffisance cardiaque.	p.33
1.2.6.2.1 <i>Altérations électrophysiologiques.</i>	p.33
1.2.6.2.2 <i>Altérations des voies de signalisation.</i>	p.34
1.2.6.2.3 <i>Altérations structurelles.</i>	p.35
1.2.6.2.4 <i>Altérations morphologiques et fonctionnelles.</i>	p.36

1.2.6.3 Les modèles canins de remodelage auriculaire.	p.37
---	------

1.2.7 Le traitement de la fibrillation auriculaire.....	p.39
1.2.7.1 Le contrôle de la fréquence cardiaque.	p.39
1.2.7.1.1 <i>Contrôle de la fréquence cardiaque : approches pharmacologiques.</i>	p.40
1.2.7.1.2 <i>Contrôle de la fréquence cardiaque : approches non-pharmacologiques.</i>	p.40
1.2.7.2 Cardioversion et maintien du rythme sinusal.	p.41
1.2.7.2.1 <i>La conversion d'une FA au rythme sinusal.</i>	p.41
1.2.7.2.2 <i>Le maintien du rythme sinusal.</i>	p.42
1.2.7.3 Autres avenues pharmacologiques.	p.43
1.2.7.4 Traitement anti-thrombotique.	p.45

Section 1.3. L'insuffisance cardiaque.

1.3.1 Définition.	p.46
1.3.2 Désordres hémodynamiques.....	p.46
1.3.3 Changements structurels cardiaques.....	p.47
1.3.3.1 L'hypertrophie	p.47
1.3.3.2 La fibrose interstitielle	p.49
1.3.3.2.1 <i>Effet de la fibrose sur la fonction cardiaque.</i>	p.49
1.3.3.2.2 <i>Les fibroblastes et la fibrose.</i>	p.49
1.3.3.2.3 <i>Les peptides vasoactifs et la fibrose.</i>	p.51
1.3.3.2.4 <i>TGFβ et la fibrose.</i>	p.52
1.3.3.2.5 <i>CTGF et TGFβ.</i>	p.53
1.3.3.3 L'activation de la voie de signalisation MAP Kinase.	p.53
1.3.3.4 La mort cellulaire	p.58
1.3.4 Désordre métabolique.....	p.61

Section 1.4. Les microRNAs.

1.4.1 Découverte.....	p.61
1.4.2 Définition.....	p.63
1.4.3 Biosynthèse.....	p.64
1.4.4 Mécanismes d'action.....	p.65
1.4.5 Fonctions physiologiques.....	p.66
1.4.6 Rôles dans la fonction cardiaque.....	p.68
1.4.7 Mécanismes de régulation par miR-21.....	p.70
1.4.8 Rôle physiologique de Sprouty.....	p.72

Chapître 2. Problématique et Hypothèses p.74

Section 2.1 Problématique.....	p.75
--------------------------------	------

Section 2.2 Hypothèses.....	p.76
-----------------------------	------

Chapître 3. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. p.78

Chapître 4. Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure. p.109

Chapître 5. Proteomic and metabolomic analysis of atrial profibrillatory remodeling in congestive heart failure. p.150

Chapître 6. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure: could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention?	p.194
Chapître 7. Discussion	p.227
Section 7.1 Sommaire des éléments nouveaux apportés par les travaux inclus dans cette thèse.	p.228
Section 7.2 Signification des résultats et contributions aux connaissances scientifiques.	p.230
7.2.1 Mécanismes de remodelage auriculaire induits par tachycardie auriculaire.....	p.231
7.2.2 Mécanismes de remodelage auriculaire induits par « tachycardiomyopathie ».....	p.234
7.2.2.1 Le CTGF et la fibrose interstitielle.	p.235
7.2.2.2 La voie de l'apoptose.	p.236
7.2.2.3 Le système ubiquitine/protéasome.	p.237
7.2.2.4 La voie des MAP kinases.	p.238
7.2.2.5 Les fonctions métaboliques.	p.238
7.2.2.6 Le stress oxydatif.	p.239
7.2.3 Mécanismes de remodelage ventriculaire induits par l'insuffisance cardiaque.	p.241
7.2.4 La dédifférentiation cellulaire.....	p.241
7.2.5 miR21 comme régulateur du remodelage auriculaire.	p.242
7.2.6 La fibrose interstitielle comme cible thérapeutique.	p.243

Section 7.3 Expériences futures proposées.	p.246
7.3.1 Étude du phénomène d'adaptation au stress dans le remodelage auriculaire induit par tachycardie auriculaire.....	p.246
7.3.2 Étude avancée de CTGF comme cible thérapeutique dans la prévention de la fibrose et la fibrillation auriculaire.	p.248
Section 7.4 Conclusions.	p.250

LISTE DES FIGURES

Chapître 1. Introduction

Figure 1. Électrocardiogramme.	5
Figure 2. Phases du potentiel d'action.	7
Figure 3. Distribution des potentiels d'action dans le cœur.	9
Figure 4. Mécanismes de base des arythmies.	24
Figure 5. Mécanismes de fibrillation auriculaire.	29
Figure 6. Modèles canins de remodelage auriculaire.	38
Figure 7. Voie de signalisation des MAP kinases.	55
Figure 8. Voie MEKK/MEK/ERK ½.	57
Figure 9. Mort cellulaire par apoptose.	60

Chapître 3. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation.

Figure 1. Overall changes in mRNA expression compared to sham in 24-hour ATP, 1-week ATP, 24-hour VTP and 2-week VTP samples.	103
Figure 2. Overall mRNA expression comparisons between 1-week ATP versus VTP-sham, ATP-sham versus VTP-sham.	104
Figure 3. Number of transcript probe-sets in each functional group which was significantly down- or up-regulated by atrial-tachycardia remodeling or ventricular-tachycardia remodeling.	105
Figure 4. Cumulative fraction of ranks for each of the functional gene groups in VTP- dogs.	106

Figure 5. Correlation between expression changes by real-time PCR versus microarray. 107

Figure 6. Examples of Western blots for 9 proteins studied to compare protein versus mRNA expression changes. 108

*On-line figure 1. Cumulative fraction of ranks for each of the functional gene groups in ATP dogs.

*On-line figure 2. Proteins with differential mRNA expression in VTP dogs, that interact with TGF β or a TGF β -interacting protein, based on the Human Protein Reference Database.

[*http://circres.ahajournals.org/cgi/data/01.RES.0000258428.09589.1a/DC1/1](http://circres.ahajournals.org/cgi/data/01.RES.0000258428.09589.1a/DC1/1)

Chapître 4. Marked differences atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.

Figure 1. Overall mRNA expression-changes compared to sham at 24-hour VTP in LA and LV, and at 2-week VTP in LA and LV samples. 144

Figure 2. Total number of genes of each functional group for which mRNA expression was significantly changed. 145

Figure 3. Changes in mRNA expression in LA compared to LV in shams, 24-hour VTP and 2-week VTP samples. 146

Figure 4. Total number of genes of each functional group for which levels were significantly different in LA versus LV in shams, 24-hour VTP or 2-week VTP. 147

Figure 5. Correlation between expression changes by real-time PCR versus microarray for each sample, for each 18 genes. 148

Figure 6. Examples of Western blots for 8 proteins studied to compare protein versus mRNA expression changes, along with an immunoblot for internal control.

149

*On-line Fig. 1. Analysis of mitogen-activated protein-kinase related pathways.

*On-line Fig. 2. Analysis of apoptosis related pathways.

*On-line Fig. 3. Analysis of ubiquitin/proteasome related pathways.

*On-line Fig. 4. Analysis of Krebs cycle pathway.

*On-line Fig. 5. Analysis of electron transport chain pathways.

*On-line Fig. 6. Analysis of glycolytic pathways.

*http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK64TB77HR1&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=398799dd1f2b016f4b1a64bc8ee574e5&searchtype=a

Chapître 5. Proteomic and metabolomic analysis of atrial profibrillatory remodeling in congestive heart failure.

Figure 1. Changes in hemodynamic and electrophysiological parameters in sham, 24-hour and 2-week VTP. 185

Figure 2. Differential In-Gel Electrophoresis. 186

Figure 3. Differentially-expressed proteins separated on pH 4-7 L IGP strips followed by 12% SDS polyacrylamide gel with DIGE technology. 187

Figure 4. Differential heat-shock protein (HSP)-expression following 24-hour and 2-week VTP. 188

Figure 5. Antioxidant expression following 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams.	189
Figure 6. Structural protein changes following 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams.	190
Figure 7. Metabolic enzymes expression-changes following 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams.	191
Figure 8. Contractile protein changes at 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams.	192
Figure 9. Metabolites changes at 24-hour and 2-week VTP.	193

*[On-line Fig. 1.](#) 2-D PAGE map of differentially expressed canine left-atrial cardiomyocyte proteins at 24-h VTP.

*[On-line Fig. 2.](#) 2-D PAGE map of differentially expressed canine left-atrial cardiomyocyte proteins a 2-week VTP.

*[On-line Fig. 3.](#) HSP27 phosphorylation analyses.

*[On-line Fig. 4.](#) NMR spectra of left-atrial metabolites, including representative spectra from sham and 2-week VTP dogs.

*[On-line Fig. 5.](#) Schematic showing protein and metabolite changes following 2-week VTP.

*http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK6-50KWG4X2&_user=789722&_coverDate=11%2F30%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C00043357&_version=1&_urlVersion=0&_userid=789722&md5=1cdb288214d9611242f9dc1cb0094bfe&searchtype=a#s0165

Chapître 6. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure : could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention?

Figure 1. Atrial fibrillation recording in an 8 week post-MI rat.	219
Figure 2. Histological analysis.	220
Figure 3. Expression level of proteins extracted from atria.	221
Figure 4. Example of original gels from 1-week post-surgery rats.	222
Figure 5. Expression of miR21 2-week post-MI.	223
Figure 6. Expression of sprouty1, collagen Ia and collagen IIIa at 2 weeks post-MI.	224
Figure 7. Preliminary expression data for miR21 in left atria from normal rats, 5 days after the injection of knock-down of miR21 probe or scrambled probe.	225
Figure 8. Preliminary expression data for miR21 in left atria, 2 weeks after injection of of knock-down of miR21 probe or scrambled probe, in sham and MI rats.	226

LISTE DES TABLEAUX

Chapître 3. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation.

Table 1. Hemodynamic and electrophysiological changes in first series of dogs. 100

Table 2. Hemodynamic and electrophysiological changes in second series of dogs. 101

*On-line Table 1: Antibodies for Western blot.

*On-line Table 2. Gene-specific primers and Taqman probe sequences used in Real-time RT-PCR analysis.

**Online Table 3. Detailed list of genes changed.

*On-line Table 4. Sum of ranks and distribution properties for Monte Carlo Analysis.

*Online Table 5. Comparison Between mRNA Expression by Microarray vs Real-time RT-PCR.

*Online Table 6. Comparison between microarray and western blot results.

*Online Table 7. Controls for Real time RT-PCR and Western Blot.

*<http://circres.ahajournals.org/cgi/data/01.RES.0000258428.09589.1a/DC1/1>

** <http://circres.ahajournals.org/cgi/data/01.RES.0000258428.09589.1a/DC3/1>

Chapître 4. Marked differences atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.

Table 1. Hemodynamic changes. 139

Table 2. Comparison between mRNA expression fold-changes by microarray versus TaqMan real-time RT-PCR. 140

Table 3. Comparison between microarray and western blot results (Fold-changes).	141
---	-----

*On-line Table 1. Gene-specific primers and Taqman-probe sequences used in real-time PCR analysis.

*On-line Table 2. List of antibodies.

*On-line Table 3. Details of modified genes.

*http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK64TB77HR1&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=398799dd1f2b016f4b1a64bc8ee574e5&searchtype=a

Chapître 5. Proteomic and metabolomic analysis of atrial profibrillatory remodeling in congestive heart failure.

*On-line Table 1. Protein Identifications by Tandem Mass Spectrometry.

*On-line Table 2. Differentially Expressed Protein Identifications.

*http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK6-50KWG4X2&_user=789722&_coverDate=11%2F30%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C00043357&_version=1&_urlVersion=0&_userid=789722&md5=1cdb288214d9611242f9dc1cb0094bfe&searchtype=a#s0165

Chapître 6. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure : could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention?

Table 1. Echocardiography recordings.	216
Table 2. Hemodynamic measurements.	217
Table 3. Electrophysiological parameters.	218

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -MHC	alpha myosin heavy chain
α -SMA	alpha smooth muscle actin
β -MHC	beta myosin heavy chain
ADN	acide désoxyribonucléique
Ago2	Argonaute 2
ANP	Atrial natriuretic peptide
APAF-1	apoptotic peptidase activating factor 1
A-Raf	raf kinase, effector of Ras isoform A
ARN	acide ribonucléique
ARNpi	acide ribonucléique piwi
ARNsi	acide ribonucléique short interfering
ATF1	activating transcription factor 1
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	Atrial tachypacing
A-V	Auriculo-ventriculaire
Bad	BH3 interacting domain death agonist
Bak	BCL2-antagonist/killer
Bax	BCL2-associated X protein

Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-xL	BCL2-like 1
Bcl-xS	BCL2-like 1
BMP7	Bone morphogenic protein 7
BNP	Brain natriuretic peptide
BPM	battement par minute
B-Raf	raf kinase, effector of Ras isoform B
CASP1	Caspase 1
CASP3	Caspase 3
CASP6	Caspase 6
CASP7	Caspase 7
CASP8	Caspase 8
CASP9	Caspase 9
CASP10	Caspase 10
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
CCN	cyr61/ctcg/nov protein
Cdc25A	cell division cycle 25 homolog A
Chop/Gadd153	DNA-damage-inducible transcript 3
cFos	FBJ osteosarcoma oncogene
cJun	jun proto-oncogene

c-maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
c-Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
CoA	Coenzyme A
CPT-1	Carnitine palmitoyl transferase 1
CK	Créatine kinase
CTGF	Connective tissue growth factor
Cx30,2	Connexine 30,2
Cx40	Connexine 40
Cx43	Connexine 43
Cx45	Connexine 45
dATP	desoxyadénosine triphosphate
DGC8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
EGF	Epidermal growth factor
ELK-1	ELK1, member of ETS oncogene family
ERK1	Extracellular signal-related kinase 1
ERK2	Extracellular signal-related kinase 2
ERP	Effective refractory period
FA	Fibrillation auriculaire
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAK	Focal Adhesion Kinase

FGF	Fibroblast growth factor
GDP	Guanosine diphosphate
GGA	Geranyl geranyl acetone
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GRP78	glucose-regulated protein 78kDa
GTPase	Guanosine triphosphatase
HSP27	Heat shock protein 27
HSP60	Heat shock protein 60
HSP70	Heat shock protein 70
HSP90	Heat shock protein 90
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IECA	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IKK	inhibitor of NF-kappaB kinases
IL-1	Interleukine 1
IL-4	Interleukine 4
IL-6	Interleukine 6
I _{Ca}	Courant calcique
I _f	Courant « <i>funny</i> »
I _K	Courant potassique

I_{K1}	Courant potassique à rectification retardée
I_{Kr}	Courant potassique à rectification retardée rapide
I_{Ks}	Courant potassique à rectification retardée lente
I_{Kur}	Courant potassique à rectification retardée ultra rapide
I_{Na}	Courant sodique
I_{ns-st}	Courant cationique non-sélectif
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
I_{ti}	Courant transitoire entrant
I_{to}	Courant transitoire sortant
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JNK1	c-Jun N-terminal kinase 1
JNK 2	c-Jun N-terminal kinase 2
JNK 3	c-Jun N-terminal kinase 3
LNA	locked nucleic acid
MAPKAP2/3	Mitogen activated protein kinase activated protein 2/3
MAPK1	Mitogen activated protein kinase 1
MAPK2	Mitogen activated protein kinase 2
MAPKK / MEK	Mitogen activated protein kinase kinase

MAPKKK / MEKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MAX	MYC associated factor X
MEF2A	myocyte enhancer factor 2A
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C
MEK-3	Mitogen activated protein kinase kinase-3
MEK-6	Mitogen activated protein kinase kinase-6
MHC	myosin heavy chain
miR1	microRNA-1
miR21	microRNA-21
miR122	microRNA-122
miR143	microRNA-143
miR150	microRNA-150
miR181	microRNA-181
miARN	microARN
MMP	Matrix metalloprotease
MMP-2	Matrix metalloprotease 2
MNK	MAPK interacting kinase
MRE	microRNA response element
MSK	mitogen and stress activated kinase
MyoD	myocardin D

NADPH oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NCX	Sodium calcium exchanger
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor kappa B
p38	Mitogen activated protein kinase of 38kDa
p42	MAP kinase 42kDa (ERK2)
p44	MAP kinase 44kDa (ERK1)
p53	p53 tumor suppressor homolog
PDCD4	programmed cell death 4
PGC-1	PPAR-γ coactivator-1
PI3-K	phosphoinositide 3-kinase
PLC _γ	Phospholipase C gamma
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
Pten	phosphatase and tensin homolog
Rac1	RAS-related C3 botulinum substrate 1
Raf	raf kinase, effector of Ras
Raf1	raf kinase, effector of Ras isoform 1
RhoGTPase	Rho-like guanosine triphosphatases
RISC	RNA-inducing silencing complex
RNase	Ribonucléase

ROS	Radical oxygen species
RTK	Receptor tyrosine kinase
RyR	Récepteur à la ryanodine
SAPK	Stress activated protein kinase
SERCA2a	sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a
Ser338	Serine 338
Ser339	Serine 339
SH2	Src-homology 2
SHC	SHC-adaptor protein
Shp2	Shatterproof 2 (protein binding / transcription factor)
SOD	Superoxide dismutase
SOS	son of sevenless
Spry	Sprouty
Spry1	Sprouty 1
Spry2	Sprouty 2
SR	Réticulum sarcoplasmique
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
SRF	Serum responsive factor

Stat3	signal transducer and activator of transcription-3
TA	Tachycardie auriculaire
TEM	Transformation endothéliale-mésenchymale
TGF β 1/ TGFbeta1	Transforming growth factor beta 1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteases
TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteases 2
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6
TUNEL	Terminal dUTP nicked-end labeling
TV	Tachycardie ventriculaire
Tyr 340	Tyrosine 340
Tyr341	Tyrosine 341
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein
VTP	Ventricular tachypacing

REMERCIEMENTS

Travailler dans le laboratoire du Dr. Stanley Nattel fut un privilège exceptionnel pour moi. L'équipe du Dr Nattel est extraordinaire, les techniciennes sont serviables et dévouées, les étudiants que j'y ai rencontrés étaient brillants, travaillant et remplis d'idées et les projets que j'ai effectués étaient très stimulants. Dr Nattel pousse ses étudiants à aller toujours plus loin, à utiliser les meilleures approches expérimentales pour confirmer leurs hypothèses, à se questionner sur leurs résultats et dans le doute, à les confirmer par de nouvelles expérimentations. Le niveau scientifique est très élevé et permet aux étudiants de suivre le courant des connaissances nouvellement acquises dans le domaine.

J'ai eu l'occasion au cours de mes années de travail de côtoyer un nombre incroyable de gens extraordinaire au sein du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. La présence de spécialistes tels que Louis Villeneuve et Marc-Antoine Gillis m'a permis d'effectuer mes travaux avec confiance, sachant qu'ils sont toujours intéressés à produire des résultats justes et précis. Ils sont de véritables artistes dans leur spécialité. La présence et l'aide de Robert Clément, un homme d'une bonté et d'une générosité exemplaire, m'a permis d'apprendre énormément sur le travail avec les petits animaux et m'a fait voir la chance que j'avais de travaillé avec des personnes aussi serviables et hyperqualifiées

Ma participation au comité de déontologie animale fut très stimulante et enrichissante et m'a permis d'apprécier l'importance de l'élaboration de protocoles clairs, avec de objectifs précis, et ce dans le respect de la condition de vie des animaux. L'ambiance de travaille y était agréable et propice à l'apprentissage.

J'aimerais remercier tout spécialement Nathalie L'Heureux, une technicienne exceptionnelle, généreuse et très dévouée à son travail. On ne rencontre pas tous les jours des gens aussi travaillant et qualifié. Elle est une grande richesse pour le laboratoire. J'aimerais aussi remercier Chantal St-Cyr, une technicienne structurée, qui maintien une bonne organisation dans le laboratoire. Elle aussi est très serviable et disposée à nous aider en tout temps. J'aimerais aussi remercier Roxanne Gallery, l'assistante administrative du Dr.Nattel qui m'a beaucoup aidé et supporté moralement.

J'aimerais finalement remercier ma famille, qui m'a supporté et encouragé, malgré les épreuves que nous avons rencontré. Merci à ma sœur, une oreille attentive. Merci à ma mère, toujours là pour rendre service et prononcer des mots réconfortants. Merci à mon conjoint, qui n'a pas eu que des moments faciles dans cette aventure, mais qui m'a enduré, et permis de me rendre au bout. Merci à mes filles, parce que leur présence me permet de continuer à avancer malgré les obstacles. Elles sont mon bonheur et m'apporte la joie de vivre.

Cette thèse est dédiée à mes parents, qui m'ont toujours poussé vers la lumière du savoir.

À papa, j'aimerais dire merci pour ton amour, ton respect et ta passion. Tu m'as promis en héritage une bonne éducation. Tu me l'as offert sur un plateau doré, garni de bonheur, d'amour et de joie de vivre. Tu as été là à chaque moment qui comptait pour moi. J'aurais tellement voulu que tu sois là encore une fois.

À maman, un modèle de femme, droite, juste, intelligente, logique. Merci pour ce que tu es et pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as montré combien notre famille était forte, merveilleuse, et vraiment exceptionnelle.

Je vous aime d'un amour très sincère.

Chapître 1. Introduction

Section 1.1 Le cœur : description anatomique et fonctions physiologiques.

1.1.1 Généralités

Au point de vue anatomique, le cœur est décrit comme un organe conique situé dans la cavité centrale du thorax, le médiastin. Chez l'humain, son poids varie entre 250 et 350g. Il se situe entre la colonne vertébrale et le sternum et il est bordé latéralement par les poumons. Sa base fait face à l'épaule droite et son apex, qui repose sur la face supérieure du diaphragme, pointe vers la hanche gauche.

Au point de vue physiologique, le cœur agit comme une double pompe rythmée et a pour rôle de propulser le sang à travers les vaisseaux sanguins afin de procurer constamment à chacune des cellules de l'organisme l'oxygène et les nutriments nécessaires et à les libérer des déchets excrétés. Pour accomplir cette tâche fondamentale, le cœur possède un mécanisme hautement spécialisé basé sur un fin couplage entre son système de conduction et son système de contraction.

En effet, d'une part, le cœur comporte un système de conduction électrique intrinsèque comprenant un centre rythmogène, dont le rôle est d'initier la formation d'un influx à une fréquence régulière, adaptée aux besoins particuliers de l'organisme à un moment précis. Ce système de conduction comporte aussi un réseau de cellules spécialisées pour la conduction qui permettent la propagation de chacun des influx générés par le centre rythmogène à l'ensemble des cellules cardiaques, de façon synchronisée.

D'autre part, le cœur nécessite un système de contraction efficace lui permettant de propulser 5 à 6 litres de sang dans l'ensemble de l'organisme à travers un réseau de vaisseaux sanguins, avec un débit d'environ 5,0 à 5,5

L/min. Pour ce faire, le cœur comporte une épaisse couche de cellules musculaires contractiles rattachées par un squelette formé de fibres de tissu conjonctif entrelacées. À cela s'ajoute la présence d'un système d'ouverture et de fermeture de valves qui permet d'éviter le reflux sanguin, lequel constituerait une dépense énergétique très coûteuse.

En fin, le couplage excitation-contraction intracardiaque permet de produire un travail coordonné du cœur de sorte que celui-ci se contracte efficacement et permette une éjection optimale du sang à travers l'organisme. L'étude détaillée de la structure anatomique et du rôle physiologique des systèmes de conduction et de contraction cardiaques est essentielle à la compréhension du fonctionnement normal du cœur et des changements qui surviennent en conditions pathologiques.

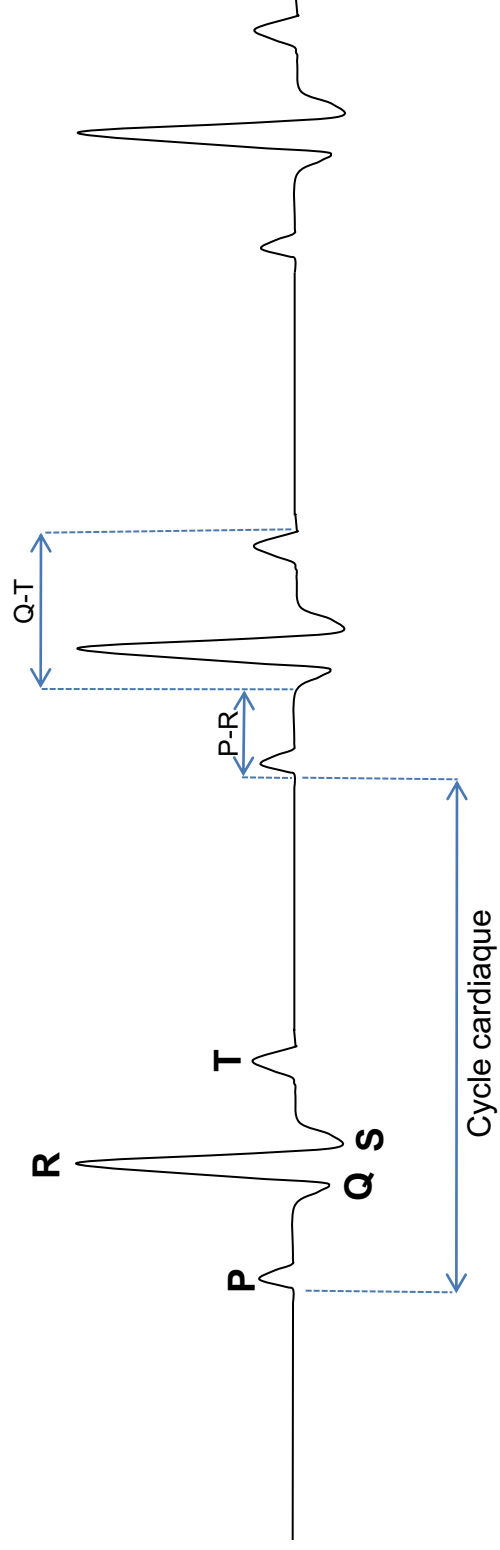
1.1.2 Le système de conduction

1.1.2.1 Le système cardionecteur

Le système de conduction intrinsèque cardiaque est composé d'un système cardionecteur en association avec la présence de jonctions ouvertes entre les cellules. Le système cardionecteur est constitué de cellules cardiaques non contractiles spécialisées pour la conduction électrique, appelées cellules cardionectrices. Ces cellules produisent des potentiels d'action se propageant dans le cœur de façon coordonnée, de sorte que celui-ci se contracte efficacement. Les cellules cardionectrices sont organisées en différentes régions spécialisées : (1) le nœud sinusal, (2) le nœud auriculo-ventriculaire, (3) le faisceau de His, (4) les branches droites et gauches du faisceau de His, (5) les myofibres de conduction des parois ventriculaires, ou fibres de Purkinje (Marieb, 1998).

Le nœud sinusal, situé dans la paroi de l'oreillette droite, juste sous l'ouverture de la veine cave supérieure, est le centre rythmogène. Cet amas de cellules spécialisées se dépolarise typiquement de 70 à 75 fois par minute, chez l'humain. L'onde de dépolarisation traverse ensuite le myocarde atrial, à une vitesse d'environ 1 m/s, pour être transmise jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire. La conduction internodale atrial demeure mal définie. Il a été suggéré qu'elle pourrait être effectuée via des faisceaux de cellules semi-différenciées, en transition entre les cellules contractiles travaillantes du myocarde atriales et les cellules conductrices spécialisées retrouvées au niveau du nœud auriculo-ventriculaire, qui traverseraient l'oreillette droite et permettrait la connexion du nœud sinusal au nœud A-V. Cependant, cette hypothèse demeure controversée et certains auteurs suggèrent que la conduction pourrait également s'effectuer par les cellules contractiles du myocarde auriculaire (Anderson et Ho, 1998). Le nœud auriculo-ventriculaire (nœud A-V), localisé à droite du septum auriculaire postérieur, retarde alors l'influx de près de 100ms, de sorte que les oreillettes puissent achever leur contraction avant que les ventricules n'amorcent la leur. Il constitue l'unique connexion électrique existante entre les cellules musculaires auriculaires et ventriculaires, dans un cœur normal. L'influx provenant du nœud A-V parcourt ensuite le faisceau de His, qui se divise en branches droite et gauche, puis traverse les fibres de Purkinje, qui pénètrent dans l'apex du cœur et remontent dans les parois des ventricules. Le nœud auriculo-ventriculaire ainsi que le faisceau de His comprennent aussi des cellules cardionectrices qui se dépolarisent spontanément. Cependant, en condition physiologique normale, leur dépolarisation se produit à une fréquence beaucoup moins élevée que celle qui survient dans le nœud sinusal, soit environ 50 fois par minute pour le nœud AV et environ 30 fois par minute pour le faisceau de His. Puisque la fréquence de dépolarisation du nœud sinusal est supérieure à celle des autres régions du système de conduction, il règle la cadence de tout le système de conduction, et par conséquent, il contrôle la fréquence cardiaque (Marieb, 1998; Guyton, 1996).

Figure 1.



1.1.2.2 L'électrocardiogramme

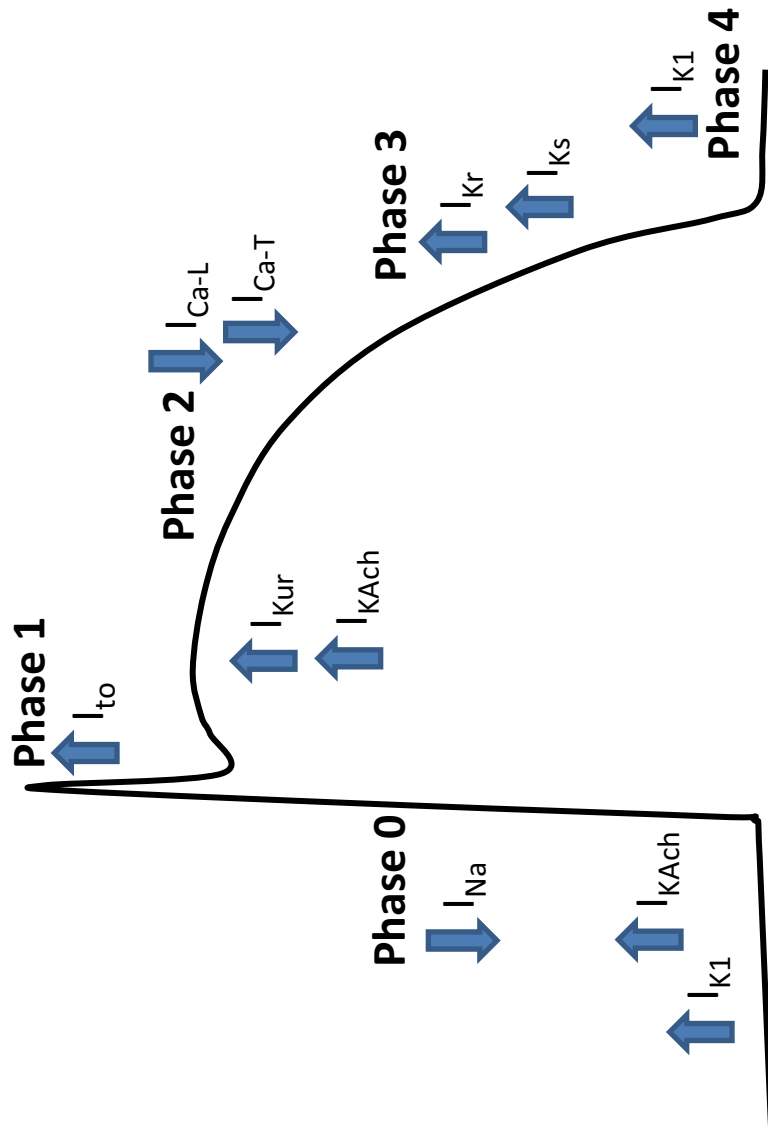
Lors de la propagation d'un influx électrique cardiaque, le courant électrique se dissipe dans les tissus environnant du cœur. L'enregistrement obtenu à l'aide d'électrodes positionnées à la surface de la peau, qui permet de détecter le potentiel électrique généré par ces courants, est appelé électrocardiogramme (figure 1). Un électrocardiogramme normal est principalement composé d'une onde P, d'un complexe QRS et d'une onde T. L'onde P provient du potentiel généré par la dépolarisation des oreillettes, alors que le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules. Quant à l'onde T, elle est la conséquence de la repolarisation ventriculaire. L'absence d'une onde de repolarisation auriculaire visible sur l'électrogramme serait due à sa superposition au complexe QRS, qui masquerait le signal de cette dernière étant donné sa plus forte amplitude. Certains intervalles sont fréquemment utilisés comme paramètres de la fonction cardiaque. Par exemple, l'intervalle P-Q (aussi appelé P-R) représente le délai entre l'excitation des oreillettes et celle des ventricules. L'intervalle Q-T représente l'ensemble du cycle de dépolarisation-repolarisation des ventricules. Enfin, la fréquence cardiaque peut être calculée à partir de l'électrocardiogramme, puisqu'elle est la réciproque de la durée d'un cycle cardiaque (Marieb, 1998).

1.1.2.3 Le potentiel d'action

La propagation d'un influx, depuis le nœud sinusal jusqu'aux cellules musculaires des parois des ventricules, se produit sous la forme de potentiel d'action. Le potentiel d'action consiste en une série de changements du potentiel membranaire cellulaire, lequel est dépendant de la différence de concentration de chaque ion entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire et de sa perméabilité membranaire (équation de Goldman-Hodgkin-Katz). Ainsi, le changement de perméabilité de la membrane plasmatique à différents ions,

↓ Courants entrants
↑ Courants sortants

Figure 2.



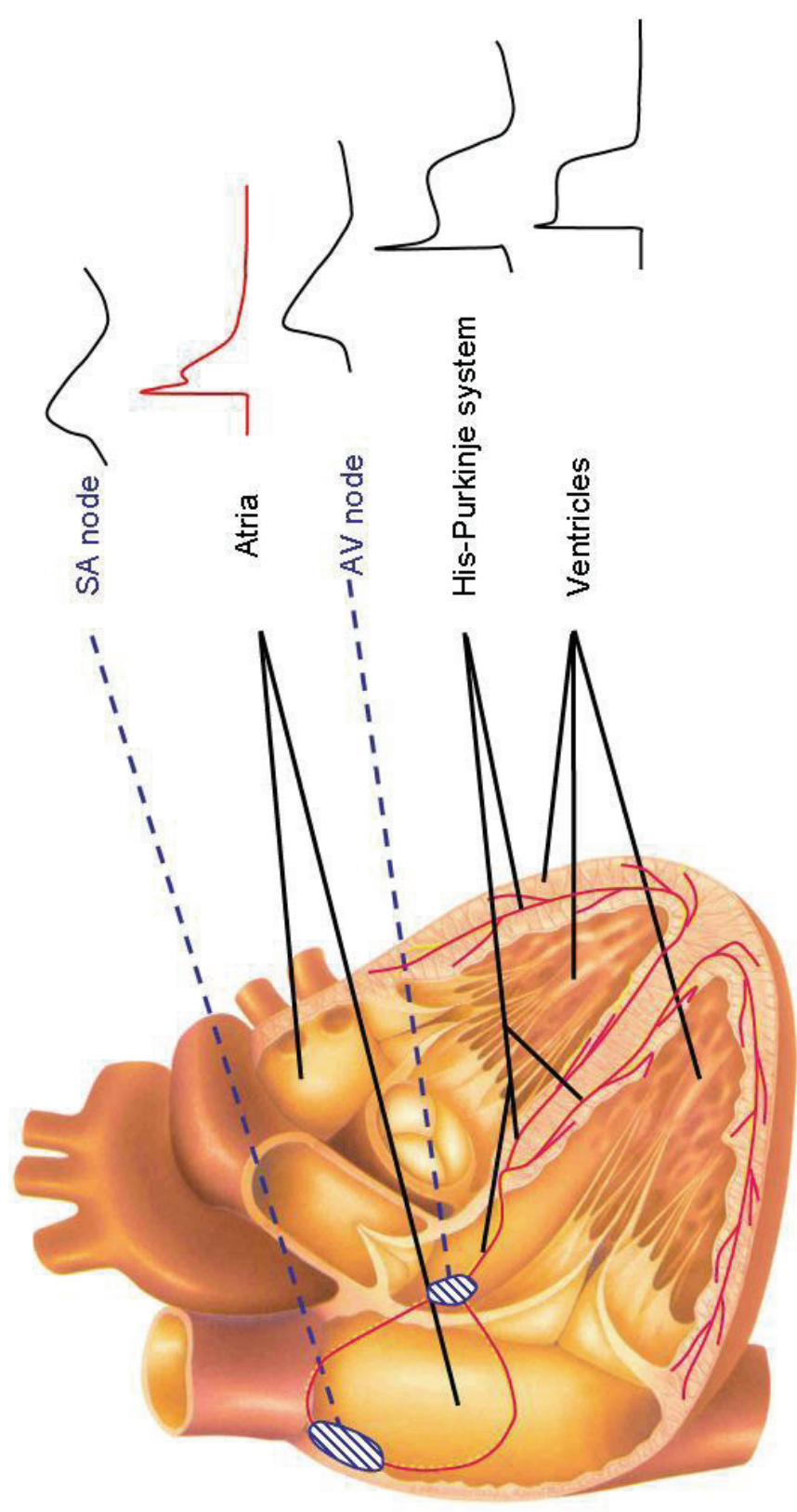
principalement le potassium (K^+), le sodium (Na^+) et le calcium (Ca^{2+}), suite à l'ouverture de canaux ioniques temps et voltage dépendants, génère un ensemble de courants entrant et de courants sortant dont la résultante est la formation d'un potentiel d'action (Hammond, 1996).

La structure générale d'un potentiel d'action cardiaque est illustrée dans la figure 2. La phase 0 du potentiel d'action est caractérisée par une dépolarisation rapide du potentiel de membrane, due à une forte augmentation du courant sodique (I_{Na}). La phase 1 consiste en une repolarisation rapide partielle due à une sortie de potassium par les canaux potassiques transitoires sortants, I_{to} . La phase 2 est la phase du plateau, caractérisée par un courant calcique entrant par les canaux calciques de type L (I_{CaL}). La phase 3, ou phase de repolarisation, implique l'activation d'une série de courants potassiques sortants à rectification retardée (« delayed rectifier » : I_K) qui sont temps-dépendants. La phase 4, le retour au potentiel de repos, correspond à une perméabilité prédominante au potassium (I_{K1}).

Bien que ce schéma représente l'allure générale des principales phases d'un potentiel d'action, l'étude plus approfondie des propriétés électrophysiologiques du cœur par l'enregistrement de courants sur des cellules cardiaques isolées a permis de constater que la morphologie du potentiel d'action, qui traverse le système de conduction, diffère d'une région à l'autre (figure 3). Ceci s'expliquerait par une différence régionale du type de canaux ioniques impliqués, de leur nombre ainsi que de leurs interactions avec des sous-unités auxiliaires.

Au niveau du nœud sinusal, le potentiel de repos des cellules est de -55 à -60mV (Schram et *al.*, 2002). Cependant, ce potentiel de repos n'est pas maintenu tout au long de la phase 4 du potentiel d'action. En effet, les cellules du nœud sinusal se dépolarisent progressivement tout au long de la phase 4. Cette dépolarisation lente progressive est responsable de l'activité pacemaker du

Figure 3.



nœud sinusal et elle est principalement attribuable au courant non-sélectif aux cations (I_f). Le courant s'active lentement en hyperpolarisation cellulaire, à un potentiel membranaire inférieur à -40 à -45mV. Les canaux calciques de type-T seraient aussi impliqués dans la phase 4 de dépolarisation lente. Le potentiel membranaire baisse alors jusqu'à atteindre le seuil d'activation des canaux calciques de type-L (α_{1c}), lesquels génèrent le principal courant dépolarisant de la phase 0. La désactivation rapide du courant potassique à rectification retardée ($I_{Kr} + I_{Ks}$) permet une repolarisation rapide et un retour au potentiel de repos avec absence d'une phase plateau. Les courants I_{to} et I_{K1} seraient absents dans cette région du système de conduction.

Au niveau du tissu musculaire auriculaire, la morphologie du potentiel d'action diffère grandement (Schram et *al.*, 2002). En effet, la phase 4 du potentiel d'action est caractérisée par une absence de dépolarisation spontanée et d'un potentiel de repos environnant les -70 à -80 mV. La phase 0 est plus rapide que celle du nœud sinusale et dépend principalement du courant sodique (I_{Na}). Il y a présence d'une phase 1 de repolarisation (associée à I_{to}) et il d'une phase 2 de plateau (associé principalement à I_{Ca-L}). Notons aussi l'implication d'un courant potassique I_{Kur} , impliqué dans les phases 1 et 2, qui est spécifique au tissu musculaire auriculaire et raccourcit la durée du potentiel d'action.

Le nœud auriculo-ventriculaire, responsable de la transmission de l'activation auriculaire au niveau ventriculaire, agit comme filtre afin de limiter la fréquence d'activation ventriculaire. L'étude histologique et histochimique du nœud A-V de cœurs de lapins suggère une structure hétérogène constituée de trois types cellulaires (bâtonnets, ovoïdes et fusiformes) spécialisés dans cette région (Anderson, 1972). Les études électrophysiologiques effectuées sur le nœud A-V de cœurs isolés de lapins suggèrent la classification des cellules nodales en trois groupes, soit les cellules AN (atrio-nodales), N (nodales) et NH (nodales-His) (Billette, 1987). Cette classification est basée sur les propriétés électrophysiologiques de chaque type cellulaire présent dans le nœud A-V.

Selon Munk *et al.* (1997), les cellules ovoïdes possèdent un profil de potentiel d'action de type N ou NH, caractérisé par une période réfractaire prolongée, une faible vitesse de dépolarisation maximale et l'absence d'adaptation de la durée du potentiel d'action à la fréquence de stimulation. Les cellules en bâtonnets sont quant à elles généralement de type AN. Le courant I_f , est présent majoritairement dans les cellules ovoïdes. Les courants I_{Na} et I_{to} sont généralement absents dans les cellules ovoïdes, mais présents dans les cellules en bâtonnets. Le courant I_{Ca-L} est responsable de la phase de dépolarisation rapide des cellules de type N. Le courant I_{Kr} est principalement responsable de la repolarisation membranaire et le courant I_{K1} est faiblement impliqué au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (Hancox et Mitcheson, 1997).

Au niveau ventriculaire, les cellules musculaires présentent un potentiel membranaire de repos aux environs de -80 mV (Schram *et al.*, 2002). La phase 4 du potentiel d'action est dénuée de dépolarisation spontanée et le courant potassique I_{K1} y est 6 à 10 fois plus élevé que le courant I_{K1} auriculaire. La durée de la phase 2 de plateau est supérieure à celle présente au niveau du tissu auriculaire et varie selon que les cellules soient plutôt dans la région sous-endocardique, mid-myocardique ou sous-épicaire. Cette différence est notamment associée à un gradient des courants potassiques I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} et du courant sodique I_{Na} à travers les multiples couches de cellules musculaires incluses dans la paroi ventriculaire.

1.1.2.4 Les jonctions intercellulaires

L'activité électrique générée par le système de conduction se propage dans les tissus auriculaire et ventriculaire à travers les canaux jonctionnels. Ces canaux sont formés de deux hexamères de protéines transmembranaires appelées connexines. Les connexons (hexamères de connexines) peuvent être homo- ou hétéromériques selon qu'ils soient formés d'un seul ou de plusieurs

types de connexines. L'alignement de deux connexons de cellules adjacentes permet la formation d'un canal étanche, perméable à des ions ou de petites molécules de masse moléculaire inférieure ou égale à 1 kDa. Au niveau des cardiomyocytes, les connexines (Cx) exprimées sont les Cx30,2, Cx40, Cx43 et Cx45 (Hervé et *al.*, 2008). Chacune de ces connexines possède un patron d'expression particulier. Il est connu notamment que la Cx40 contribue à la propagation d'influx au niveau auriculaire ainsi qu'au niveau du système cardionecteur. La Cx43 serait principalement impliquée dans la propagation électrique ventriculaire. La Cx45 posséderait un rôle essentiel au stade embryonnaire. La Cx30,2 contribuerait majoritairement au ralentissement de l'influx au niveau du nœud A-V. Il importe cependant de mentionner que cette distribution des connexines varie selon les espèces (Gros et *al.*, 1994).

1.1.3 Le système de contraction

1.1.3.1 Description anatomique macroscopique

Le cœur est enveloppé du péricarde, une membrane double constituée d'une couche fibreuse de tissu conjonctif dense et d'une couche séreuse. La paroi du cœur est constituée de trois tuniques, soit l'épicarde, le myocarde et l'endocarde (Marieb, 1998). L'épicarde, tunique externe formée de tissu séreux, est en continuité avec la couche séreuse du péricarde et délimite, avec cette dernière, la cavité du péricarde. La cavité du péricarde contient un liquide dont le rôle serait de réduire la friction créée entre les couches tissulaires lors des battements cardiaques. Lors du développement embryonnaire, l'épicarde est la dernière couche tissulaire cardiaque à se former. Il dérive de la splanchnopleure coelomique et se développe pour former initialement un pro-épicaardium, duquel une monocouche de cellules épithéliales squameuses se forme (Wessels et Pérez-Pomares, 2004). Le myocarde, tunique intermédiaire, est constitué d'une épaisse couche de cellules musculaires, qui confèrent au cœur sa capacité à se contracter. Il dérive du mésoderme, un feuillet embryonnaire formé par les

cellules de l'épiblaste ayant migré dans le blastocœle. Le myocarde contient aussi des faisceaux de tissu conjonctif, qui constituent le squelette du cœur et un riche réseau de capillaires, nécessaire pour combler les besoins en oxygène et en nutriments du muscle cardiaque. Les cellules mésenchymateuses de ce tissu conjonctif dériveraient du pro-épicaarde, suite à une transition épithéliale-mésenchymale (Muñoz-Chápuli et Pérez-Pomares, 2010). La tunique interne, l'endocarde, est formée d'une couche de cellules mésenchymateuses et couvre les parois internes du cœur. Son rôle serait de diminuer la friction du sang contre les parois des chambres cardiaques. Au stade embryonnaire, des cellules mésodermes distribuées aux pôles atrio-ventriculaires et controventriculaires du cœur primitif migrent et se transforment en mésenchyme par une transformation endocardiale-mésenchymale (TEM) pour former une couche tapissant les chambres cardiaques, en continuité avec l'endothélium vasculaire. Certaines des cellules mésenchymales formeront également le mésenchyme valvulo-septal à l'origine des valves cardiaques et de la septation. D'autres cellules, non transformées par TEM, seront impliquées dans la formation des muscles trabéculés, des muscles papillaires et des cellules de Purkinje (Harris et Black, 2010).

Lors du développement embryonnaire, le système cardiovasculaire est le premier à se développer et à devenir fonctionnel. D'abord formé comme un tube, le cœur primitif se replie sous l'influence des protéines telles que Hand, Xin, flectin et Pitx2, pour permettre la formation des chambres cardiaques (Gilbert, 2006). Le cœur des mammifères nouveau-nés contient quatre cavités : deux oreillettes et deux ventricules. Les oreillettes, positionnées dans la partie supérieure du cœur, sont séparées par le septum inter-auriculaire. Les ventricules, situés sous les oreillettes, sont séparés par le septum inter-ventriculaire.

1.1.3.2 Circulation intra-cardiaque

Le cœur est une double pompe pulsatile qui dessert deux circuits distincts. D'une part, le côté droit, qui reçoit le sang provenant de tout l'organisme, pauvre en oxygène et riche en gaz carbonique. Ce sang pénètre dans l'oreillette droite via les veines caves supérieure et inférieure. Il traverse alors la valve tricuspide pour se retrouver dans le ventricule droit. Ce dernier qui propulse le sang dans le tronc pulmonaire, en direction des poumons, où il sera ré-oxygéné, avant de retourner au cœur. D'autre part, le côté gauche, qui reçoit le sang enrichie en oxygène et plus pauvre en gaz carbonique, provenant des poumons. Ce sang pénètre dans l'oreillette gauche via les quatre veines pulmonaires. Il traverse alors la valve mitrale et pénètre dans le ventricule gauche. Le sang est ensuite éjecté à travers la valve aortique, dans l'aorte, afin de retourner oxygéner l'ensemble de l'organisme via le réseau artériel et veineux systémique.

L'ensemble des événements cardiaques qui surviennent entre le début d'un battement cardiaque le début du battement subséquent est nommé le cycle cardiaque. Chaque cycle cardiaque consiste en une série de variations de pression et de volume sanguins à l'intérieur du cœur. Ainsi, en diastole, les muscles cardiaques sont relâchés et la pression intra-cardiaque est basse. Les cavités se remplissent passivement du sang qui s'écoule depuis les veines dans les oreillettes et à travers les valves auriculo-ventriculaires qui sont ouvertes, jusqu'aux ventricules. S'en suit alors une systole auriculaire, au cours de laquelle les oreillettes se contractent pour se vider dans les ventricules. Les oreillettes se relâchent ensuite pour retourner en diastole. À ce moment, les ventricules commencent à se contracter. Le sang ainsi comprimé appuie sur les valves auriculo-ventriculaires qui sont alors refermées. La pression élevée à l'intérieur des cavités ventriculaires entraîne l'ouverture des valves de l'aorte et du tronc pulmonaire, permettant l'éjection du sang dans les grosses artères. En fin de systole, la pression intra-ventriculaire gauche normale atteint environ 120mmHg.

Les ventricules se relâchent ensuite et la baisse de pression dans les cavités ventriculaires entraîne la fermeture des valves de l'aorte et du tronc pulmonaire. Les ventricules sont alors clos jusqu'à ce que la pression sanguine intra-auriculaire pousse l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires pour initier un nouveau cycle cardiaque (Marieb, 1998; Guyton, 1996).

1.1.3.3 Description anatomique microscopique

Le muscle cardiaque est un muscle strié, formé de deux syncytiums de cellules musculaires, l'un auriculaire, l'autre ventriculaire, séparés par le tissu fibreux qui forme l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. Les fibres (cellules) musculaires cardiaques, contrairement aux fibres des muscles squelettiques, sont courtes, épaisses, ramifiées et anastomosées. Elles sont connectées en série au niveau des disques intercalaires (Guyton, 1996).

Chaque fibre musculaire est constituée d'éléments contractiles cylindriques appelées myofibrilles. Celles-ci sont striées, formées elles-mêmes d'une série sarcomères mis bout à bout. Les sarcomères constituent l'unité de base de la contraction. Ils se composent principalement d'une série de filaments épais de myosine et de filaments minces d'actine, qui sont disposés en alternance. Les filaments minces contiennent aussi d'autres protéines de structure telle que la tropomyosine et certaines protéines essentielles à la formation de liens actine-myosine telles que les troponines. Les filaments épais formés de myosine, quatre chaînes légères et deux chaînes lourdes, sont aussi composés de titine, de myomesine, de créatine phosphokinase MM ainsi que d'autres protéines structurelles. Finalement, les sarcomères contiennent plusieurs autres protéines du cytosquelette dont α -actinin, Cap Z, tropomoduline, nébulette et desmine qui relient les sarcomères à des molécules d'adhésion et permettent l'ancrage des myocytes à la matrice extracellulaire (Katz, 2006).

La membrane plasmique des cellules musculaires, appelée aussi sarcolemme, comporte des régions spécialisées, les tubules transverses, qui pénètrent à l'intérieur de la cellule et dont la lumière communique avec le liquide interstitiel de l'espace extracellulaire. Ces tubules permettent la propagation des potentiels d'action à l'intérieur des myocytes. Le réticulum sarcoplasmique, région spécialisée du réticulum endoplasmique, consiste en un réseau complexe de tubules entrelacés autour de chaque microfibrille et a comme fonction principale de régler la concentration intracellulaire du calcium ionique. Les disques intercalaires, points de jonction entre les cellules musculaires, comprennent des jonctions d'ancrage, les desmosomes, dont le rôle serait de relier solidement les cellules adjacentes tout en répartissant la tension à travers l'ensemble des couches cellulaires de sorte qu'elles ne se déchirent ou ne s'étirent lors de la contraction ou de la relaxation musculaire. Les disques intercalaires contiennent aussi des jonctions ouvertes, structures spécialisées formées de connexines, qui permettent l'échange d'ions, de sucres et d'autres petites molécules entre les cellules avoisinantes. Enfin les cardiomyocytes possèdent également de nombreuses mitochondries qui génèrent une grande quantité d'énergie, requise pour la contraction (Opie, 2004; Katz, 2006).

Hormis les cellules musculaires, le tissu cardiaque est composé également de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules endothéliales, de macrophages et de mastocytes, dont les proportions varient en fonction de l'âge, de l'espèce et de la condition physiopathologique (Banerjee et *al.*, 2007).

Les fibroblastes ont un rôle très actif dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Ils sont les principaux responsables de la sécrétion des protéines de type collagène I et III (Eghbali et *al.*, 1989). Ils sécrètent aussi des facteurs de croissance, des cytokines et des métalloprotéinases (MMPs) (Brown et *al.*, 2005; Jugdutt, 2003) pour maintenir un équilibre entre la synthèse et la dégradation des éléments de la matrice intercellulaire.

La matrice extracellulaire est composée d'éléments non-cellulaires qui forment un réseau tridimensionnel permettant de relier les éléments cellulaires entre eux et d'aligner les éléments contractiles. Elle permet aussi de distribuer la tension mécanique et de transmettre certains signaux par des récepteurs extracellulaires (Espira et Czubryt, 2009). Elle est notamment formée de protéines telles que l'élastine et le collagène (principalement type I et III), des protéines fibrillaires qui contribuent au maintien de la structure cardiaque. Les microfibrilles de collagènes sont formées de triples hélices de polypeptides riches en résidus glycines et possèdent la capacité de former de nombreux liens covalents entre elles et avec d'autres protéines (van der Rest et Garrone, 1991). Les microfibrilles de collagène forment des réseaux et sont entrelacés avec des fibres d'élastine et forment ensemble un squelette flexible et solide auquel se rattachent les autres éléments de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est aussi composée de protéines adhésives, telles que la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV, impliquées dans la formation de jonctions adhérentes entre les cardiomyocytes et dans la transmission de signaux intercellulaires. La présence de récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines permet une connexion entre des composantes de la matrice extracellulaires telles que le collagène, la fibronectine et la laminine, et des composantes intracellulaires du cytosquelette (vinculin, talin et α -actinin) ainsi que certaines voies de signalisation (Rho GTPase, Raf, FAK, MAP kinases) (Espira et Czubryt, 2009). Certaines molécules de signalisation, telles que l'angiotensine II, l'endothéline-1 et TGF-beta sont séquestrées dans la matrice extracellulaire à de fortes concentrations. Ces molécules sont libérées en condition de stress, suite à l'activation des MMPs. La matrice extracellulaire comprend aussi des enzymes de la régulation de la synthèse et de la dégradation des différentes protéines de la matrice (MMPs et TIMPs).

Les métalloprotéinases (MMPs) constituent une famille de plus de 20 membres où chacun a la capacité de dégrader une ou plusieurs protéines de la

matrice extracellulaire. Notamment, au niveau cardiaque, les MMP-1 et -13 seraient impliquées dans la dégradation de la structure triple-hélice des fibres de collagène et les MMP-2 et -9 effectueraient la dégradation subséquente du collagène. Les MMPs sont généralement sécrétées sous une forme latente. Leur synthèse et leur activation est fortement régulée. Les protéines de la famille TIMPs (tissue inhibitor of metalloprotease) sont présentes dans la matrice extracellulaire et participent activement à la régulation de l'activité des MMPs. Il y a actuellement 4 membres de la famille TIMPs : TIMP-1, -2, -3 et -4. La balance MMPs/TIMPs qui permet le maintien de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. (Porter et Turner, 2009)

1.1.4 Couplage des systèmes de conduction et de contraction

Le couplage excitation-contraction représente le mécanisme d'initiation d'une contraction cardiaque suite au passage d'un potentiel d'action. Lorsqu'un potentiel d'action traverse les membranes des cellules contractiles, il dépolarise la membrane plasmique, entraînant un flux de sodium, de calcium et de potassium, à travers des canaux spécifiques à ces ions. Le potentiel d'action se propage aussi le long de la membrane qui forme les tubules *T* transverses et entraîne l'ouverture des canaux calciques membranaires (type-L) (Bers, 2002). Le calcium entrant dans le sarcoplasme, est responsable de la relâche de calcium du réticulum sarcoplasmique, par sa liaison aux canaux calciques appelé récepteurs à la ryanodine. Ce calcium diffuse en quelques millisecondes jusqu'aux myofibrilles, catalysant la réaction chimique qui permettra le glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine et ainsi produira la contraction musculaire. En fin de contraction, le calcium doit être évacué du cytosol. La sortie de produit via la pompe sodium-calcium, qui expulse une petite partie du calcium intracellulaire à l'extérieur de la cellule. La majeure partie du calcium est cependant retourné dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe ATPase SERCA 2a.

Section 2.1 La fibrillation auriculaire.

1.2.1 Historique

Ce fut en 1628 que William Harvey, publia son travail intitulé *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*, dans lequel il suggéra que le sang était pompé par le cœur dans tout le corps avant d'être retourné au cœur pour être recirculé, et ce dans un circuit clos (McMichael, 1982). Il y fit aussi mention que le rythme cardiaque devait être initié dans l'oreillette droite et décrivit un mouvement d'ondulation et de palpitation des oreillettes, se poursuivant après l'arrêt de contractions ventriculaires. Ceci lui valu l'attribution de la première observation directe de fibrillation auriculaire.

Près d'un siècle et demi plus tard, Jean-Baptiste de Senac publia différents travaux, notamment en 1761 et en 1783, dans lesquels il mit en évidence les maladies de la valve mitrale et la dilatation du ventricule gauche comme des causes importantes de « palpitations » dans les oreillettes (McMichael, 1982).

L'introduction de la méthode kymographique par Carl Ludwig en 1847, permis à Bamberger et Marey, en 1863, d'effectuer des enregistrements du battement artériel et veineux. James Mackenzie développa un polygraphe à l'encre, qui lui permit d'étudier et d'enregistrer les battements de la veine jugulaire et de décrire la présence de rythme cardiaque normal ou anormal. En 1899, Arthur Cushny rapporta la similarité entre les tracés artériels enregistrés chez des chiens soumis à un *auriculum delirium* et les tracés d'une femme souffrant de *delirium cordis*. En 1901, Willem Einthoven mit au point un galvanomètre à corde, capable de mesurer les changements de potentiel électrique provenant du muscle cardiaque et de les enregistrer graphiquement. Cette invention, qui lui valut le prix Nobel de médecine en 1924, lui permit d'effectuer de nombreux enregistrements d'électrogrammes de cœurs sains et

de cœurs malades. Il publia en 1906, la première classification des électrogrammes, normaux et anormaux, dans laquelle il présenta entre autre les premiers tracés de flutter auriculaire (Einthoven, 1906). Thomas Lewis publia plusieurs articles basés sur les enregistrements d'électrocardiographies et montra que le *pulsus regularis perpetuus* décrit autrefois par Hering était en fait le résultat d'une fibrillation auriculaire. De plus, Lewis fut le premier clinicien à suggérer un mouvement circulaire comme mécanisme de flutter et de fibrillation auriculaire chez l'homme.

Le concept de circuit de réentrée décrit par Lewis avait cependant été initialement proposé par MacWilliam, en 1887, et avait été repris par Mayer, qui effectua des études de pulsations rythmiques sur des anneaux de tissus de méduses (MacWilliam, 1887; Mayer, 1906). Mayer démontra qu'une vague de stimulation unique se propageant de façon constante dans une direction autour d'un circuit pouvait se maintenir plusieurs jours à un rythme constant. Entre 1912 et 1914, les travaux de George Ralph Mines effectués sur des anneaux de cœur de tortues lui permirent de montrer qu'une stimulation appliquée au niveau du tissu auriculaire ou ventriculaire entraînait la propagation d'une onde de contraction continue autour de l'anneau, et ce dans une seule direction. Mines montra aussi que l'application d'un stimulus hors phase dans le cycle suffisait à arrêter l'onde de contraction, suggérant que celle-ci devait être due à la propagation d'une onde d'excitation et non à un foyer automatique. Finalement, il mit en évidence l'importance de la vitesse de conduction et de la durée des périodes réfractaires pour la propagation d'une onde d'excitation et suggéra que ces paramètres devaient jouer un rôle au point de vue clinique. Walter E. Garrey publia en 1914 ses études sur la nature de la fibrillation auriculaire, dans lesquelles il montra que l'oreillette droite sectionnée ne pouvait maintenir une fibrillation auriculaire (Garrey, 1914). Il conclut alors qu'une masse minimale de tissu était nécessaire au maintien d'une fibrillation et que par conséquent, celle-ci devait provenir d'un circuit continu plutôt qu'une série de foyers ectopiques, tel que suggéré par Englemann. Garrey suggéra que dans le cas d'une fibrillation

auriculaire, le mouvement circulaire devait être beaucoup plus complexe et chaotique que lors d'un flutter et pourrait être constitué d'une multitude de circuits entrecroisés. Les études de modélisation mathématique effectuées par Moe et *al.* (1964) ont permis de confirmer l'hypothèse de multiples circuits de réentrée émise par Garrey et de définir le mécanisme par lequel ces circuits multiples permettaient de perpétuer la fibrillation auriculaire. Ainsi, la masse tissulaire, la vitesse de conduction et la durée de la période réfractaire seraient les facteurs déterminant le nombre de circuits et par conséquent, la possibilité de maintenir une fibrillation auriculaire sur une longue période de temps.

Maurits A. Allesie et *al.* démontrèrent, en 1977 (Allesie et *al.*, 1977), la présence de circuits d'excitation chez le lapin soumis à un train de stimuli suivit d'une extrasystole. L'enregistrement de la propagation de l'onde d'excitation sur 300 sites a permis de démontrer son trajet circulaire. Il a aussi appliqué le concept de longueur d'onde d'un circuit de réentrée, initialement développé par Wiener et Rosenblueth, selon lequel la longueur d'onde serait directement proportionnelle à la vitesse de conduction et à la durée de la période réfractaire. Ainsi, le nombre de circuits de réentrée serait dépendant de la taille des oreillettes et de la longueur de l'onde d'excitation.

1.2.2 Nosologie

La fibrillation auriculaire (FA) est une tachy-arythmie supraventriculaire caractérisée par une activation auriculaire rapide (400-600/min chez l'homme) désordonnée, généralement accompagnée d'une activation ventriculaire irrégulière. À l'électrocardiogramme, on constate une disparition d'ondes P régulières et clairement individualisées, qui sont remplacées par des oscillations irrégulières en amplitude. Ce désordre électrique entraîne une dysfonction des oreillettes et un déséquilibre hémodynamique. En effet, en condition normale, la contraction des oreillettes complète le remplissage diastolique ventriculaire et assure la fermeture pré-systolique des valves auriculo-ventriculaires. Cependant,

lors d'une fibrillation auriculaire (FA), la contraction atriale devient faible ou inexistante, ce qui mène à une baisse de la pression systolique et une hausse de la pression diastolique. À long terme, une augmentation de la pression intra-auriculaire entraînera une dilatation ainsi qu'une altération des propriétés électrophysiologiques et structurelles des oreillettes.

Il importe pour les cliniciens de classer le type de fibrillation auriculaire observé chez un patient afin de déterminer le traitement le plus approprié pour celui-ci. Ainsi, suite à l'observation d'un premier événement arythmique, l'arrivée d'un deuxième événement permet de classer la fibrillation auriculaire comme étant récurrente. Lorsque cette arythmie se termine spontanément, la FA récurrente est désignée comme étant paroxysmale, alors que lorsqu'elle est d'une durée de plus de sept jours, elle est considérée persistante. Enfin, lorsque la FA est d'une durée de plus d'un an, ou sans cardioversion possible, elle est dite permanente.

1.2.3 Épidémiologie

La fibrillation auriculaire est l'arythmie la plus commune et elle est responsable de près d'un tiers des hospitalisations liées à des troubles du rythme cardiaque. En 2006, on estimait à près de 2,2 millions le nombre d'Américains et à 4,5 millions le nombre d'Européens souffrant de FA paroxysmale ou persistante (Fuster et *al.*, 2006). Ceci constitue une augmentation d'environ 66% du nombre de patients admis au cours des 20 dernières années. La prévalence de la fibrillation est d'environ 0,4 à 1% dans la population générale et atteint 8% chez les gens âgés de 80 ans et plus. Le risque de thrombo-embolie chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire non-valvulaire est d'environ 5%, soit 2 à 7 fois plus élevé que les patients sans FA. L'étude Framingham a montré une augmentation du risque d'accidents vasculaires avec le vieillissement (environ 1,5% chez les 50-59 ans et 23,5 % chez les 80-89 ans), chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (Wolf et

al., 1987). L'étude Framingham Heart Study a montré une augmentation du risque d'accidents vasculaires de 17 fois chez les patients atteints d'une maladie cardiaque rhumatismale accompagné de FA comparativement au groupe témoin. Selon l'étude SOLVD, le risque de mortalité des patients atteints de dysfonction ventriculaire est de 34% lorsque ceux-ci souffrent de FA alors qu'il est de 23% pour les patients en rythme sinusal. Parmi les autres facteurs associés avec une augmentation du risque de développement de fibrillation auriculaire, on retrouve notamment la consommation de cigarettes, le genre masculin, l'obésité, l'hyperthyroïdie, l'hypertension et le diabète mellitus (Fuster et *al.*, 2006).

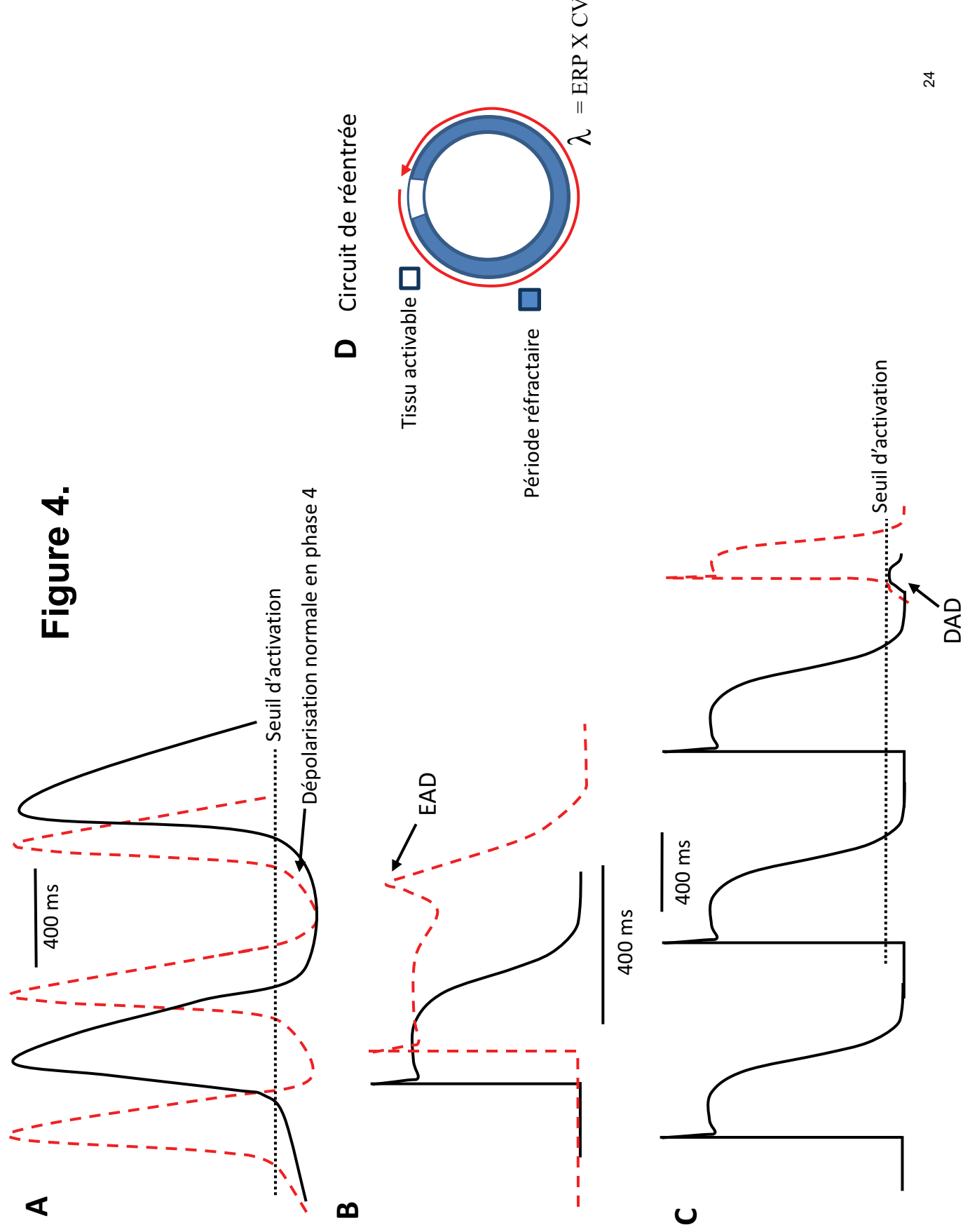
1.2.4 Sémiologie

Les principaux symptômes associés à la fibrillation auriculaire résultent de l'altération de la capacité à réguler le rythme et la fréquence cardiaque, ainsi que la réponse contractile auriculo-ventriculaire aux besoins systémiques. De cette dérégulation peut résulter l'augmentation excessive de la fréquence cardiaque et l'apparition d'un rythme irrégulier, ressentis chez les patients sous forme de palpitations et de péricordialgies. La fibrillation auriculaire peut survenir seule ou en association avec d'autres arythmies telles que la tachycardie et le flutter auriculaire. Le flutter peut se transformer en fibrillation, et inversement, la fibrillation peut se transformer en flutter auriculaire. Le flutter auriculaire est généralement accompagné d'un bloque 2 :1 du nœud A-V, entraînant un rythme ventriculaire de 120 à 160 bpm. Lorsque la fibrillation auriculaire est soutenue, les complications subséquentes à la dérégulation du rythme et de la fréquence cardiaque sont le risque de syncope, les thrombo-embolies (cérébrales, rénales, mésentériques ou cardiaques) et le développement d'insuffisance cardiaque, de syndromes ischémiques et de collapsus circulatoires.

1.2.5 Mécanismes

1.2.5.1 Mécanismes de base des arythmies.

Figure 4.



1.2.5.1.1 Automaticité anormale. Les arythmies peuvent être engendrées par la genèse d'un influx, provenant d'une automaticité anormale, c'est-à-dire une activation tissulaire cardiaque, outre le nœud sinusal, qui engendre l'activation précoce du tissu environnant en devançant le rythme sinusal. L'automaticité anormale peut provenir d'un foyer ectopique ou résulter d'une post-dépolarisation précoce ou tardive. Dans le cas d'un foyer ectopique, l'activité pacemaker extra-sinusal résulte d'un déséquilibre des courants de la phase diastolique du potentiel d'action, favorisant les courants entrant et entraînant la dépolarisation membranaire progressive jusqu'à atteindre le seuil d'activation et à générer un potentiel d'action (figure 4A). Différentes conditions pathologiques, telles qu'une ischémie myocardique, peuvent entraîner ce type de phénomène.

Les post-dépolarisations précoces sont engendrées lors d'un prolongement excessif du potentiel d'action, qui peut survenir lors d'une bradycardie, d'une hypokaliémie ou d'un syndrome de long-QT (Pogwizd et Bers, 2004). Elles sont dues à une réactivation du courant calcique, qui a récupéré de son inactivation temps-dépendante, suite à la prolongation d'un potentiel d'action, maintenant le potentiel membranaire au delà du seuil d'activation des canaux calciques de type-L (figure 4B). Cette réactivation se produit durant la phase plateau du potentiel d'action. En condition d'hypertrophie cardiaque, la pompe NCX pourrait aussi engendrer des post-dépolarisations précoces (Sipido et *al.*, 2000).

Les post-dépolarisations tardives surviennent lorsqu'il y a une relâche spontanée de calcium par le reticulum sarcoplasmique (SR) en diastole. Celle-ci peut être causée par forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ou par une dysfonction des canaux du SR qui contrôlent la sortie de Ca^{2+} provenant du SR, les récepteurs à la ryanodine (RyR) (figure 4C).

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire stimule le fonctionnement de la pompe échangeur sodium-calcium (NCX). NCX est une pompe électrogénique, qui produit un courant transitoire entrant (I_{ti}) durant l'expulsion du calcium vers le milieu extra-cellulaire. Le courant I_{ti} généré par NCX dépolarise les cellules, entraînant une post-dépolarisation. En condition normale, la majeure partie du calcium cytosolique est retourné dans le SR au cours de la relaxation diastolique via la pompe SR Ca-ATPase (SERCA 2A). Alors, le courant I_{ti} relié au fonctionnement de NCX est de faible amplitude, insuffisant pour induire la formation d'un nouveau potentiel d'action. Par contre, en conditions pathologiques, telle qu'en insuffisance cardiaque, l'homéostasie calcique est altérée. Notamment, les RyRs sont alors hyperphosphorylés, soit par la protéine kinase A, activée elle-même par les récepteurs beta-adrénergiques, soit par la calmoduline kinase II. En état hyperphosphorylé, les RyRs se dissocient de la calstabile, une protéine stabilisatrice, et permettent ainsi une fuite anormale de calcium du SR au cours de la diastole. La pompe NCX est alors activée, pour sortir le calcium cytosolique, et génère un courant I_{ti} susceptible d'amener le potentiel membranaire au seuil d'activation et d'engendrer la genèse d'un potentiel d'action prématuré (Pogwizd et Bers, 2004; Nattel et al., 2007). L'initiation d'un potentiel d'action par ce courant dépolarisant dans une région extra-sinuse constitue un foyer ectopique. En insuffisance cardiaque, la diminution du courant I_{K1} , un courant stabilisateur du potentiel membranaire diastolique, pourrait augmenter le risque d'atteindre le seuil d'activation d'un potentiel d'action suite à la genèse d'un courant I_{ti} . De même, la diminution du couplage intercellulaire par les jonctions ouvertes (qui agit comme réservoir ionique) réduirait aussi la stabilité du potentiel de repos, augmentant la sensibilité du potentiel membranaire à un courant I_{ti} .

1.2.5.1.2 Propagation anormale/Réentrée. Les arythmies peuvent survenir suite à la propagation anormale d'un influx, entre différentes zones tissulaires. Dans ce cas, une dépolarisation initiale entraîne la formation d'un potentiel d'action dans une zone donnée. Cette dépolarisation est suivie d'une période réfractaire,

période pendant laquelle le tissu est inactivable. Lorsqu'il y a présence d'un obstacle anatomique ou fonctionnel à proximité, l'influx peut contourner l'obstacle et revenir activer la zone tissulaire par une voie secondaire. Si l'influx revient alors que la zone se trouve en période réfractaire, il est bloqué et sa propagation se termine aussitôt. Dans le cas où la zone tissulaire est revenue à l'état activable avant l'arrivée du front de l'influx, ce dernier réactivera la zone et il y aura alors formation d'un circuit de réentrée. La longueur de l'onde d'un circuit de réentrée (λ) détermine la taille minimale du tissu nécessaire à la formation de ce circuit (figure 4D). Elle est directement proportionnelle au produit de la vitesse de conduction et de la durée de la période réfractaire. Ainsi, l'augmentation de la vitesse de conduction ou de la durée de la période réfractaire augmente les possibilités que le front d'une onde de dépolarisation soit arrêté par la présence de tissu non-activable en aval du front. De même, toute pathologie entraînant un raccourcissement de la période réfractaire ou une diminution de la vitesse de conduction tend à raccourcir la longueur d'onde (ce qui réduit la taille des circuits) et favorise la formation de multiples circuits de réentrée dans une masse de tissu donnée.

1.2.5.2 Mécanismes de la fibrillation auriculaire.

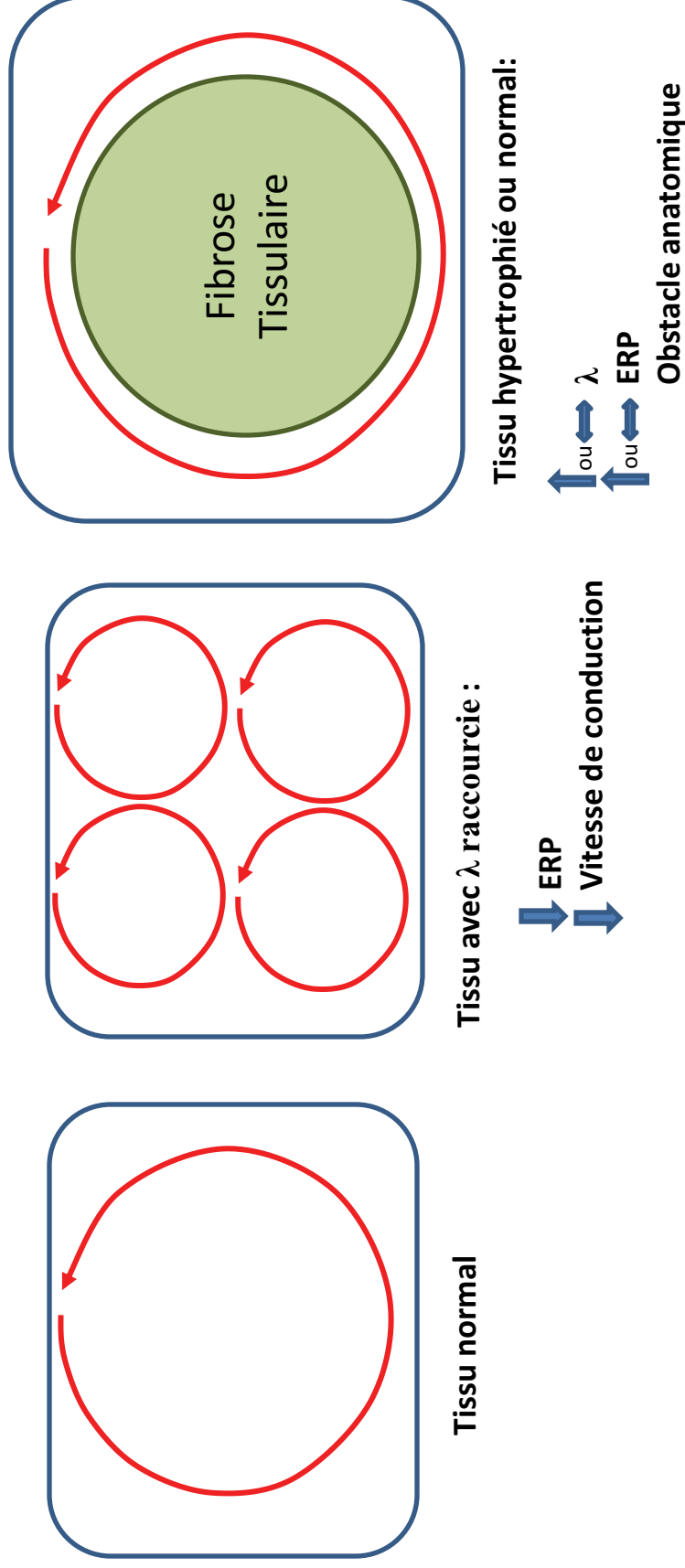
La fibrillation auriculaire est généralement associée à la présence de troubles de propagation, engendrant la formation d'un ou de multiples circuits de réentrée. L'évolution des concepts portant sur la nature de la fibrillation auriculaire au cours des cent dernières années, est passée de la théorie de multiples circuits de réentrée (Garrey, 1924; Mines, 1914) à celle d'un circuit unique (Lewis et *al.*, 1921). Les travaux de Moe et *al.* (1964) ont par la suite clarifié l'hypothèse de multiples circuits de réentrée, laquelle est demeurée privilégiée jusqu'à tout récemment. Selon cette hypothèse, la fibrillation auriculaire serait formée de multiples circuits de réentrée indépendants, variables dans l'espace et le temps (Nattel, 2002). Les travaux effectués dans le

laboratoire de Maurits Allessie sur des cœurs de lapins et de chiens (Allessie et *al.*, 1977; Rensma et *al.*, 1988) ont permis de démontrer que la longueur d'onde était déterminante des propriétés et de la probabilité de formation d'un circuit de réentrée. Allessie et ses collaborateurs (1988) ont amené alors la théorie du circuit-mère, selon laquelle un circuit de réentrée se forme naturellement de la taille de sa longueur d'onde. De ce circuit émaneraient des ondes d'activation centripètes, lesquelles maintiendraient le cœur du circuit en période réfractaire, donc inactivable. Des ondes centrifuges seraient aussi émises, propageant le courant de façon excentrique. Plus récemment, des études expérimentales (Winfree, 1972) combinées à des études numériques/théoriques (Panfilov et Pertsov 1982; Winfree, 1991) ont suggéré la théorie de l'onde en spirale, qui remplacerait la théorie du circuit-mère et permettrait notamment d'expliquer l'efficacité des anti-arythmiques de classe I dans la suppression de la fibrillation auriculaire (Nattel et *al.*, 2005).

Dans certaines conditions pathologiques, la présence d'un circuit unique de réentrée peut entraîner une fibrillation par diffusion d'ondes de fibrillation (Shoda et *al.*, 1997). Par exemple, l'insuffisance cardiaque, bien que reconnue comme condition pathologique favorisant la fibrillation auriculaire, tend à induire une prolongation de la durée du potentiel d'action (Li et *al.*, 2000), donc une augmentation de la longueur d'onde et de la taille d'un circuit de réentrée. La macro-réentrée serait alors possible, considérant la présence de fibrose interstitielle auriculaire, typiquement présente en insuffisance cardiaque, qui agirait comme barrière de conduction qui stabiliserait un large circuit de réentrée (Nattel et *al.*, 2005) (figure 5).

L'implication d'une automaticité anormale dans la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire a été démontrée par Haïssaguerre et *al.* (1998), qui a observé chez certains patients la présence de foyers de stimulation ectopique, généralement localisés à proximité des veines pulmonaires. D'autres foyers ectopiques ont par la suite été démontrés au niveau de la veine cave supérieure

Figure 5.



Pas de FA soutenue

**FA a multiples circuits
de micro-réentrée**

FA a macro-réentrée

(Tsai et *al.* 2000), du ligament de Marshall (Doshi et *al.* 1999), de la cristæ terminalis et du sinus coronaire, bien que les veines pulmonaires demeurent la plus fréquente source d'activité ectopique connue. Le mécanisme responsable de l'activité pulmonaire demeure mal défini. Le courant cationique non-sélectif I_{ns-st} sensible à l'étirement pourrait être activé au niveau des veines pulmonaires, par le flot sanguin pulsatile (Nattel, 2002). Ce courant, qui permet une entrée de sodium et une sortie de potassium, dépolarise la cellule au potentiel de repos, favorisant une activité ectopique. Ainsi, I_{ns-st} pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la fibrillation auriculaire, soit au niveau des veines pulmonaires, ou de toute autre région soumise à un stress d'étirement.

L'utilisation de modèles animaux a permis de démontrer que les différentes pathologies associées avec l'augmentation de l'incidence de fibrillation auriculaire entraînaient fréquemment des changements des propriétés du tissu auriculaire (Nattel et *al.*, 2005). L'ensemble de ces changements de propriétés, électrophysiologiques ou structurels, sont regroupés sous le terme de remodelage auriculaire. Ces changements diffèrent selon la pathologie sous-jacente.

1.2.6 Remodelage auriculaire

1.2.6.1 Le remodelage auriculaire induit par tachycardie auriculaire ou fibrillation auriculaire.

1.2.6.1.1 Altérations des propriétés électrophysiologiques. Au point de vue clinique, la FA est fréquemment initialement paroxysmale et devient de plus en plus fréquente et de plus longue durée, pour finalement devenir soutenue. Wijffels et *al.* ont montré, en 1995, comment les changements électrophysiologiques engendrés par la FA facilitaient l'induction et la

perpétuation d'autres événements arythmiques (Wijffels et *al.*, 1995). Différents modèles expérimentaux ont par la suite confirmé ces observations, démontrant notamment que la tachycardie auriculaire favorisait l'avènement de fibrillation auriculaire, entraînait un raccourcissement de durée de la période réfractaire spatialement hétérogène et diminuait l'adaptation de la durée de la période réfractaire au rythme cardiaque (Morillo et *al.*, 1995; Gaspo et *al.*, 1997; Fareh et *al.*, 1998).

Au point de vue cellulaire, Yue et *al.* (1997) ont démontré un changement important de la morphologie du potentiel d'action sur des cellules isolées, provenant d'oreillettes de chiens soumis à une tachycardie auriculaire. La modification de la morphologie du potentiel d'action, caractérisée par un raccourcissement de la phase plateau, a été associée à une diminution du courant I_{Ca-L} et pouvait être restitué au niveau contrôle en présence de BayK 8644. Yue a aussi démontré une diminution du courant repolarisant I_{to} , mais une absence de changement significatif des courants I_{Ca-T} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} et I_{K1} . Dans une étude subséquente, Yue a démontré que le changement de ces courants ioniques pouvait être attribuable à un changement du niveau d'expression des ARN messagers codant pour la sous-unité α_{1c} du canal calcique de type-L et pour la sous-unité Kv4.3 responsable du courant I_{to} (Yue et *al.*, 1999). Parallèlement, la densité de courant I_{Ca-L} et I_{to} s'est avéré diminuée chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (Van Wagoner et *al.*, 1997; Bosch et *al.*, 1999; Van Wagoner et *al.*, 1999). Ce changement a été associé avec une diminution des ARN messagers codant pour la sous-unité α_{1c} du canal calcique de type-L et Kv4.3 du canal potassique transitoire sortant (I_{to}). Dans certains modèles de tachycardie auriculaire, la diminution de la vitesse de conduction peut être attribuée à une diminution du courant sodique (I_{Na}) (Gaspo et *al.*, 1997). Finalement, la diminution hétérogène du niveau d'expression de la connexine-40 (Van der Velden et *al.*, 2000) entraîne un découplage électrique

intercellulaire qui diminue la stabilité du potentiel membranaire et augmente sa sensibilité aux courants ectopiques.

1.2.6.1.2 Altérations structurelles et ultra-structurelles. Les changements électrophysiologiques induits par la tachycardie auriculaire surviennent fréquemment dans les premières heures ou les premiers jours suivant le début du traitement. Cependant, la tachycardie, sur une période prolongée, entraîne aussi des changements morphologiques et ultra-structuraux. Le changement architectural principalement observé est la disparition progressive de la structure contractile (les sarcomères), d'abord périnucléaire, mais de plus en plus étendue. L'espace est alors remplie de dépôts de glycogène (Ausma et *al.*, 1997). L'étude en microscopie électronique en transmission a dévoilé une elongation des mitochondries, une cristæ alignée longitudinalement et une distribution homogène d'hétérochromatine nucléaire dans le modèle de fibrillation auriculaire chez la chèvre (Ausma et *al.*, 2001). Bien que ces changements ne soient pas spécifiquement reconnus comme étant délétères, Ausma et *al.* ont suggéré qu'il s'agirait d'une dé-différentiation cellulaire vers un phénotype fœtal. La diminution du niveau d'expression de certaines protéines caractéristiques des myocytes adultes (ex. : titine et cardiotin) supporte cette hypothèse (Ausma et *al.*, 1997). Chez l'humain, le remodelage électrique induit par la FA est suivie de changements ultrastructuraux dégénératifs des myocytes auriculaires (Mary-Rabine et *al.*, 1983). L'étude de biopsies endomyocardiales de la région septale de l'oreillette droite chez des patients souffrant de FA paroxysmale suggère la présence d'inflammation chronique, de myolyse cytoplasmique, de nécrose de myocytes et de fibrose de remplacement (Frustaci et *al.*, 1997).

1.2.6.1.3 Altérations morphologiques et fonctionnelles. La dilatation des oreillettes est fréquemment associée à la présence de fibrillation auriculaire en clinique (Henry et *al.*, 1976) et pourrait favoriser la FA en procurant la masse tissulaire nécessaire pour permettre formation de multiples circuits de réentrée. La combinaison de la dilatation auriculaire à une myolyse et à un déséquilibre

de l'homéostasie calcique entraînerait une diminution de la contractilité auriculaire et une augmentation du risque de thrombo-embolie (Sun et *al.*, 1998; Schotten et *al.*, 2002). Au point de vue expérimental, l'étude des paramètres fonctionnels auriculaires par échocardiographie dans un modèle canin de tachycardie auriculaire suggère une dilatation des oreillettes (augmentation de la superficie de 24,2%) et une hypocontractilité (diminution de la fraction de raccourcissement de 19,4%) modérée (Shi et *al.*, 2001).

1.2.6.2 Le remodelage auriculaire induit par l'insuffisance cardiaque.

1.2.6.2.1 Altérations électrophysiologiques. Les changements des propriétés électrophysiologiques survenant au cours du développement d'insuffisance cardiaque diffèrent de ceux induits par tachycardie auriculaire. En effet, dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire chez le chien, la durée des périodes réfractaires était prolongée et la conduction électrique locale était hétérogène (Li et *al.*, 1999). L'altération des propriétés électrophysiologiques auriculaires a été également démontrée chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Workman et *al.*, 2001; Skasa et *al.*, 2001).

Au niveau cellulaire, l'insuffisance cardiaque entraîne une prolongation de la durée du potentiel d'action. Dans le modèle d'insuffisance cardiaque canin induit par tachycardie ventriculaire, une diminution de la densité des courants I_{to} , I_{Ks} et I_{Ca} a été observé, alors que le courant relié à la pompe NCX était augmenté et que les courants I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ca-T} demeuraient inchangés (Li et *al.*, 2000). L'augmentation du niveau d'expression de la pompe NCX pourrait être liée au déséquilibre de l'homéostasie calcique. En effet, l'insuffisance cardiaque entraîne une altération du fonctionnement de la pompe SERCA, des récepteurs à la ryanodine et d'autres protéines impliqués dans la régulation du cycle calcique (Sun et *al.*, 1998; Vest et *al.*, 2005; Yeh et *al.*, 2008) qui serait responsable de l'accumulation calcique intracellulaire en diastole. Le

déséquilibre de l'homéostasie calcique affecte la contractilité auriculaire et pourrait favoriser l'augmentation des courants pro-arythmiques I_{ti} reliés à une activité accrue compensatoire de la pompe NCX.

1.2.6.2.2 Altérations des voies de signalisation. Au cours du développement de l'insuffisance cardiaque, différentes voies de signalisations sont altérées. Une étude portant sur l'évolution des changements auriculaires induits par tachycardie ventriculaire chez le chien suggère que l'activation des MAP kinases soit impliquée dans les premières étapes du remodelage auriculaire (Cardin et *al.*, 2003). En effet, l'augmentation du niveau d'expression des MAP kinases phosphorylées (ERK1/2, p38 et JNK) surviendrait dans les premières 24 heures suivant l'induction de la tachycardie. Dans cette étude, il a aussi été démontré qu'il y avait une activation de la Caspase-3, une augmentation du ratio bax/bcl-2 ainsi qu'une augmentation du nombre de myocytes marqués positivement par TUNEL (terminal dUTP nicked-end labeling) au niveau auriculaire, suggérant l'implication du phénomène de l'apoptose dans les premières étapes du remodelage auriculaire induit par tachycardie ventriculaire.

L'équilibre du système rénine-angiotensine-aldostérone est altéré par le développement d'insuffisance cardiaque, en réponse au désordre hémodynamique entraîné par la pathologie. Le niveau circulant d'angiotensine II augmente progressivement avec le développement de l'insuffisance cardiaque. Par contre, le niveau d'angiotensine II tissulaire auriculaire survient rapidement après l'induction de la tachycardie ventriculaire, dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque induite par tachy-stimulation (Cardin et *al.*, 2003). L'angiotensine II tissulaire est aussi augmentée dans le tissu ventriculaire viable de rats soumis à un infarctus du myocarde. Le traitement avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) dans chacun de ces modèles entraîne une réduction de la réponse fibrotique (diminution de la fibrose interstitielle dans le modèle canin et réduction de la zone cicatricielle et du dépôt de collagène chez les rats post-infarctus) (Li et *al.*, 2001; Weber et *al.*, 1997). Une

analyse des études clinique effectuée par Healey et *al.* (2005) a montré que le traitement de patients à l'aide d'un IECA permettait de réduire le risque de fibrillation auriculaire. L'aldostérone, une autre hormone impliquée lors de désordres hémodynamiques, a aussi été démontrée comme ayant des effets pro-inflammatoires et pro-fibrotique (Young et *al.*, 1994; Rocha et *al.*, 2002) et le traitement à la spiro lactone de rats insuffisants cardiaques permet de réduire la fibrose interstitielle auriculaire (Milliez et *al.*, 2005).

La voie de signalisation de TGF β 1 (transforming growth factor-beta 1) serait impliquée dans le remodelage auriculaire et agirait comme un facteur pro-fibrotique important (Roberts et *al.*, 1986; Hanna et *al.*, 2004). Il a été suggéré que TGF β 1 pourrait agir notamment, comme médiateur de l'effet de l'angiotensine II (Burstein et *al.*, 2008). En effet, l'expression de TGF β 1 auriculaire est augmentée par l'angiotensine-II chez l'humain (Kupfetahl et *al.*, 2000). De plus, l'utilisation d'un bloqueur de récepteur à l'angiotensin réduit la fibrose interstitielle ainsi que le taux de TGF β 1 plasmatique chez des patients souffrant d'hypertension liée à la transplantation d'un rein (El-Agroudy et *al.*, 2003). Au niveau des modèles expérimentaux, il a été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine réduirait aussi le niveau d'expression de TGF β 1 ainsi que la fibrose interstitielle ventriculaire dans un modèle de rat insuffisant cardiaque (Ma et *al.*, 2001). Chez le chien soumis à une tachycardie ventriculaire, l'augmentation rapide du niveau tissulaire auriculaire de l'angiotensine II est accompagnée d'une augmentation parallèle du niveau d'expression de TGF β 1 (Hanna et *al.*, 2004). Le traitement à l'enalapril a permis de réduire la fibrose interstitielle auriculaire (Li et *al.*, 2001). Cependant, le niveau d'expression de TGF β 1 suite au traitement à l'enalapril n'a pas été mesuré dans ce modèle.

1.2.6.2.3 Altérations structurelles. La fibrose interstitielle est présente chez les patients atteints de cardiomyopathies dilatées ou hypertrophiques (Ohtani et *al.*, 1995). Elle est aussi présente dans de différents modèles expérimentaux. Dans

le modèle canin d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire, la fibrose interstitielle apparaît progressivement, 1 à 2 semaines après l'initiation de la tachy-stimulation, suivant la phase initiale d'activation de voies de signalisation et de mort cellulaire décrite plus haut (Cardin et *al.*, 2003). La fibrose interstitielle pourrait constituer, dans ce cas-ci, un tissu de remplacement. D'autres études ont démontré qu'une insulte cardiaque pouvait aussi entraîner une fibrose interstitielle en altérant le métabolisme de la matrice extracellulaire et en favorisant un dépôt excessif de collagène (Burstein et *al.*, 2008; Silver et *al.*, 1990; Cleutjens et *al.*, 1995). Dans une étude effectuée sur le modèle d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire, il est apparu que la fibrose interstitielle était un phénomène persistant, malgré l'allocation d'une période de récupération (interruption de la tachystimulation) suffisante pour rétablir les paramètres hémodynamiques à des valeurs normales (Burstein et *al.*, 2009). La persistance de la fibrose interstitielle était accompagnée d'un maintien des troubles de conduction électrique, malgré la régression du remodelage électrique (diminution des altérations des canaux ioniques et des pompes). Une étude effectuée chez le rat suggère que la fibrose interstitielle pourrait être réversible, puisque le traitement chronique avec un antagoniste de l'aldostérone un mois après l'induction d'un infarctus ventriculaire permettait une réduction significative de la fibrose auriculaire (Milliez et *al.*, 2005).

1.2.6.2.4 Altérations morphologiques et fonctionnelles. Différentes études expérimentales ont suggéré que l'insuffisance cardiaque entraînait une dilatation et une hypocontractilité auriculaire (Power et *al.*, 1998). L'étude du changement des propriétés fonctionnelles auriculaires par échocardiographie dans le modèle d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire, a démontré une dilatation (augmentation de la superficie auriculaire diastolique de 80,2%) et une hypocontractilité (diminution de la fraction de raccourcissement de 40,1%) progressive au cours du développement de l'insuffisance cardiaque (Shi et *al.*, 2001). La dilatation importante des oreillettes pourrait faciliter la formation de circuits de réentrée, malgré la prolongation de la durée de la période réfractaire,

donc malgré l'augmentation de la longueur d'onde minimale d'un circuit de réentrée.

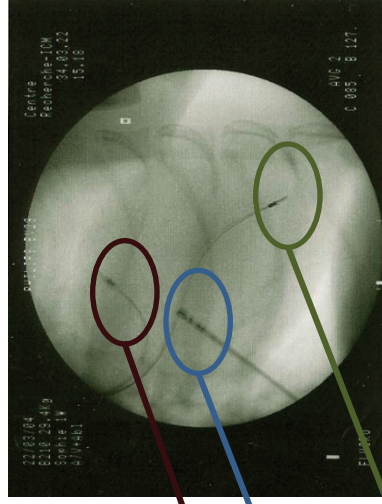
1.2.6.3 Les modèles canins de remodelage auriculaire.

Le modèle de tachycardie auriculaire a été développé dans différentes espèces animales, telles que la chèvre, le porc, le mouton et le chien (Wiffjels et *al.*, 1977; Alessie et *al.*, 1977; Dudley et *al.*, 2005; Chen et *al.*, 2008; Fareh et *al.*, 1998; Goette et *al.*, 1996; Anné et *al.*, 2007). Chez le chien, la tachycardie est induite par l'implantation d'un pacemaker relié à une électrode insérée via la veine jugulaire et accrochée à la paroi atriale droite. Le pacemaker est programmé pour envoyer des influx électriques à une fréquence de 400 bpm. L'ablation du nœud auriculo-ventriculaire est effectuée pour éviter d'induire une tachycardie ventriculaire, qui entraînerait le développement potentiel d'une insuffisance cardiaque du remodelage tissulaire associé. Un second pacemaker relié à une électrode insérée via la veine jugulaire et accrochée à la paroi ventriculaire droite. Il permet le maintien du rythme ventriculaire à une fréquence normale de 80 bpm. Les études électrophysiologiques effectuées dans les différentes espèces ont montré que la tachycardie induisait principalement un remodelage de nature électrique, caractérisé par un raccourcissement de la durée de la période réfractaire, une diminution de l'adaptation de la période réfractaire au rythme cardiaque, un ralentissement de la vitesse de conduction et une augmentation de l'inductibilité et du maintien de la fibrillation auriculaire (figure 6).

Le modèle de remodelage auriculaire induit par tachycardie ventriculaire a été principalement étudié chez le chien et le mouton (Li et *al.*, 1999; Tanaka et *al.*, 2007). Chez le chien, la tachycardie est induite par l'implantation d'un pacemaker relié à une électrode insérée via la veine jugulaire et accrochée à la paroi ventriculaire droite. Le pacemaker est programmé pour envoyer des influx électriques à une fréquence de 220-240 bpm. Ce modèle est associé au

Figure 6.

Tachycardie auriculaire Modèle ATP



Tachystimulation
oreillette droite
(400bpm)

Ablation
Noeud A-V

Maintien rythme
normal ventriculaire
(80bpm)



Remodelage électrique

$\downarrow I_{Ca-L}$ $\downarrow I_{to}$ $\downarrow I_{Na}$

Remodelage fonctionnel

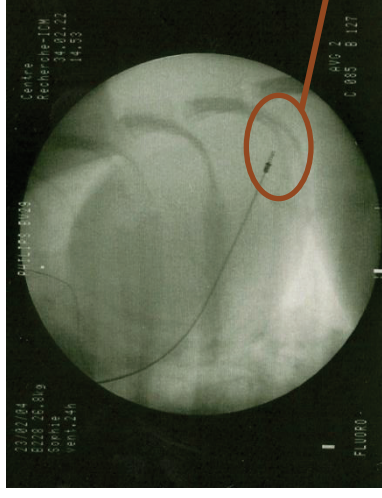
Dilatation des oreillettes
Hypocontractilité

$\downarrow ERP$ $\downarrow APD$

CV X ERP = λ

$\downarrow$ Longueur
d'onde

Tachycardie ventriculaire Modèle VTP



Tachystimulation
ventricule droit
(240bpm)



Remodelage structurel

Fibrose interstitielle
+
Baisse expression/
relocalisation
connexines

Remodelage fonctionnel

Dilatation des oreillettes
Hypocontractilité

Remodelage électrique

$\downarrow I_{to}$ $\downarrow I_{Ca-L}$ $\downarrow I_{NCX}$ $\downarrow I_{Ks}$

$\uparrow APD$ $\uparrow ERP$

Hétérogénéité de conduction

$\uparrow$ Longueur
d'onde

?

Fibrillation
auriculaire

développement progressif d'une insuffisance cardiaque congestive et entraîne un remodelage différent de celui induit par tachycardie auriculaire, principalement caractérisé par des changements structuraux tels que la dilatation et la fibrose interstitielle (Shi et *al.*, 2001; Li et *al.*; 2001). (figure 6)

1.2.7 Le traitement de la fibrillation auriculaire.

Le traitement de la fibrillation auriculaire a pour objectif de contrôler le rythme ou la fréquence cardiaque ainsi que de prévenir le risque de thrombo-embolie. Le contrôle de la fréquence cardiaque est une stratégie qui vise à contrôler la fréquence ventriculaire, sans se préoccuper du rythme sinusal. Le contrôle du rythme est, au contraire, une stratégie qui vise au maintien du rythme sinusal, sans cependant négliger la surveillance de la fréquence cardiaque. Selon les études cliniques AFFIRM et RACE (The AFFIRM investigators 2002 ; Hagens et *al.*, 2004), aucune des deux stratégies ne serait plus avantageuse pour améliorer la qualité de vie et réduire les taux de mortalité et de morbidité associés à la FA. Le choix de l'une ou l'autre des stratégies dépend donc de la condition clinique de chaque patient. Dans tous les cas, il importe de prévenir le risque de thrombo-embolie associé à la FA (Fuster et *al.*, 2006).

1.2.7.1 Le contrôle de la fréquence cardiaque.

Le contrôle de la fréquence cardiaque vise à court terme à l'amélioration de la condition hémodynamique du patient, par un maintien de sa fréquence cardiaque ventriculaire entre 60 et 80 bpm au repos et entre 90 et 115 bpm lors d'exercices d'intensité modérée. L'approche pharmacologique est la plus fréquemment utilisée pour le contrôle de la fréquence cardiaque. Bien que l'ablation du nœud A-V accompagnée d'un pacing électrique permanent du

ventricule droit permette une grande atténuation des symptômes associés à la FA, il semble que cette option entraîne un désordre hémodynamique important.

1.2.7.1.1 Contrôle de la fréquence cardiaque : approches pharmacologiques. Les déterminants majeurs de la fréquence cardiaque durant la FA sont les propriétés de conduction et la période réfractaire du nœud AV ainsi que le tonus sympathique et parasympathique. Chez les patients ayant une fibrillation persistante ou permanente, l'utilisation d'un bêta-bloqueur (esmolol, metoprolol, propranolol) ou d'un antagoniste des canaux calciques non-hydropyridine (verapamil, diltiazem) est recommandé (Fuster et *al.*, 2006). Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, ou de dysfonction ventriculaire, le contrôle de la fréquence cardiaque en FA est effectué par l'utilisation de digoxine ou d'amiodarone. L'utilisation de drogues combinées est nécessaire pour le maintien de la fréquence cardiaque chez certains patients. La combinaison de digoxine et d'un bêta-bloqueur (aténolol, pindolol), par exemple, permet une action synergique sur le nœud A-V et un meilleur contrôle de la fréquence ventriculaire à l'exercice (Farshi et *al.*, 1999). Dans les études cliniques, l'efficacité des interventions pharmacologiques pour le contrôle de la fréquence cardiaque est estimée à 80% (Weerasooriya et *al.*, 2003).

1.2.7.1.2 Contrôle de la fréquence cardiaque : approches non-pharmacologiques. La stimulation électrique à l'aide d'un pacemaker peut être utile chez les patients montrant une forte variabilité du rythme ventriculaire. La stimulation électrique à la fréquence de conduction approximative du nœud A-V et permet de régulariser le rythme au cours d'un épisode de FA. Elle permet aussi d'éviter une bradycardie au repos, induite par l'utilisation de médicaments. L'ablation du nœud A-V ou de voies de conduction accessoires est recommandable lorsque le traitement pharmacologique s'avère inefficace pour le contrôle de la fréquence ventriculaire ou lorsqu'il est associé à des effets secondaires importants. L'ablation du nœud A-V, combinée à l'implantation d'un pacemaker permanent, constitue un moyen efficace de contrôler la fréquence

cardiaque, de réduire les symptômes et d'améliorer la qualité de vie des patients. Les désavantages liés à cette approche incluent une perte de synchronie oreillette-ventricule, un besoin à vie d'utilisation d'anticoagulants et une dépendance à vie au pacemaker.

1.2.7.2 Cardioversion et maintien du rythme sinusal.

1.2.7.2.1 La conversion d'une FA au rythme sinusal s'avère efficace dans la majorité des cas par courant direct et dans plusieurs cas par l'utilisation de drogues anti-arythmiques. Cependant, en l'absence de traitement pharmacologique subséquent à la cardioversion, pour le maintien du rythme sinusal, la FA s'avère récurrente chez près de trois personnes sur quatre. Un désavantage de la cardioversion par courant électrique est la nécessité d'une anesthésie ou d'une sédation. Le risque de thrombo-embolie suite à la cardioversion pharmacologique est similaire au risque associé à une cardioversion électrique. En effet, la stase sanguine causée par la fibrillation auriculaire favorise la formation de caillots sanguins dans la cavité auriculaire. Lors d'une cardioversion, le retour au rythme sinusal entraîne le retour de la contraction auriculaire, laquelle peut induire le délogement de caillots frais qui retourneront dans la circulation sanguine et pourraient entraîner une thrombo-embolie. Il importe donc de précéder un traitement de cardioversion, pharmacologique ou électrique, d'une période de traitement avec des anti-coagulants. Ceci permet de prévenir la formation de trombi frais, faciles à déloger, dans la période précédant la cardioversion. En cas de nécessité d'une conversion rapide (hypotension, faible débit cardiaque), l'utilisation d'héparine comme anti-coagulant peut être envisagée. Une échocardiographie trans-oesophagiale doit alors précéder la cardioversion afin de confirmer l'absence de thrombi.

La cardioversion pharmacologique de la fibrillation auriculaire peut se faire de façon sécuritaire, en milieu hospitalier, par l'administration d'agents de classe

IC (flecainide, propafenone), des bloqueurs de I_{Na} , qui agissent en ralentissant la vélocité de conduction dans le tissu cardiaque. L'utilisation d'amiodarone est préférable chez les patients souffrant de dysfonction ventriculaire, bien que le temps de conversion soit alors prolongé. L'administration de dofetilide est parfois utilisée dans la conversion de FA de longue durée. Le traitement pour la conversion peut être administré sous forme de bolus intraveineux, sur une courte période, ou de thérapie orale, sur une plus longue période de temps. La cardioversion pharmacologique est efficace pour retourner au rythme sinusal lorsque la FA a été initiée récemment. La cardioversion devient modérément efficace lorsque la FA est initiée depuis 24 à 48 heures et faiblement efficace dans le cas de FA persistente. La cardioversion électrique est alors généralement de mise. La cardioversion pharmacologique comporte des risques importants pro-arythmiques, liés à l'utilisation d'anti-arythmiques classiques, tels que l'induction de flutter auriculaire avec rythme ventriculaire rapide, de torsades de pointes, de bradycardie, de tachycardie ventriculaire et d'arrêt cardiaque.

1.2.7.2.2 Le maintien du rythme sinusal. L'utilisation de l'ablation ou de médicaments peut être efficace pour le maintien du rythme sinusal. L'approche pharmacologique est généralement le premier choix alors que l'ablation demeure l'approche de deuxième intention (Fuster et *al.*, 2006).

L'amiodarone s'est avéré plus efficace que les anti-arythmiques de classe I, le sotalol ou un placebo pour le maintien à long terme du rythme sinusal (AFFIRM). Son utilisation dans le contrôle du rythme montre l'avantage d'avoir aussi un effet sur le contrôle de la fréquence ventriculaire, ce qui permet d'éviter son utilisation en combinaison avec un autre anti-arythmique. Cependant, sa toxicité potentiellement sévère extracardiaque en fait un agent de deuxième intention ou de dernière ressource dans plusieurs cas. La dofetilide s'est avérée un choix efficace (58% vs 25% avec placebo) pour le maintien du rythme sinusal jusqu'à 1 an après une cardioversion (SAFIRE-D, Singh et *al.*, 2000). L'étude

DIAMOND a montré une efficacité accrue de dofétilide pour le maintien du rythme sinusal chez les patients souffrant de dysfonction ventriculaire (78%), comparativement aux contrôles placebo (42%) (Pedersen et *al.*, 2001). Plusieurs études ont montré l'efficacité de la flécaïnide à retarder la récurrence de la FA (Naccarelli et *al.*, 1996; Van Wijk et *al.*, 1989). Son utilisation est recommandée pour le maintien du rythme sinusal chez des patients souffrant de FA sans dysfonction ventriculaire. Sotalol et propafénone seraient d'une efficacité semblable pour le maintien du rythme sinusal chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire. L'étude CTAF (Roy et *al.*, 2000) suggère une moins grande efficacité de sotalol et propafénone (39%), comparativement à amiodarone (69%). L'utilisation de sotalol doit être évitée chez les patients souffrant d'asthme, d'insuffisance cardiaque ou rénale ou d'une prolongation de l'intervalle Q-T.

Le maintien du rythme sinusal, comparativement au contrôle de la fréquence cardiaque, permet de prévenir le remodelage auriculaire et de maintenir une meilleure fonction cardiaque et une meilleure qualité de vie, tout en réduisant les risques thrombo-emboliques. Cependant, l'utilisation d'anti-arythmiques dans le maintien du rythme sinusal demeure d'une efficacité limitée. De plus, comme aucun de ces composés n'agit spécifiquement au niveau auriculaire, leur utilisation s'avère fréquemment pro-arythmique, au niveau ventriculaire. Ainsi, les bénéfices liés au maintien du nœud sinusal sont atténués par la piètre qualité des traitements pharmacologiques actuellement disponibles. Le développement de bloqueurs sélectifs aux canaux ioniques auriculaires ou d'agents non anti-arythmiques semble nécessaire à l'amélioration de l'approche pharmacologique dans le traitement de la fibrillation auriculaire.

1.2.7.3 Autres avenues pharmacologiques.

La nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de la fibrillation auriculaire a dirigé la recherche vers différentes

avenues. Le développement d'anti-arythmiques de classe III moins toxique a été envisagé. Différents composés tels que tedisamil, RSD 1235 et dronedarone se sont montrées efficaces pour la cardioversion et entraîneraient moins d'effets secondaires que les anti-arythmiques couramment utilisés (Hohnloser et *al.*, 2004; Roy et *al.*, 2003; Touboul et *al.*, 2003). De plus, dronedarone, un congénère de l'amiodarone, serait efficace pour le maintien du rythme sinusal (Hohnloser et *al.*, 2009) et le contrôle de la fréquence cardiaque en FA (Singh et *al.*, 2007), sans entraîner d'effets secondaires importants. D'autres études cliniques doivent être effectuées afin de mieux définir l'efficacité et la toxicité des nouveaux composés, comparativement à ceux déjà disponibles, dans différentes conditions pathologiques (ex. : insuffisance cardiaque, hypertrophie ventriculaire).

Le développement d'anti-arythmiques spécifiques aux oreillettes a aussi permis la venue de composés pharmacologiques prometteurs. En effet, des bloqueurs de courant I_{Kur} , spécifique aux oreillettes, ont été testés chez des cochons anesthésiés (Knobloch et *al.*, 2004). Les bloqueurs de I_{Kur} (AVE0118, S9947, S20951) prolongent la période réfractaire auriculaire et diminuent la vulnérabilité de l'oreillette gauche, sans affecter la repolarisation ventriculaire. Dans le cœur de lapins isolé et perfusé en Langendorf, AVE0118 a induit une prolongation de la période réfractaire, une diminution de l'inductibilité de la FA et un retour au rythme sinusal avec une efficacité dose-dépendante (Löfberg et *al.*, 2006). Un autre composé sélectif aux oreillettes, venalarkant, agit sur différents canaux ioniques. Le blocage des canaux ioniques est dose-, fréquence cardiaque- et voltage-dépendant. Venalarkant est un anti-arythmique de classe III qui prolonge la période réfractaire et réduit la durée des épisodes de fibrillation auriculaire paroxysmale, notamment par son effet sur le courant I_{Na} . Sa spécificité pour des courants atriaux réduit le risque d'effets pro-arythmiques ventriculaires. Venalarkant est présentement étudié pour sa capacité à maintenir le rythme sinusal (Singh, 2009).

Outre l'utilisation d'anti-arythmiques, de nouvelles approches pharmacologiques ont été testées, basées sur la prévention du remodelage auriculaire qui sous-tend la FA. Par exemple, en condition d'insuffisance cardiaque, le remodelage électrique, contractile et structurel contribuerait à la promotion de la fibrillation auriculaire de façon synergique. L'utilisation de traitements préventifs capables d'inhiber un ou plusieurs aspects du remodelage permettrait d'interférer avec cette synergie et de réduire le risque de développer de la fibrillation auriculaire. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine s'est avérée efficace pour diminuer la durée des fibrillations auriculaires induites chez le chien en insuffisance cardiaque par la prévention partielle du remodelage structurel arythmogénique (Li et *al.*, 2001). L'effet bénéfique de ce traitement a aussi été démontré chez les patients souffrant de dysfonction ventriculaire gauche (Vermes et *al.*, 2003).

Le rôle de l'inflammation et du stress oxydatif a été récemment étudié au niveau clinique et dans certains modèles expérimentaux. L'étude de conduction effectuée dans un modèle canin de péricardite stérile suggère une altération de la conduction atrial induite par l'inflammation, via la création de circuits de réentrée instables (Kumagai et *al.*, 1997). Ainsi, l'utilisation de simvastatin (Shiroshita-Takeshita et *al.*, 2004) et de prednisone (Shiroshita-Takeshita et *al.*, 2006), a été testée dans la prévention du remodelage induit par tachycardie auriculaire. Ces drogues ont montré un potentiel thérapeutique intéressant pour la prévention de la FA, qui devrait être davantage exploré.

1.2.7.4 Traitement anti-thrombotique.

La sélection d'un anti-thrombotique est recommandée pour la plupart des patients souffrant de fibrillation auriculaire. La sélection de l'agent anti-thrombotique est basée sur le risque absolu de saignement et de formation de thrombus du patient. Le traitement chronique à l'aide d'un anticoagulant oral, anti-vitamine K, est recommandé chez les patients en FA sans trouble valvulaire.

L'INR (*International Normalized Ratio*), un indice du temps de coagulation plasmatique, doit alors être mesuré sur une base régulière (d'abord périodique, puis mensuelle) afin d'ajuster adéquatement la dose d'anti-vitamine K. L'aspirine (81-325mg) peut être utilisée comme traitement alternatif chez les patients à faible risque ou avec contrindications d'utilisation de l'anti-vitamine K (Fuster et al., 2006).

Section 1.3. L'insuffisance cardiaque.

1.3.1 Définition

L'insuffisance cardiaque peut être définie comme un syndrome clinique qui survient lorsque le cœur devient incapable de pomper une quantité suffisante de sang pour répondre aux besoins métaboliques systémiques. Cette incapacité peut provenir d'une dysfonction systolique ventriculaire, reflétant une incapacité du cœur à se vider. L'incapacité cardiaque peut aussi provenir d'une dysfonction diastolique ventriculaire, reflétant un trouble de remplissage cardiaque. Lorsque l'insuffisance cardiaque est congestive, elle est accompagnée de dyspnée, de fatigue, de râle pulmonaire, de bruits anormaux ventriculaires et d'œdème périphérique (Hurst's, 1998).

1.3.2 Désordres hémodynamiques

Lors de pathologies telles que les cardiomyopathies dilatées, les myocardites virales ou toxiques et les ischémies myocardiques, la capacité du cœur à éjecter son contenu est altérée. L'altération de la contractilité cardiaque, l'inotropie, mène à une systole insuffisante qui entraîne l'augmentation du volume télé-diastolique. En condition physiologique normale, ceci entraînerait une augmentation du volume d'éjection lors de la contraction subséquente. Cependant, en condition pathologique, une telle adaptation n'est pas possible. Alors, la fraction d'éjection, soit le quotient du volume de sang éjecté du

ventricule gauche lors d'une systole sur le volume de la chambre en télé-diastole, est réduit (inférieur à 45%). Lors de pathologies telles que la tachycardie, l'hypertension ou la cardiomyopathie hypertrophique, c'est la capacité du cœur à se relâcher afin de permettre le remplissage, la lusitropie, qui est affectée. Cette dysfonction diastolique résulte en une augmentation de la pression de remplissage et éventuellement en œdème pulmonaire (Hurst's, 1998).

Le développement de l'insuffisance cardiaque débute généralement par une phase compensatoire. Durant cette période, le débit cardiaque et la fonction cardiaque peuvent être maintenus malgré la dysfonction myocardique, par des mécanismes compensatoires tels que l'hypertrophie, la dilatation cardiaque, la vasoconstriction périphérique, l'activation du système neuroendocrinien, la sécrétions de peptides vasoactifs (angiotensine, endothéline, vasopressine, peptides natriurétiques ANP et BNP) et la rétention de fluides par les reins. Ceci permet de maintenir un débit cardiaque et une pression artérielle normale, malgré la dysfonction cardiaque. Cependant, à long terme, tous ces changements deviennent décompensatoires et aggravent la condition pathologique.

Le développement de l'insuffisance cardiaque est associé à un ensemble de changements qui surviennent au cours de son évolution, et qui diffèrent d'une chambre à l'autre.

1.3.3 Changements structurels cardiaques

1.3.3.1 L'hypertrophie

L'hypertrophie pathologique correspond à une augmentation de la taille du cœur. Elle constitue initialement un mécanisme compensatoire, mais le changement de la morphologie cardiaque entraîne à long terme une dysfonction

ventriculaire. Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque diastolique, les mesures en échocardiographie montrent une augmentation de la masse ventriculaire ainsi que du volume et de la rigidité auriculaire (Kurt et *al.*, 2009). De façon similaire, les mesures échocardiographiques, effectuées dans un modèle chronique de chien soumis à une tachycardie ventriculaire (120bpm) pour une période de 10 mois, ont montré une dilatation importante ventriculaire, une augmentation de la masse ventriculaire et une baisse de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement ventriculaire. Les études hémodynamiques effectuées sur des modèles animaux d'insuffisance cardiaque montrent également une diminution de la force maximale de contraction ainsi qu'une diminution de la relaxation ventriculaire (Lapointe et *al.*, 2002; van der Welden et *al.*, 2004). L'altération de la structure sarcomérique dans les cardiomyocytes serait impliquée dans la dysfonction contractile survenant au cours du développement de l'insuffisance cardiaque (Hamdani et *al.*, 2008). L'un des changements notoire associé à l'altération de la fonction sarcomérique est lié au changement de l'isoforme de chaîne lourde de myosine, normalement principalement de type α (ATPase rapide : α MHC) qui devient principalement de type β (ATPase lente : β MHC) en insuffisance cardiaque (Hamdani et *al.*, 2008). Chez les patients atteints de cardiomyopathie obstructive hypertrophique, l'expression de chaîne légère de myosine serait aussi altérée, montrant une augmentation du niveau d'expression de la forme auriculaire, qui serait associé à une augmentation de la force de développement maximale ventriculaire (Ritter et *al.*, 1997). L'étude de souris montrant une expression de p38 constitutivement active au niveau cardiaque a suggéré une association entre le niveau de phosphorylation de la tropomyosine et la force maximale générée par les sarcomères, indépendamment de l'homéostasie calcique (Vahebi et *al.*, 2007; Liao et *al.*, 2002). Le changement de l'expression du type de Troponine T a été rapporté, en condition d'insuffisance cardiaque, mais l'impacte de ce changement sur la force générée semble limité selon les résultats observés *in vitro* (LeWinter, 2005). Enfin l'état de phosphorylation de certaines protéines

telles que la troponine T et la troponine I pourrait affecter la sensibilité submaximale des myofilaments au calcium (LeWinter, 2005).

1.3.3.2 La fibrose interstitielle

1.3.3.2.1 Effet de la fibrose sur la fonction cardiaque. Une étude de Piper et *al.* (2003) a montré une augmentation significative de la fibrose interstitielle ventriculaire chez des patients souffrant d'une insuffisance cardiaque secondaire à une sténose aortique ($5,7 \pm 4,1 \text{ g/m}^2$), une régurgitation aortique ($8,8 \pm 4,9 \text{ g/m}^2$) ou une régurgitation mitrale ($4,7 \pm 2,8 \text{ g/m}^2$), comparativement aux patients « contrôles » ayant une cardiomyopathie faible ($2,3 \pm 1,5 \text{ g/m}^2$). Une étude clinique utilisant l'imagerie par résonance magnétiques, a montré que la présence de marqueur de fibrose interstitielle était associé à un risque élevé d'incidents cardiaques (Cho et *al.*, 2010). Dans une autre étude, la détérioration de la fonction ventriculaire gauche, évaluée par échocardiographie, était proportionnelle à l'augmentation de l'expression de MMP-2 et TIMP-2 (Yokoseki et *al.*, 2000). Chez le hamster cardiomyopathique Bio 53.58 et 14.6, l'apparition d'une nécrose myocytolitique cardiaque et squelettique apparaît 30 à 60 jours après la naissance. L'hypertrophie ventriculaire progresse alors, accompagnée d'un dépôt fibrotique, d'une synthèse élevée de collagène I et III et d'une augmentation des niveaux d'expression des metalloprotéinases-1,-2,-3,-9 et des inhibiteurs de metalloprotéinases TIMP-1 et TIMP-2 (Masutomo et *al.*, 2001). Dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque, la fibrose interstitielle s'est développée de façon progressive, au niveau ventriculaire et auriculaire, mais était quantitativement beaucoup plus élevée au niveau auriculaire qu'au niveau ventriculaire ($9,9 \pm 1,3\%$ vs $0,4 \pm 0,1\%$ à 5 semaines VTP) (Hanna et *al.*, 2004).

1.3.3.2.2 Les fibroblastes et la fibrose. Les fibroblastes jouent un rôle prédominant dans la synthèse et le maintien de la matrice extracellulaire. En cas de dommage tissulaire, la réponse cellulaire inclut une infiltration des cellules immunitaires et inflammatoires, une dégradation des cellules nécrotiques, une

phagocytose des débris cellulaires et une réparation du tissu endommagé par les fibroblastes, qui migrent en réponse à la présence d'agents chimiotactiques. Les fibroblastes se mettent alors à proliférer pour produire un tissu cicatriciel et synthétiser une matrice extracellulaire de réparation (Brown et *al.*, 2005). En conditions pathologiques, tel qu'en hypertension, en insuffisance cardiaque ou subséquemment à un infarctus du myocarde, les fibroblastes cardiaques sont soumis à des signaux chimiques (cytokines proinflammatoires, peptides vasoactifs, hormones) et physiques (étirement) lesquels entraînent une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Les myofibroblastes expriment certaines protéines contractiles telles que l'actine alpha du muscle lisse (alpha smooth muscle actin : α -SMA) et montrent alors un potentiel migratoire, prolifératif et sécrétoire exacerbé (Porter & Turner, 2009; Brown et *al.*, 2005). De plus, elles répondent fortement aux cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β), aux peptides vasoactifs (endothéline-1, angiotensin II, ANP et BNP) et à certaines hormones (ex. : noradrénaline). Les myofibroblastes répondent aussi au stress mécanique et à l'ischémie. Ils modulent alors la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire par l'activation de métalloprotéinases (MMPs) et d'inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs). Les fibroblastes sécrètent aussi des protéines fibrillaires telles que le collagène et la fibronectine pour renforcer le muscle cardiaque (Porter et Turner, 2009). Le nombre de fibroblastes intramyocardiques fluctue en fonction des signaux physiologiques et s'accroît en condition pathologique, lors du remodelage ou de la réparation cellulaire.

Les fibroblastes, des cellules d'origine mésenchymateuse, ne possèdent pas de membrane basale et ont la possibilité de migrer et se s'étendre. Ces cellules possèdent un noyau ovale, un réticulum endoplasmique rugueux et un système Golgi très développés et une forte granularité cytoplasmique (Baudino et *al.*, 2006). Lorsqu'ils sont différenciés en myofibroblastes, leur contenu en protéines contractiles pourrait jouer un rôle important dans la fermeture d'une cicatrice et le maintien de son intégrité. Au cours du processus de guérison d'une

cicatrice, le passage du tissu granuleux à la cicatrice mature serait associé à une apoptose des myofibroblastes.

L'origine des fibroblastes cardiaques pourrait varier selon le stade de développement. Au stade embryonnaire, les fibroblastes proviendraient de la différenciation de cellules pro-épicaudiales et endocardiales par transformation épithéliale-mésenchymale (Baudino et *al.*, 2006). Au stade foetal, les fibroblastes proviendraient des mesoangioblastes, des cellules progénitrices d'origine mésodermale, dérivées de la moëlle osseuse (Cossu et Bianco, 2003). Chez l'adulte, la densité des fibroblastes s'accroît au cours de la fibrose myocardique, un processus associé à différentes conditions pathologiques (Bing et *al.*, 1997). Cette augmentation du nombre de fibroblaste pourrait résulter d'un accroissement de la prolifération cellulaire ou du recrutement de cellules progénitrices mésenchymales (Baudino et *al.*, 2006).

1.3.3.2.3 Les peptides vasoactifs et la fibrose. En insuffisance cardiaque, la sécrétion de peptides vasoactifs survient comme mécanisme compensatoire, pour le maintien du débit cardiaque. Cependant, ces peptides ont aussi un effet pro-fibrotique. En culture cellulaire, le traitement de fibroblastes avec l'endothéline-1 a entraîné une synthèse accrue de collagène, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de MMPs (Guarda et *al.*, 1993). Le traitement de rats soumis à un infarctus du myocarde avec le Bosentan, un antagoniste des récepteurs à l'endothéline, a entraîné une amélioration de la fonction cardiaque ainsi qu'une baisse de la fibrose interstitielle (Mulder et *al.*, 1997). De même, le traitement de fibroblastes en culture avec l'angiotensine II entraîne une prolifération cellulaire et un dépôt de collagène, de fibronectine et de laminine (Bouzeghrane et Thibault, 2002). Cette réponse serait induite par les récepteurs à l'angiotensine AT-1 et impliquerait TGF β et la cascade des MAP kinases (Gao et *al.*, 2009).

1.3.3.2.4 *TGF β et la fibrose.* La présence d'un taux élevé de TGF β a été rapporté chez les patients souffrant de cardiomyopathies dilatées ou hypertrophiques (Pauchinger et *al.*, 1999; Li et *al.*, 1998). TGF β était aussi élevé dans des modèles animaux d'insuffisance cardiaque induite par constriction aortique ou par tachycardie ventriculaire (Li et *al.*, 2009; Hannah et *al.*, 2004). Des études *In vitro* montrent que le traitement de fibroblastes avec TGF β entraîne une synthèse de protéines telles que le collagène (type fibrillaire), la fibronectine et certains protéoglycans, en plus d'une prolifération cellulaire et d'une différenciation en myofibroblastes (Heimer et *al.*, 1995; Eghbali et *al.*, 1991). Chez les souris hétérozygotes TGF β (+/-), on constate une diminution de la fibrose myocardique associée au vieillissement, accompagné d'une baisse de la rigidité du muscle cardiaque (Brook et Conrad, 2000). La surexpression de TGF β chez la souris entraîne une hypertrophie cardiaque accompagnée de fibrose interstitielle (Rosenkranz et *al.*, 2002).

Les récepteurs de TGF β sont divisés en deux familles, soit les récepteurs de type I et de type II. Lorsque TGF β est présent sous forme de dimère, il se lie à deux récepteurs de type II. Le complexe est alors reconnu et recrute deux récepteurs de type I. La liaison des récepteurs de type I résulte en la formation d'un hétérotétramère. La formation du complexe ligand-récepteurs entraîne la phosphorylation de résidus sérines et thréonines sur les récepteurs de type I, par les récepteurs de type II. L'activation des récepteurs de type I, par leur phosphorylation, permet l'initiation de la signalisation par les protéines SMADs (Massagué, 1998). Les protéines de la famille Smad sont divisés en trois sous-familles, soit i) les Smads directement activés par les récepteurs de TGF β , ii) les Smads qui collaborent à la signalisation par association aux Smads activés par les récepteurs et iii) les Smads antagonistes qui inhibent la signalisation par les autres Smads. Chez les mammifères, les Smad-2 et -3 seraient de la sous-famille des Smads directement activés, Smad-4 serait de la sous-famille des Smads collaboratrices et les Smad-6 et -7 seraient inhibitrices. Ainsi, lorsque les récepteurs de TGF β sont activés, les Smad-2 et -3 s'y associe de façon

transitoire afin d'être phosphorylés et activés. Ces Smads activés s'associent alors à Smad-4, pour effectuer une translocation dans le noyau cellulaire, où ils se lient à différentes protéines nucléaires et activent la transcription de gènes tels que c-myc, cdc25A, et collagène $\alpha 2$. La synthèse de collagène par les fibroblastes pourrait résulter d'une interaction entre les voies de signalisation TGF β /Smads et ERK (Extracellular signal-regulated kinase).

1.3.3.2.5 CTGF et TGF β . CTGF (*connective tissue growth factor*) est un membre de la famille des protéines CCN (cyr61, ctgf, nov), impliqué dans la formation des os, des vaisseaux sanguins, et du tissu conjonctif (Leask et Abraham, 2003). CTGF agirait comme édiateur de l'activité pro-fibrotique du TGF β (Ihn, 2002). L'expression de CTGF est augmentée chez les fibroblastes stimulés par l'angiotensine ou TGF $\beta 1$ *in vitro* (Iwanciw et al., 2003; Yu et al., 2009).

1.3.3.3 L'activation de la voie de signalisation MAP Kinase.

Les MAP kinases, ou « mitogen-activated protein kinases » sont une famille de sérines/thréonines kinases dont il existe 12 membres, regroupés en quatre voies de signalisation principales. Les JNK/SAPKs (stress-activated protein kinase) sont encodés par trois gènes différents : JNK1, JNK2, JNK3 (figure 7). L'expression de JNK1 et JNK2 serait ubiquitaire, alors que l'expression de JNK3 serait principalement au niveau du cerveau. Les JNK/SAPKs sont principalement activés en réponse aux cytokines inflammatoires, aux stress environnementaux (radiation, oxidation, chaleur), aux dommages à l'ADN ainsi qu'à certains facteurs de croissances (Kyriakis et Avruch, 2001). Les JNKs phosphorylent différents facteurs de transcriptions (c-Jun, ATF-2, Elk-1, p53, NFAT), lesquels régulent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Chen et al., 2001). Les JNKs sont activés principalement par les MAP kinase kinase (MEK) 4 et 7.

La famille des MAP kinases p38 comprend quatre membres : α , β , δ et γ (figure 7). Les membres de la famille p38 sont activés par différents stress environnementaux (radiation, choc osmotique, hypoxie), à certaines cytokines ainsi qu'à des facteurs de croissance (Raman et *al.*, 2007). Les p38 MAP kinases sont principalement activés par les MEK-3 et -6, qui les double-phosphorylent sur un site TGY de leur boucle d'activation. L'expression de p38 α et β serait ubiquitaire, alors que celle de δ (poumons, reins, petit intestin, glandes endocrines) et γ (principalement muscles squelettiques) serait spécifique à certains tissus (Chen et *al.*, 2001). p38 stimulerait l'activité de MAPKAP2/3 ainsi que de nombreux facteurs de transcriptions dont ATF-1/2, MEF2A, MEF2C, Sap-1, Elk1, Ets-1, MAX (partenaire de myc), CHOP/GADD153, NF- κ B et p53 (Chen et *al.*, 2001). Le rôle des p38 varie selon le type cellulaire. Au niveau cardiaque, p38 β serait un médiateur pro-hypertrophique alors que p38 α serait pro-apoptotique. Les principales MEKs responsables de l'activation de p38 sont les MEK-3 et -6.

Les MAP kinases ERK (Extracellular signal-regulated kinase) 1 et 2 sont aussi appelées p44/p42, ce qui correspond approximativement à leur poids moléculaire (43kDa et 41kDa) (Raman et *al.*, 2007). Lorsqu'activées, ces protéines kinases phosphorylent différents substrats, telles que des kinases (p90 ribosomal S6 kinase : RSK, mitogen and stress activated kinase : MSK, MAPK interacting kinase : MNK), certaines molécules impliquées dans la migration et l'adhésion (paxillin, focal adhesion kinase : FAK) ainsi que différents facteurs de transcription (Elk1, c-Fos et c-Myc). La signalisation par ERK1/2 peut être induite par des facteurs de croissance, des récepteurs couplés aux protéines G, certaines cytokines (TGF β) ou un stress osmotique. La réponse cellulaire induite par cette voie de signalisation peut entraîner une mobilité, une prolifération ou une différenciation cellulaire (Johnson et Lapadat, 2002; Drosten et *al.*, 2010). Les MEKs principalement responsables de l'activation de ERK1/2 sont MEK1 et MEK2. En aval, hormis dans les oocytes, la seule MEK Kinase reconnue responsable de la phosphorylation de MEK1 et de MEK2 est Raf (Chen et *al.*,

Figure 7.

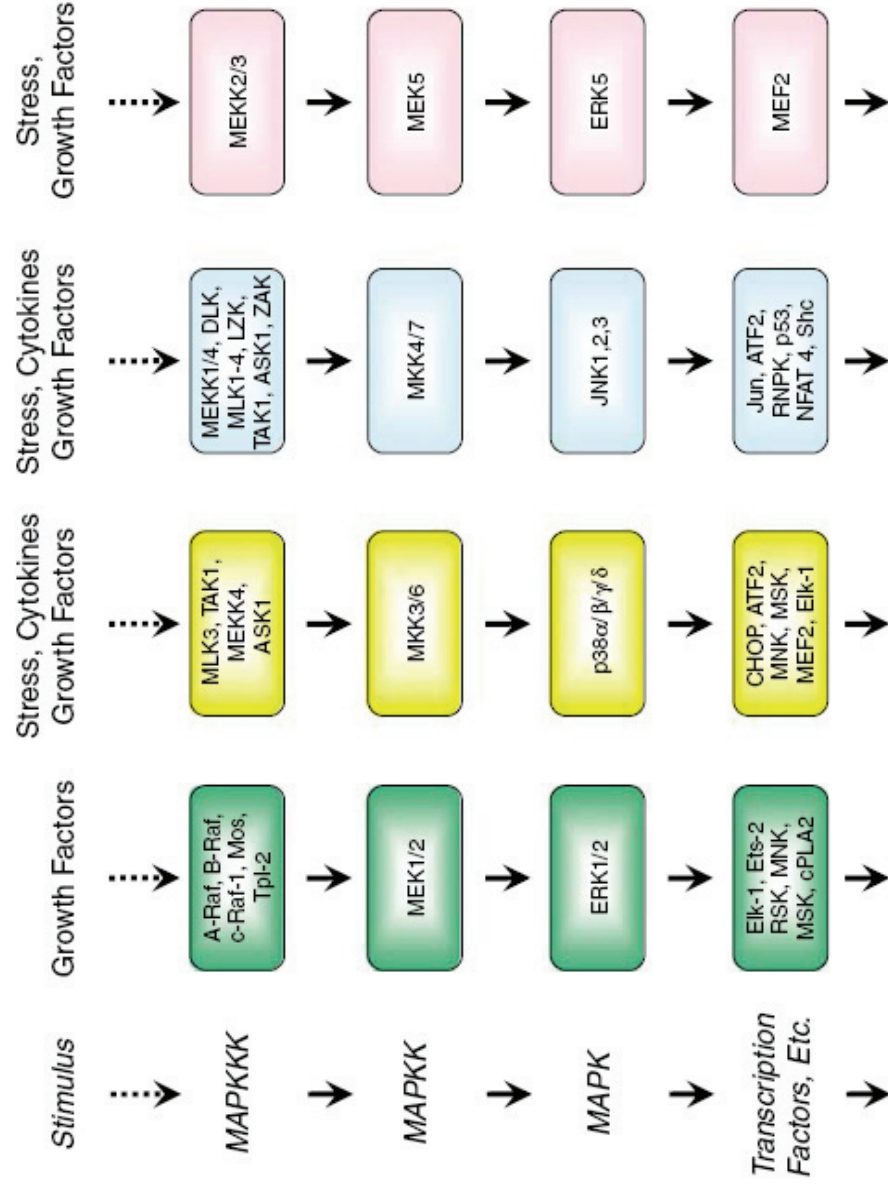


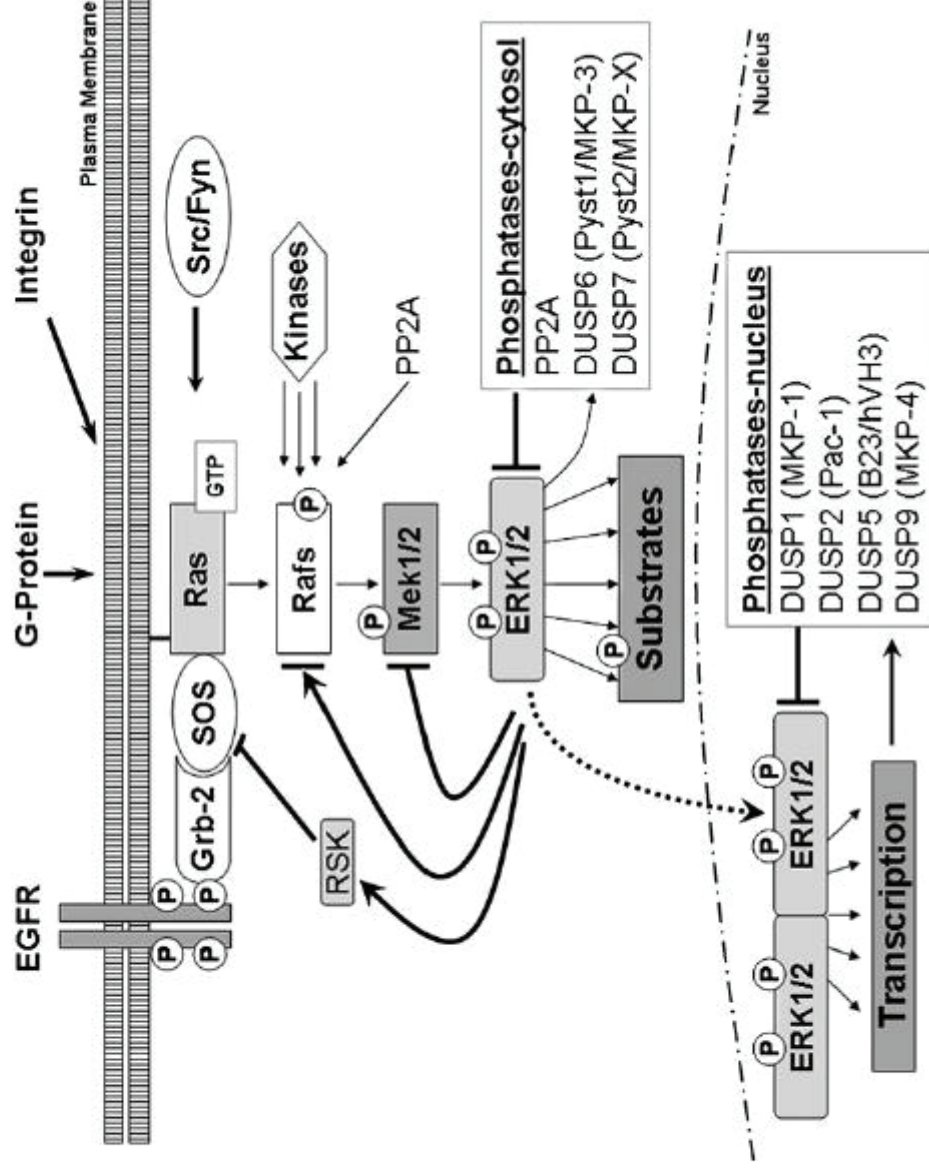
Figure 2 Mammalian MAPK cascades. There are four major mammalian MAPKK-MAPKK-MAPK protein kinase cascades. Whereas the ERK pathway is commonly activated by growth factors, the JNK, p38 and ERK5 pathways are activated by environmental stress, including osmotic shock, ionizing radiation. Many of the substrates for MAPKs are nuclear transcription factors. Interactions and substrates were compiled from information from STKE (<http://stke.sciencemag.org/index.dtl>).

2001) (figure 7). Il existe trois isoformes de Raf, soit Raf-1, A-Raf et B-Raf. L'activation de Raf-1, l'isoforme le plus fréquemment rencontré dans différents types cellulaires, implique la phosphorylation de plusieurs résidus dans sa région N-terminale (Ser338, Ser339, Tyr340 et Tyr 341).

Certains récepteurs tyrosines kinases (RTK) ainsi que des récepteurs couplés aux protéines G peuvent transmettre un signal d'activation par la voie des MAP kinases (Chen et *al.*, 2001). Les RTKs, généralement présents sous forme de monomère à l'état inactif, se dimérisent et s'autophosphorylent suite à la liaison de leur ligand (McKay et Morrison., 2007). La phosphorylation de résidus tyrosines permet alors la liaison de molécules possédant des domaines de liaison Src-homology 2 (SH2). Ces molécules peuvent être des molécules adaptatrices, telles que Grb2 ou Shc, ou des enzymes qui seront directement activés par leur liaison aux récepteurs phosphorylés (PI3-kinase, Shp2, Src et PLC γ). Grb2 est lié à SOS et lorsqu'il est recruté par un RTK activé, il permet l'activation de Ras GTPase par Sos. Sos permet l'échange de GDP pour GTP lié à Ras et induit ainsi son activation (Downword, 1996). L'activation de Ras entraîne le recrutement de Raf, qui est présent dans le cytosol à l'état inactif, lié à une protéine 14-3-3. Raf relâche alors sa protéine 14-3-3, et devient actif. Il peut alors activer la voie MEKK/MEK/ERK1/2 (figure 8).

ERK1/2 seraient impliqués dans le remodelage tissulaire, chez les cardiomyocytes et chez les fibroblastes. Chez les cardiomyocytes en culture, l'addition d'endothéline, de phényléphrine ou de FGF (fibroblast growth factor) entraîne l'activation de la voie MEKK/MEK/ERK1/2 ainsi qu'une hypertrophie (Clerk et *al.*, 1994; Bogoyevitch et *al.*, 1994; Yamasaki et *al.*, 1993). L'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/ERK1/2 (U0126), prévient l'hypertrophie induite par l'endothéline et la phénylalanine chez les cardiomyocytes en culture (Yue et *al.*, 2000). L'expression de MEK constitutivement active de façon spécifique aux cardiomyocytes entraîne le développement d'hypertrophie concentrique (Bueno et Molkentin, 2002). Dans les cardiomyocytes en culture, l'activation de ERK est

Figure 8.



associé à une activation des p70 S6 kinase 1 et 2, des régulateurs de transduction qui pourraient être impliqués dans l'accumulation de protéines impliquées dans la réponse hypertrophique (Wang et *al.*, 2001). Chez les fibroblastes, ERK1/2 seraient notamment impliqués dans la synthèse de collagène par une interaction avec certaines Smads, des protéines impliquées dans la signalisation de TGF β (Gao et *al.*, 2009). Dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire, une augmentation de l'expression de ERK1/2 phosphorylé a été montrée, au niveau auriculaire et non au niveau ventriculaire après 24 heures, 1 semaine et 2 semaines de VTP. Le traitement des animaux avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine a entraîné une baisse de l'expression de ERK1/2 phosphorylé ainsi qu'une atténuation de la fibrose interstitielle auriculaire (Hannah et *al.*, 2004).

1.3.3.4 La mort cellulaire

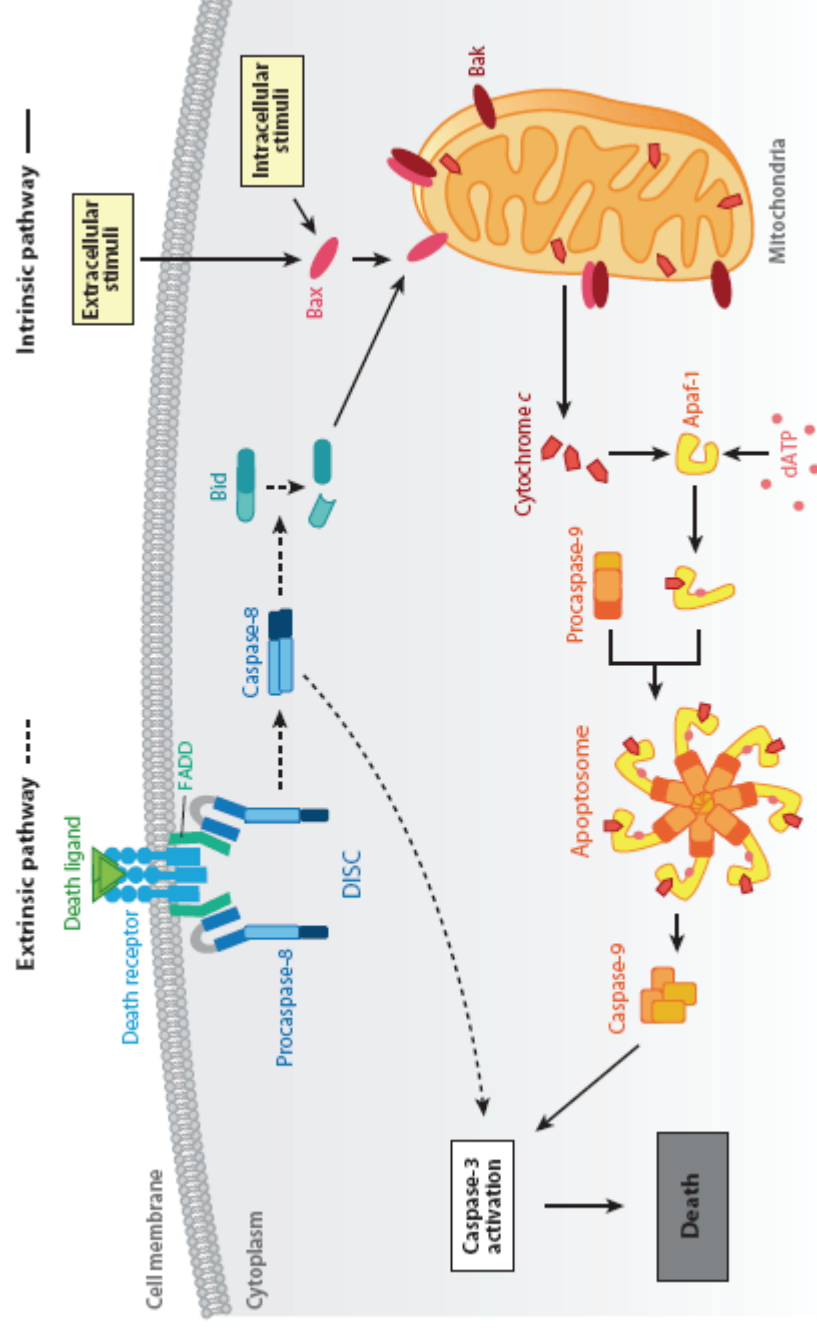
La mort cellulaire par apoptose implique l'activation d'enzymes, la condensation du noyau, la formation de vacuoles et la phagocytose par les cellules environnantes. Elle ne nécessite pas l'activation d'une réaction inflammatoire (Whelan et *al.*, 2010). L'induction de l'apoptose peut être induite par deux voies de signalisation, soit la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque implique la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, alors que la voie extrinsèque implique des récepteurs membranaires. Chacune des deux voies implique l'activation de cystéines protéases de la famille des caspases. Les caspases sont sécrétées sous une pro-forme inactive. Suite à une stimulation de la voie extrinsèque, par Fas ou TNF α par exemple, le recrutement du DISC induit la dimérisation de la pro-caspase-8, qui s'autoclive alors pour devenir active. La caspase-8 peut ensuite cliver d'autres pro-caspases telles que les pro-caspase-3 et -7, en aval de la voie, afin de les activer. La voie intrinsèque peut être activée par différentes sources de stress (ex. : stress hypoxique, stress oxydatif, carence nutritionnelle, dommage à l'ADN) implique les protéines de la

famille de Bcl-2. Cette famille comporte certaines protéines pro-apoptotiques (Bcl-Xs, Bak, Bax, Bad, Bid, etc.) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, etc.). Ces protéines régulent la perméabilité de la membrane externe mitochondriale. En condition de stress, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe permet la relâche de cytochrome c. celui-ci se lie alors d'ATP et APAF-1 et recrute la pro-caspase-9. La formation de ce complexe, nommé apoptosome, entraîne le clivage et l'activation de la pro-caspase-9, qui pourra ensuite à son tour activer d'autres pro-caspases en aval (caspase-3, -6 et -7) (Schunkert et Riegger, 2000) (figure 9).

Comparativement à l'apoptose, la nécrose est un processus passif de dégradation cellulaire, accompagnée d'une perte de l'intégrité membranaire, d'une perte de l'ATP, d'une dégénérescence des organelles et de fuites du contenu cellulaire dans l'espace interstitiel (Whelan et *al.*, 2010). La présence du contenu intracellulaire dans l'espace interstitiel induit l'activation d'une réaction inflammatoire.

Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, l'augmentation de mort cellulaire par apoptose a été suggérée, malgré une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-2 (Olivetti et *al.*, 1997). Narula et *al.* (1996) ont rapporté la présence de mort cellulaire par apoptose chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique ou ischémique. Chez le chien soumis à une tachycardie ventriculaire, la mort cellulaire par nécrose et par apoptose a été mesurée. L'étude a démontré une augmentation transitoire de la mort cellulaire par nécrose et par apoptose dans les cardiomyocytes auriculaires, prédominante dans la période précoce du remodelage (24 heures VTP). Comparativement aux observations effectuées dans les oreillettes, la mort cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires augmentait de façon progressive, depuis 24 heures VTP jusqu'à 5 semaines de VTP (Hannah et *al.*, 2004). Une étude effectuée sur des moutons soumis à une constriction aortique a montré une augmentation progressive de l'activité des caspase-3, -8 et -9 au niveau

Figure 9.



ventriculaire, principalement lors de la phase de décompensation menant à l'insuffisance cardiaque (Mooriani et *al.*, 2006).

1.3.4 Désordre métabolique

Au cours du développement de l'insuffisance cardiaque, le métabolisme change à différents niveaux, soit sur l'utilisation des substrats, la phosphorylation oxydative et le métabolisme du phosphate de haute énergie. Les études portant sur la contribution des acides gras à la synthèse d'ATP montrent généralement une faible diminution ou une absence de changement, lorsque l'insuffisance cardiaque est faible ou modérée. La diminution serait cependant substantielle lors d'une insuffisance cardiaque sévère. L'utilisation du glucose est généralement augmentée dans les premiers stades de l'insuffisance cardiaque et décline lorsque la condition devient sévère. L'insuffisance cardiaque est généralement associée à une anomalie de la structure mitochondriale, des complexes de la chaîne de transport d'électrons et de la capacité du complexe d'ATP synthase. L'insuffisance cardiaque est aussi associée à une réduction de l'activité des enzymes de phospho-transfère créatine kinase (CK) et adénylate kinase, responsables des transfères d'énergie depuis les sites de productions vers les sites d'utilisation (Ingwall, 2009).

Section 1.4. Les microRNAs.

1.4.1 Découverte

La découverte de l'existence des microARN a débuté avec la caractérisation des gènes impliqués dans le développement de *Caenorhabditis elegans*. Les études détaillées en génétique du développement ont permis de démontrer le rôle majeur de gènes tels que *lin-14*, *lin-28* et *lin-29* dans le développement post-embryonnaire de la larve aux stades L1-L4 et dans le passage du stade L4 larvaire au stade adulte (Ambros et Horvitz, 1984). En 1987, Ambros et Horvitz ont montré l'existence de *lin-4*, un autre gène

hétérochronique agissant comme un régulateur de *lin-14* (Ambros et Hirtvitz, 1987). Par la suite, Lee et Wightman ont présenté *lin-4* comme un petit ARN non-codant, agissant comme régulateur négatif post-transcriptionnel du gène *lin-14* (Lee et al., 1993; Wightmann et al., 1993). Cependant, l'absence d'évidences suggérant la présence de ce type d'ARN régulateur non-codant dans d'autres organismes laissait croire à ce moment qu'il constituait une particularité spécifique aux nématodes (Ambros, 2008). Les recherches subséquentes effectuées par cette équipe ont permis de démontrer que *lin-4* régula l'expression de d'autres gènes hétérochroniques, dont *lin-28* (Moss et al., 1997) par une complémentarité de la séquence du petit ARN avec ses ARN messagers cibles, en 3'UTR (3' untranslated region). La publication de Hamilton et Baulcombe, en 1999, montrant la présence de petits ARNs agissant comme ARN interférence (ARNsi) chez les plantes, a su faire monter l'intérêt pour ces petits ARN non-codants (Hamilton et Baulcombe, 1999). En 2000, Reinhart et al. ont démontré l'existence d'un deuxième gène, *let-7*, codant pour un petit ARN dont le rôle serait de réguler l'expression de *lin-41*, un autre gène hétérochronique présent chez *C. elegans* (Reinhart et al., 2000). Par la suite, Pasquinelli et al. (2000) ont montré que *let-7* était conservé à travers de nombreux embranchements du règne animal. En 2001, les microARNs étaient considérés comme une classe de petits ARN régulateurs, avec une douzaine de représentants chez les plantes et chez les animaux (Bartel, 2004; Carthew et Sontheimer, 2009).

Depuis, un nombre croissant de microRNA ont été identifiés chez les mammifères. Plus de 500 microRNAs ont été clonés et identifiés chez l'humain et on estime que près de 1000 microARN seraient présents dans le génome humain (Bentwich et al., 2005). Ces microRNA seraient responsables de la régulation de l'expression d'environ 30% des gènes du génome (Lewis et al., 2005).

Les ARNs messagers cibles des microARNs, particulièrement dans le règne animal, sont encore peu connus. Chez les plantes, il est possible de prédire les cibles de microARN relativement facilement, puisque la séquence des microARN est généralement en presque parfaite complémentarité avec la séquence cible (Rhoades et *al.*, 2002; Jones-Rhoades et Bartel, 2004). Par contre, chez les animaux, les duplexes fonctionnels sont plus variables en structure. Ils contiennent des séquences complémentaires de longueurs variables, séparées par des interstices en boucles et des régions de mauvais appariements. Cela complexifie la recherche de cibles fonctionnelles (Brennecke et *al.*, 2005).

1.4.2 Définition

Les petits ARNs sont divisés en trois classes, en fonction de leur origine, de leur structure, des protéines effectrices associées ainsi que de leur rôle biologique (Carthew et Sontheimer, 2009). Les ARNs de type ARNsi et microARN sont les plus largement distribués au point de vue physiologique et phylogénique. Ils sont notamment caractérisés par leur précurseur double-brin et s'associent à des protéines effectrices de la branche Argonaute. Les ARNs piwi (ARNpi) sont majoritairement présents dans le règne animal, principalement impliqués dans la fonction des cellules germinales et probablement originaires d'un précurseur simple brin. Ils s'associent à des protéines effectrices de la branche Piwi.

La famille des microRNAs constitue un groupe d'ARN simple brin non-codant endogène, qui régule l'expression de gènes endogènes, au niveau post-transcriptionnel, en inhibant la transcription ou en entraînant la dégradation d'ARN messagers. En comparaison, les ARN de type ARNsi, seraient générés suite à une stimulation exogène, en réponse à une invasion étrangère d'acides nucléiques, afin de protéger l'intégrité du génôme. De plus les ARNs de type

ARNsi sont produits à partir de longs précurseurs double-brin en épingle alors que les précurseurs de miRNA sont aussi formés d'un double-brin en épingle, plus court.

1.4.3 Biosynthèse

Les microARN sont synthétisés par une RNA polymérase II, sous forme d'un précurseur pri-microARN d'environ 2000 nucléotides (Lee et *al.*, 2004). Dans le noyau, une RNase de type III (Dcl1 chez les plantes et Drosha chez les animaux) forme un complexe avec une protéine (DGC8 chez les mammifères) contenant un domaine de liaison à l'ARN double brin (Lee et *al.*, 2003). Le complexe se lie au pri-microARN pour en cliver une région tige-boucle et former un plus petit précurseur, en épingle, de 70 bases, le pré-microARN. Chez les animaux, le pré-microARN est exporté dans le cytoplasme par le complexe Exportin 5/Ran, puis clivé par une RNAase III nommée Dicer. Le produit de Dicer est un duplex d'ARN d'une longueur 19 à 23 nucléotides. L'un des brins du duplex est préférentiellement retenu et incorporé au complexe de ribonucléoprotéines appelé RISC, qui contient notamment des protéines Argonaute. Le brin complémentaire au microARN est dégradé.

La majorité des gènes codant pour des microARNs sont localisés dans des régions intergéniques ou en orientation antisense à leur gène cible. Les autres se situent dans les régions introniques et peuvent être transcrits en même temps que leur ARN messager cible. Il a été suggéré récemment que la séquence d'ADN de certains gènes miARNs introniques coderait directement pour un pré-miARN. La biosynthèse de ces nouveaux miARNs appelés mirtrons ne nécessiterait donc pas de clivage par Drosha. Les pré-miARNs seraient directement exportés du noyau par Exportin-5/Ran pour être clivés par Dicer (Williams, 2008).

1.4.4 Mécanismes d'action

Lorsqu'incorporé dans le complexe RISC, le microARN guide la fixation du complexe, par hybridation moléculaire, sur un ou plusieurs sites MRE (microARN response element) de la région non-codante 3'UTR de l'ARN messenger cible. Cette fixation entraîne un arrêt de la traduction de l'ARN messenger. De plus, lorsque la complémentarité du microARN et de la séquence cible de l'ARN messenger est élevée, la liaison du microARN à l'ARN messenger entraînerait la dégradation de ce dernier via la protéine Argonaute2 (Ago2), présente dans le complexe RISC (Williams, 2008).

La complémentarité entre la séquence du microARN et celle de la région 3'UTR de l'ARN messenger cible est parfois très limitée. Il arrive que cette complémentarité se restreigne à 6 des 22 nucléotides de la séquence du microARN. Il apparaît cependant que la complémentarité de certaines régions serait essentielle à la liaison fonctionnelle du miRNA avec sa cible. L'étude de Brennecke et *al.* (2005), effectuée sur *Drosophila melanogaster* a permis de déterminer, à l'aide de gènes rapporteurs, quelles étaient les exigences minimales de complémentarité pour la formation de duplexes miRNA-cibles fonctionnel. Selon cette étude, il existerait deux catégories de pairage miRNA-cible. La première catégorie, 5' dominante, serait basée sur une complémentarité suffisante de la région 5' du miRNA avec sa cible, accompagnée d'un pairage fort, faible ou absent dans sa région 3'. La seconde catégorie, 3' compensatoire, représenterait le pairage insuffisant du miRNA dans sa région 5', qui requiert un pairage fort en 3' pour que la liaison soit fonctionnelle. La catégorie 5' dominante serait divisée en deux catégories, soit le sous-type canonique (où le pairage du miRNA est fort aux extrémités 5' et 3') et le sous-type avec site d'implantation (« seed site », où le pairage en 3' est faible ou absent).

1.4.5 Fonctions physiologiques

Depuis leur découverte, les microARNs ont gagné en popularité et plusieurs travaux de recherche ont démontré que ces petits ARNs étaient impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques. L'identification de nombreux microRNAs chez la souris a montré que leur profile d'expression était spécifique au tissu. Par exemple, miR-1 serait fortement exprimé dans le cœur alors qu'il ne serait exprimé qu'à un faible niveau dans le foie et dans le cerveau. Par contre miR-122 serait le miRNA le plus abondant dans le foie et miR-143 le plus abondant dans la rate (Lagos-Quintana et *al.*, 2002). Cette spécificité de tissu serait conservée chez l'humain. L'utilisation des micropuces d'ADN a permis de confirmer cette spécificité tissulaire des patrons d'expression de microARNs (Cheng et *al.*, 2007).

Au niveau du règne animal, plusieurs microARNs ont été reconnus impliqués dans diverses fonctions biologiques telles que l'embryogénèse, l'hématopoïèse, la sécrétion d'insuline, le métabolisme du cholestérol, la réponse immunitaire et la fonction cardiaque (Williams, 2008). Pour ce faire, les microARNs agiraient en modulant le développement (différentiation/ maturation), la prolifération, la signalisation ou l'apoptose des cellules reliées à chacune de ces fonctions.

Le rôle des microARNs dans l'embryogénèse et le développement des organismes a été clairement démontré chez *Caenorhabditis elegans*, avec les études portant sur la régulation des gènes hétérochroniques (Lee et *al.*, 1993). La mutation de lin-14, lin-28 et lin-29 affectant la liaison de microARNs régulateurs, entraînaient une désorganisation temporelle des stades de développement affectant principalement la maturation sexuelle, la formation de cuticule ainsi que la croissance et la différenciation des cellules dérivées du mésoderme (Moss et *al.*, 1997; Li et *al.*, 2005). Chez *Drosophila melanogaster*, les études de développement ont mis en évidence l'implication de plusieurs

familles de gènes dans l'embryogénèse. L'utilisation de traitements antisense pour différents miARNs, au cours du développement embryonnaire, a montré la présence d'anomalies morphologiques évidentes pour 25 des 46 microARNs ciblés (Leaman et *al.*, 2005). Une étude portant sur la cardiogénèse chez la souris a mis en évidence le rôle majeur de miR-1 dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire ventriculaire (Zhao et *al.*, 2005). Une autre étude effectuée sur des souris transgéniques déficientes pour le gène codant pour Dicer, a démontré l'importance des microARNs dans l'angiogénèse et la formation du sac vitellin, dans le développement de l'épithélium pulmonaire et dans le développement des membres (Yang et *al.*, 2005).

Une étude portant sur les cellules hématopoïétique a montré que le patron d'expression des microARNs évoluait au cours de la différenciation des différentes lignées cellulaires (Monticelli et *al.*, 2005). Par exemple, l'expression de miR-150 était fortement exprimée dans les cellules lymphoïdes progénitrices (ProB et T-double négative) alors qu'elle diminuait au cours de la maturation de ces cellules et lors du passage des cellules T naïves vers les cellules Th1 et Th2 différenciées. De plus, l'expression ectopique de miR-181 dans des cellules hématopoïétiques progénitrices entraînerait une augmentation du nombre de cellules lymphocytes-B différenciées sans altérer le nombre de lymphocytes-T (Chen et *al.*, 2004). Cependant, l'utilisation d'un antagomir de miR-181 affectait la sélection positive et négative dans les cellules-T immatures (Li et *al.*, 2007).

Au point de vue du système immunitaire, l'immunodéficiencia de la souris bic/miR-155 a montré le rôle majeur de miR-155, qui régulaait l'expression de cytokines (IL-4), de chémokines (CCL5) et de facteurs de transcriptions (c-Maf) impliqués dans la réponse immunitaire, en plus de moduler la différenciation des cellules T *helper* et la médiation de la réponse des cellules-T aux anticorps (Rodriguez et *al.*, 2007). miR-146, serait impliqué dans la réponse immunitaire innée en interférant avec la voie de signalisation IRAK1/TRAF6/IKK/NF-KB (Taganov et *al.*, 2006; Williams, 2008).

1.4.6 Rôles dans la fonction cardiaque.

Les miARNs les plus abondants dans le muscle cardiaque sont miR-1, let-7, miR133, miR-126-3p, miR-30c et miR-26a. Les miARNs miR-1, miR-133 et miR-208 sont considérés spécifiques aux muscles striés (Wang et *al.*, 2008).

Le rôle et le mécanisme de régulation de différents microARNs a été démontré dans la fonction cardiaque. Par exemple, l'étude du rôle de miR-1 dans la cardiogénèse chez la souris a démontré que miR-1 régula la croissance et la différenciation cellulaire ventriculaire. L'étude a aussi suggéré que l'expression de miR-1 serait régulée par des facteurs de transcriptions tels que SRF (*serum responsive factor*), MyoD (*myocardin*) et Mef2 (*myocyte enhancer factor 2*). MiR-1 régulerait l'expression temporelle de *Hand2*, un facteur de transcription impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire. La surexpression de miR-1 entraînait un arrêt du développement embryonnaire, suite à la formation d'une paroi ventriculaire mince et au développement d'insuffisance cardiaque (Zhao et *al.*, 2005).

Selon Chen et *al.*(2006), les gènes miR-1 et miR-133 seraient colocalisés dans les chromosomes 2 et 18 de la souris, séparés par 9.3 et 2.5kb, respectivement. Ils seraient co-transcrits dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques et réguleraient l'expression de gènes de différenciation et de croissance cellulaires. miR-1 induirait une diminution de la prolifération cellulaire (associée à une diminution de l'expression d'histone H3-phosphorylée) et une différenciation myogénique (associée aux marqueurs MHC, MyoD, MEF2 et actine alpha squelettique). miR-133 induirait l'effet opposé à miR-1. Dans cette étude, il a été suggéré que miR-1 réprimerait l'expression de HDAC4 alors que miR-133 réprimerait l'expression de SRF, un facteur de transcription de miR-1 (Chen et *al.*, 2006). Une autre étude suggère que MEF2,

un facteur de transcription aussi impliqué dans le développement des muscles squelettiques, agirait comme promoteur du transcrit bi-cistronique codant pour les précurseurs de miR-1/miR-133 (Liu et *al.*, 2007).

Le rôle biologique de miR-208, selon van Rooij et *al.* (2007), serait la régulation de la croissance cardiaque en réponse au stress ou à une stimulation hormonal. La séquence de miR-208 est intronique, située dans le gène codant pour α -MHC (alpha myosin heavy chain) de la souris et de l'humain. En présence de bloqueur de biosynthèse de l'hormone thyroïdienne T3, par exemple, miR-208 favoriserait la synthèse de β -MHC (beta myosin heavy chain), qui augmenterait en parallèle avec la diminution de α -MHC. Notons que β -MHC est une ATPase lente, exprimée de façon dominante dans le cœur embryonnaire, alors que α -MHC est une ATPase rapide, avec une expression augmentée en période post-natale. Ainsi, l'hypothyroïdie favoriserait la synthèse de β -MHC et la diminution d'expression de α -MHC, diminuant la contractilité cardiaque. Dans une publication plus récente, van Rooij et *al.*, suggèrent que Myh6 (encodant l'ATPase rapide α -MHC) et Myh7 et Myh8 (encodant des ATPases lentes β -MHC) posséderaient chacun un gène intronique codant pour les microARNs miR-208a, miR-208b et miR-499, respectivement. Ces micro-ARNs réguleraient l'expression des protéines contractile via la régulation de l'expression de répresseurs de transcriptions (van Rooij et *al.*, 2009).

Une étude de van Rooij et *al.* (2008), a montré un changement d'expression de plusieurs microARN dans la zone cicatricielle formée suite à un infarctus du myocarde, chez l'humain comme chez la souris. L'expression des microARNs miR-21, miR-214 et miR-223 était fortement augmentée, alors que l'expression de miR-29b et miR-149 était diminuée. Dans cette étude, l'attention était portée sur miR-29, une famille comportant trois membres (miR29a, miR-29b, miR-29c) possédant des séquences de liaisons semblables et montrant une expression plus élevée dans les fibroblastes que dans les cardiomyocytes. Le

traitement de cellules en culture avec TGF-beta réprimerait l'expression de miR29. L'injection d'un anti-miR29b a montré une augmentation modérée de l'expression des collagènes 1A1, 1A2 et 3A1.

Le rôle de la régulation de l'expression du CTGF par des microARNs en condition d'hypertrophie cardiaque pathologique a été étudié par Duisters et *al.* (2009). Dans cette étude, il a été initialement démontré que, dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par l'hypertension, dans un modèle de hypertrophie induit par cerclage aortique ainsi que chez des patients avec hypertrophie cardiaque liée à une sténose aortique, l'expression de CTGF était augmentée alors que celle de miR-30c et de miR-133 était diminuée. L'expression de miR-133 serait plus élevée dans les cardiomyocytes que dans les fibroblastes, et inversement celle de miR-30c serait plus élevée dans les fibroblastes que dans les myocytes. La répression de l'expression miR-133 dans les cardiomyocytes en culture a entraîné une hausse importante de l'expression de CTGF. La répression de l'expression de miR-30c dans les fibroblastes en culture a entraîné une augmentation de l'expression de CTGF, de collagène I et de fibronectine.

1.4.7 Mécanismes de régulation par miR-21

L'utilisation d'inhibiteurs de microARNs injectés dans des cellules HeLA, a montré que 19 microARNs (miR-95, 124, 125, 133, 134, 144, 150, 152, 187, 190, 191, 192, 193, 204, 211, 218, 220, 296 and 299) des 90 microARNs testés inhibaient la croissance cellulaire alors que 2 microARNs (miR-21 et miR-24) stimulaient la croissance cellulaire (Cheng et *al.*, 2005). miR-21 posséderait un rôle oncogénique dans différentes lignées de cellules tumorales (glioblastôme, cholangiocarcinôme, adénocarcinôme mammaire) et régulerait négativement l'expression de répresseurs tumoraux tels que PDCD4 (programmed cell-death-4; Chan et *al.*, 2005) et Pten (phosphatase and tensin homolog; Meng et *al.*,

2006). Le traitement de souris transplantées à l'aide d'anti-miR-21 a permis de réduire la croissance de greffons tumoraux constitués de cellules MCF-7, dérivés d'adénocarcinômes mammaires. Le traitement entraînait aussi une augmentation de l'expression de répresseurs tumoraux, incluant tropomyosine1, qui posséderait un site de liaison en 3'UTR pour miR-21 (Zhu et *al.*, 2007). Dans une lignée cellulaire dérivée de myélome humain, XG-1, Löffler et *al.* ont montré l'implication de miR-21 dans la croissance cellulaire induite par l'interleukine-6 (IL-6), via la liaison de Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) à deux sites situés dans une région régulatrice de miR-21, en aval son site d'initiation de la transcription (Löffler et *al.*, 2007). Plus récemment, Gabriely et *al.* ont suggéré un rôle pro-métastatique de miR-21, par la répression de TIMP3, un inhibiteur de métalloprotéases (MMPs) qui restreint la capacité invasive de cellules tumorales (Gabriely et *al.*, 2008).

Au niveau vasculaire, l'utilisation d'un anti-miR-21 permettrait la réduction de la formation d'une néointima suite à un dommage artérielle induit par angioplastie. Dans ce modèle, le traitement anti-miR-21 semblait anti-prolifératif et pro-apoptotique, impliquant l'expression des protéines Pten et Bcl-2 (Ji et *al.*, 2007). Au niveau cardiaque, le rôle de miR-21 semble controversé. En effet, selon Tatsuguchi et *al.* (2007), miR-1 et miR-133 agiraient comme promoteurs de l'hypertrophie alors que miR-21 et miR-18b agiraient comme répresseurs. L'utilisation d'oligonucléotides antisenses LNA-miR-21 ou LNA-miR-18b favorisait l'hypertrophie de cardiomyocytes néonataux en culture. Cependant, les résultats présentés par Cheng et *al.* (2007), montraient une augmentation de l'expression de miR-21 en parallèle avec le développement de l'hypertrophie. De plus, dans cette étude, l'utilisation d'oligonucléotides antisenses pour miR-21 réduisait l'hypertrophie induite par l'angiotensine-II ou la phényléphrine dans des cardiomyocytes néonataux en culture. Sayed et *al.* (2008) ont observé une augmentation de miR-21 dans l'hypertrophie compensatoire suivant le cerclage aortique chez des souris, suivit d'une baisse d'expression de miR-21 dans la phase d'hypertrophie décompensatoire. Ils ont aussi observé une augmentation

de l'expression de miR-21 cardiaque chez les souris sur-exprimant le récepteur β 2-adrénergique et chez les cardiomyocytes traités avec de l'isoprotérénol. Cependant, la surexpression unique de miR-21 dans les cardiomyocytes en culture ne permettait pas d'induire l'hypertrophie. Elle entraînait la formation d'excroissances cellulaires favorisant une connexion intercellulaire. Ce phénomène pouvait être inhibé par la surexpression de sprouty2, une cible directe de miR-21.

L'étude à large spectre du profil d'expression de microARN dans le myocarde de souris soumis à une ischémie/reperfusion a montré le changement d'expression de différents microARNs à 2 jours et 7 jours suivant l'intervention (Roy et *al.*, 2009). L'expression de miR-21, notamment, s'est avérée augmentée à chacune des deux périodes, dans la zone cicatricielle et l'hybridation *in situ* a montré une colocalisation de miR-21 avec la vimentin, un marqueur de fibroblastes. La transfection d'une sonde « mimique » de miR-21 dans des fibroblastes en culture aurait induit une augmentation significative de MMP-2 et une baisse d'expression de Pten, une cible directe de régulation par miR-21.

1.4.8 Rôle physiologique de Sprouty

Il existe quatre homologues Sprouty (Spry) chez les mammifères : Sprouty1, Sprouty2, Sprouty3 et Sprouty4. Les protéines Sprys possèdent un domaine C-terminal conservé, qui serait impliqué dans leur translocation à la membrane interne plasmique. Le domaine C-terminal appelé aussi domaine de translocation de Spry (SpryTD), est riche en résidus cystéines, qui pourraient subir une palmitoylation, entraînant la translocation de la protéine vers la membrane plasmique lors de l'activation de récepteurs tyrosines kinases (RTKs) (Hanafusa et *al.*, 2002). Les Sprys possèdent un domaine N-terminal dont la séquence est variable selon l'isoforme, leur permettant de se lier à

différentes cibles afin de remplir différentes fonctions physiologiques (Guy et *al.*, 2003). La phosphorylation d'un résidu tyrosine, situé dans la région N-terminal variable, serait essentielle à la liaison des Sprys à leurs cibles.

Le rôle des Sprys a initialement été démontré dans le développement de *Drosophila melanogaster*, pour la régulation spatio-temporelle de l'activité des RTKs (Hacohen et *al.*, 1998). Impagnatiello et *al.* ont montré que la surexpression de Spry1 et Spry2 réprimait la prolifération et la différenciation cellulaire de cellules HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) induite par l'activation des récepteurs FGF (fibroblast growth factor) et VEGF (vascular endothelial growth factor) par une voie MAP kinase dépendante. Leur surexpression inhiberait aussi la prolifération cellulaire induite par l'activation du récepteur EGF (epidermal growth factor) par une voie MAP kinase indépendante (Impagnatiello et *al.*, 2001). Sprouty serait impliqué dans la boucle de rétro-inhibition pour la terminaison de signaux provenant de RTKs. Hanafusa et *al.* ont montré que l'activation de Spry1/2 survenait rapidement après l'activation de récepteurs FGF, entraînant la translocation de Spry, sa phosphorylation sur un résidu tyrosine et sa liaison au complexe Grb2-Sos et interférant ainsi avec l'activation de Ras/Raf/MEKK/MEK/ERK en aval (Hanafusa et *al.*, 2002). Spry4 inhiberait l'activation de ERK1/2 par la séquestration de Sos1. La formation d'hétéro-oligomère Spry1/Spry4 augmenterait de façon marquée la suppression de l'activation de ERK par le récepteur FGF (Ozaki et *al.*, 2005).

Chapître 2. Problématique et Hypothèses.

Section 2.1 Problématique

Les troubles de fonction cardiaque suscitent depuis fort longtemps l'intérêt des grands penseurs. En effet, de nombreux travaux ont été effectués sur la physiopathologie du cœur, avec un intérêt marqué pour l'aspect ventriculaire du dysfonctionnement. De prime à bord, cet intérêt semble sensé, puisque les ventricules sont responsables d'environ 80% du travail d'éjection du sang dans le réseau vasculaire. Cependant, à l'heure actuelle, il semble que les troubles de fonctionnement auriculaire, plus particulièrement la fibrillation auriculaire, soient à l'origine du plus haut taux de morbidité et de mortalité en Europe et en Amérique. Hors, les traitements disponibles pour cette arythmie supra-ventriculaire, qu'ils soient pharmacologiques ou non-pharmacologiques, demeurent inefficaces. Mentionnons notamment les anti-arythmiques classiques, qui agissent aux niveaux de différents canaux ioniques. Ces agents pharmacologiques, lorsqu'utilisés dans la prévention d'arythmie auriculaire montrent souvent des effets adverses, pro-arythmiques, ventriculaires (section 2.7).

Cet échec du traitement de la FA a guidé la recherche vers d'autres avenues, visant à comprendre les causes et les mécanismes de changement des propriétés du tissu auriculaire responsables de l'induction et du maintien de cette arythmie. Des études expérimentales ont permis de décrire une série de changements électrophysiologiques induits par la FA qui favorisaient son propre maintien (section 2.6.1). À cela s'est ajouté une série de changements ultrastructuraux, dont la disparition de sarcomères, qui expliquerait l'hypocontractilité et la stase sanguine. Les études cliniques ont confirmé la présence de plusieurs de ces changements électrophysiologiques et histopathologiques chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire. Cependant, lorsque la FA se présente suite une pathophysiologie sous-jacente, telle que l'insuffisance cardiaque, les changements structuraux et

électrophysiologiques différent (section 2.6.2). La prolongation de la durée du potentiel d'action (plutôt que son raccourcissement), la dilatation des oreillettes et l'apparition d'une importante fibrose interstitielle ont été noté dans différents modèles expérimentaux, ainsi que chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque. De plus, il semble y en avoir une spécificité de la réponse atriale par rapport à la réponse des ventricules aux pathologies qui entraînent une dysfonction cardiaque. Les mécanismes qui favorisent la FA n'ont donc pas une origine unique, mais varient plutôt selon le contexte clinique.

L'objectif général du projet de recherche présenté ici est principalement d'améliorer notre compréhension des mécanismes de remodelage favorisant l'induction et le maintien de la fibrillation auriculaire afin de pouvoir développer une approche thérapeutique plus sécuritaire et efficace.

Afin de réaliser notre objectif, nous avons émis quatre hypothèses portant sur les mécanismes de remodelage auriculaire, induit par la tachycardie auriculaire ou suite au développement d'insuffisance cardiaque. Chaque hypothèse a fait l'objet d'un projet de recherche expérimental. Les résultats obtenus au cours des deux premiers projets sont publiés dans des revues scientifiques. Les résultats du troisième projet font l'objet d'un article présentement en révision. Le quatrième projet n'est pas encore complété.

Section 2.2 Hypothèses

1. Le remodelage auriculaire induit par la tachycardie auriculaire et celui induit par une défaillance cardiaque différent au point de vue de l'évolution temporelle et la nature des changements au niveau génomique.

2. L'insuffisance cardiaque induite par une tachycardie soutenue (la « tachycardiomyopathie » entraîne des changements d'expression génique qui diffèrent entre les oreillettes et les ventricules et ces changements sont évolutifs avec la progression de la pathologie.

3. L'insuffisance cardiaque induite par une tachycardie soutenue entraîne un remodelage auriculaire qui implique des changements importants et évolutifs d'expression de protéines impliquées dans différents groupes fonctionnels (métabolisme, contractilité cellulaire, structure cellulaire), qui sont impliqués dans la physiopathologie sous jacente.

4. La défaillance cardiaque entraîne une physiopathologie évolutive et prototypique au niveau atrial, indépendamment du mécanisme sous jacent. La fibrose interstitielle, l'un des principaux produits finaux du remodelage auriculaire induit par l'insuffisance cardiaque, joue un rôle majeur dans l'augmentation de l'incidence de la FA. Les changements de microARN sont impliqués dans le développement de la fibrose. Ainsi, la prévention de la fibrose interstitielle en intervenant au niveau des mécanismes sous jacents au niveau microARN permettrait de réduire significativement la fibrose et ainsi réduire l'inductibilité et le maintien de FA en contexte d'insuffisance cardiaque.

Chapître 3. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation.

Tel que décrit dans l'introduction, le remodelage auriculaire induit par la tachycardie auriculaire et celui induit par la tachycardie ventriculaire favorisent tous les deux l'induction de la fibrillation auriculaire. La tachycardie auriculaire entraîne majoritairement des changements électrophysiologiques, liés à une altération de l'expression de canaux ioniques. La tachycardie ventriculaire entraîne principalement des changements structuraux, qui altèrent la conduction cardiaque et permettent la stabilisation de circuits de réentrée. Les bases moléculaires impliquées dans le remodelage favorisant la fibrillation demeurent obscures. Les études cliniques sur les patients souffrant de fibrillation auriculaire peuvent être biaisées par la pathologie qui les sous-tend ainsi que par l'effet de drogues prises par les patients. Les modèles animaux de tachycardie auriculaire et de tachycardie ventriculaire permettent d'étudier les mécanismes de remodelage dans un contexte de pathologie déjà caractérisée, sans l'interférence de facteurs externes influents (age, sexe, obésité, pathologie secondaire).

Cette étude vise à comprendre les bases moléculaires associées aux changements impliqués dans le remodelage auriculaire, afin de mettre en évidence les voies de signalisation qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques dans la prévention de fibrillation auriculaire.

Contrasting Gene Expression Profiles in Two Canine Models of Atrial Fibrillation

Sophie Cardin,* Eric Libby,* Patricia Pelletier, Sabrina Le Bouter, Akiko Shiroshita-Takeshita, Nolwenn Le Meur, Jean Léger, Sophie Demolombe, André Ponton, Leon Glass, Stanley Nattel

Short title: Genomics of tachycardia-related vs CHF-induced AF

Subject codes: [5], [130], [132], [142]

Word Count: 6,000 (excluding Subject codes and Word Count)

From Department of Medicine and Research Center (S.C., P.P., S.L.B., A.S.-T., S.N.), Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Departments of Pharmacology (S.C., S.N.) and Physiology (E.L., L.G.), McGill University, Montreal, McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (A.P.) and INSERM U533-Institut du Thorax (N.L.M., J.L., S.D.), Nantes, France.

*Both S.C. and E.L. contributed equally to this study and should be considered to share first authorship.

Correspondence to: Stanley Nattel, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. E., Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel.: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355; E-mail: stanley.nattel@icm-mhi.org

Abstract—Gene-expression changes in atrial fibrillation (AF) patients reflect both underlying heart-disease substrates and changes due to AF-induced atrial-tachycardia remodeling. These are difficult to separate in clinical investigations. This study assessed time-dependent mRNA expression-changes in canine models of atrial-tachycardia remodeling and congestive heart failure (CHF). Five experimental groups (5 dogs/group) were submitted to atrial (ATP, 400 bpm×24 hours, 1 or 6 weeks) or ventricular (VTP, 240 bpm×24 hours or 2 weeks) tachypacing. The expression of ~21,700 transcripts was analyzed by microarray in isolated left-atrial cardiomyocytes and (for 18 genes) by real-time RT-PCR. Protein-expression changes were assessed by Western blot. In VTP, a large number of significant mRNA-expression changes occurred after both 24 hours (2209) and 2 weeks (2720). In ATP, fewer changes occurred at 24 hours (242) and fewer still (87) at 1 week, with no statistically-significant alterations at 6 weeks. Expression changes in VTP varied over time in complex ways. Extracellular matrix (ECM)-related transcripts were strongly up-regulated by VTP consistent with its pathophysiology, with 8 collagen-genes up-regulated >10-fold, fibrillin-1 8-fold and MMP2 4.5-fold at 2 weeks (time of fibrosis) but unchanged at 24 hours. Other ECM genes (e.g., fibronectin, lysine oxidase-like 2) increased at both time-points (~10, ~5-fold respectively). In ATP, mRNA-changes almost exclusively represented down-regulation and were quantitatively smaller. This study shows that VTP-induced CHF and ATP produce qualitatively different temporally-evolving patterns of gene-expression change, and that specific transcriptomal responses associated with AF versus underlying heart disease substrates must be considered in assessing gene-expression changes in man.

Key Words: arrhythmia - remodeling - genomic

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac rhythm disorder, and with the aging of the population both the prevalence and economic impact of AF are increasing progressively.¹ Although the mechanistic basis of AF remains incompletely understood, active research promises to provide new insights that may lead to improved therapeutic options.^{2,3}

A variety of animal models have been used to assess AF pathophysiology under controlled conditions. Atrial tachyarrhythmias, including AF itself, alter atrial electrophysiology in ways that promote AF vulnerability.⁴⁻⁶ Experimentally-induced congestive heart failure (CHF) also creates a substrate for AF maintenance, but by quite different mechanisms.⁷ The atrial-tachycardia remodeling paradigm shows prominent changes in ion-channel function that lead to action-potential abbreviation and the promotion of atrial reentry.^{8,9} CHF-induced ionic-current changes do not promote reentry but may favor ectopic-impulse formation,¹⁰ and CHF-induced fibrosis promotes reentry by interfering with intra-atrial conduction.⁷

The molecular basis of AF remains unclear. Gene microarray technology permits large-scale analysis of cardiac gene-expression changes, and has been applied to compare AF patients with those in sinus rhythm. Expression profiling has pointed to several AF-related gene-expression changes,¹¹⁻¹⁵ including alterations associated with oxidative stress,¹¹ a ventricular-like expression signature¹⁴ and changes in ion-transporters.¹⁵ A limitation of this type of clinical gene-expression study is that it is very difficult to differentiate between AF-promoting changes caused by AF and those due to underlying cardiac disease. The analysis is further complicated by systematic inter-group differences in drug therapy, atrial size and other cardiac variables.

Animal models of AF allow for greater control over study conditions and permit observations of the time course of any alterations. A human DNA microarray containing 6,035 cDNA probes applied to a porcine model of AF pointed to changes in myosin light chain-2 expression.¹⁶ DNA microarrays with probes for canine-gene transcripts have recently become

commercially-available. We designed the present study to analyze changes in canine cardiac gene-expression in two AF models: atrial-tachycardia remodeling induced by atrial tachypacing (ATP) and CHF-related remodeling produced by ventricular-tachypacing (VTP). Assessments were initially obtained at two time-points in each model: early after the onset of tachypacing (24 hours) and at a time of near steady-state remodeling (1 week for ATP,⁸ 2 weeks for VTP¹⁷). After initial studies showed that AF duration increases were smaller in 1-week ATP dogs versus 2-week VTP dogs, we added another group subjected to 6-week ATP.

Material and Methods

Because of manuscript-length limitations, we summarize only key methods in this section. Detailed methods are provided in the On-line Supplement.

Animal Model. These methods followed previous publications.^{6,7,10,18,19} Experiments were performed in male mongrel dogs weighing 25-32 kg. In the initial series of experiments, five groups (n=5/group) were studied. Two groups were subjected to VTP, for 24 hours or 2 weeks. A unipolar ventricular-pacing lead was inserted into the right-ventricular apex under 1.5%-halothane anesthesia and attached to a pacemaker in the neck programmed to 240 beats/min. Two other groups were subjected to ATP, for 24 hours or 1 week. These dogs were instrumented with a unipolar right-atrial (RA) lead attached to a pacemaker that captured the atrium at 400 beats/min and a ventricular-pacing lead attached to a demand-pacemaker programmed to 80 beats/min. Complete AV-block was induced by radiofrequency-ablation. A final group of VTP-sham control animals was handled identically to 24-hr VTP-dogs, but their pacemaker was not activated.

A second series of concurrent experiments was performed in 3 additional groups of dogs (n=5/group): because 1-week ATP proved not to promote AF as much as 2-week VTP, we added a 6-week ATP group, and to test for potential intervention-related differences we concurrently studied VTP and ATP shams. The VTP-shams were prepared as described above. The ATP-shams were prepared and handled identically to the 24-hour ATP-dogs, but their atrial pacemakers were not activated. VTP-shams were included in both experimental series since they were the primary control group for all analyses. For biochemical analyses in each series, experimental and sham animals were handled concurrently, with DNA extraction and microarray processing performed on the same days with the same reagents and on the same batches of microarrays to minimize variability. After preparation periods, dogs were anaesthetized (morphine, 2 mg/kg s.c.; α -chloralose, 120 mg/kg i.v. load; 29.25 mg/kg/hr maintenance infusion) and ventilated. In vivo measurements were obtained and an isolated-cardiomyocyte preparation was snap-frozen for subsequent analysis.

In Vivo Measurements and Cell Isolation. A median sternotomy was performed and Teflon-coated stainless steel electrodes were hooked into the RA appendage (RAA) for electrophysiological measurements. RAA effective refractory period (AERP) was measured at various basic cycle lengths (BCLs). Mean AF duration (DAF) was measured in each dog with multiple AF inductions as previously described.⁶⁻⁸ Left-ventricular end-diastolic pressure was measured at the end of each experiment. Animals were euthanized, hearts removed and placed in Tyrode solution equilibrated with 100% O₂ for dissection. The left atrium (LA) was perfused via the left circumflex coronary artery and cell-isolation performed via collagenase digestion.^{18,19} Electrophysiological measurements were obtained in the RAA and cell isolation/biochemical

analysis performed with LA tissue because in our previous experience tissue trauma caused by atrial manipulation for electrophysiological measurement can affect biochemical determinations.

Canine Genome Microarrays. The microarrays we used (Affymetrix GeneChip Canine Genome Array) are high-density oligonucleotide arrays (11- μ m spots) containing 23,836 25-mer probe-sets detecting 21,700 transcripts. For details, see On-line Supplement.

RNA Extraction, Quantification, and Processing on Arrays. RNA was extracted into chloroform from Trizol-immersed cell pellets (for details, see On-line Supplement). RNA was quantified and assessed for purity by measuring optical density at 260 nm and 280 nm. The quality was also verified by running samples on 2.5% agarose gels. Samples with OD ratio 260/280 nm >1.8 were selected for microarray processing.

For processing on microarrays, 10 μ g of total RNA was used. The target cRNA derived from each sample was verified for quality on Agilent RNA 6000 nano-chips and fragmented cRNA was hybridized to the microarray. The chips were stained and washed with the GeneChip Fluidics Station 450 and visualized on an Affymetrix GeneChip Scanner 3000.

Statistical Analysis of Microarray Data. The microarray expression data were analyzed using a combination of algorithms. We first applied the Invariant Set Normalization method²⁰ in dChip, which corrects for inter-array differences in brightness. To integrate each gene's probe intensities into one value representative of gene-expression, we used dChip to calculate the Model Based Expression Index.²¹ dChip was set to use only the intensities of the perfect match probes as well as detect single, probe, and array outliers. After formulating the gene-expression values, we used

Significance Analysis for Microarrays (SAM)²² to detect differentially-expressed genes, accepting only genes with a q-value<1.

For genes without Affymetrix annotations, we used BLAST to find mammalian-sequence homologies with an E-value<10⁻⁴. To enhance the annotations with functional information, we used Affymetrix's human to canine microarray comparisons to map canine genes to their human equivalents. With the human equivalents, we queried the Gene Ontology (GO) database for functional information. Genes not identified by this process were classified by literature search.

Western-blot Analysis. The expression of selected genes was verified at the protein level by Western blot. Protein was extracted from isolated-cardiomyocyte pellets. Equal amounts of protein (100 µg/sample) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred and then blotted with antibodies listed in On-Line Table 1. Bands were quantified and expressed as a ratio over the corresponding VTP-sham sample in the same gel, relative to GAPDH band-intensity on the same samples.

Real-time RT-PCR. Microarray-based expression ratios were confirmed with real-time RT-PCR for 18 selected genes. First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA. On-line PCR was performed with FAM-labeled fluorogenic TaqMan probes and primers. The fluorescence signals were normalized to results with 18S-ribosomal RNA and analysed with the comparative-threshold cycle (Ct) method. Each gene was quantified in duplicate for each sample. Forward and reverse primers and TaqMan probe-sequences are provided in On-line Table 2.

Statistical Analysis. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Comparisons among group means (Tables 1 and 2 and on-line Tables 5 and 6) were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for individual-mean comparisons relative to control (VTP-sham). A two-tailed $P<0.05$ was considered statistically-significant.

Results

Hemodynamics and Electrophysiology (Table 1). Consistent with previous studies,^{7,10} VTP-dogs showed increased left ventricular end-diastolic pressure and no significant AERP changes. ATP-dogs were hemodynamically similar to sham controls, but as in previous work⁴⁻⁶ showed substantial AERP decreases and loss of rate-adaptation at 1 week. DAF increased progressively in both models, with changes reaching statistical significance at 2 weeks in VTP-dogs and at 6 weeks in ATP-dogs. There were no statistically-significant differences between ATP-shams and VTP-shams.

Microarray Findings. Figure 1 shows all mRNA-expression levels in the initial series of dogs, with the mean value for each transcript probe-set plotted against mean VTP-sham expression. Values indicated by blue points are not significantly different from sham-values, whereas red points indicate statistically-significant changes. In ATP-dogs, 242 probe-sets showed significant changes at 24 hours and 87 at 1 week. VTP-dogs showed significant changes for 2209 probe-sets at 24 hours and 2720 at 2 weeks. Corresponding results for the second series of dogs are shown in Figure 2. No statistically-significant gene-expression differences were observed between 6-wk ATP-dogs and VTP-shams, nor between ATP-shams and VTP-shams. A full listing of relative expression values for all ATP and VTP groups are provided for each transcript probe-set with statistically-significant changes in On-line Table 3. Almost all (94%) of the significantly-changed

genes in ATP-dogs lie below the black line of identity and are therefore under-expressed. For VTP-dogs, large numbers of genes lie on either side of the line of identity (53% under-expressed; 47% over-expressed).

Of the differentially-expressed genes in ATP-dogs, 55 of the down-regulated and none of the upregulated values were common to both 24-hour and 1-week time-points. These 55 downregulated values make up over 72% of the downregulated results at 1-week ATP- thus, most of the differentially-expressed genes at 1 week are also downregulated at 24 hours. The ATP-pattern indicates a stronger early response, with decreasing numbers of significantly-altered genes over time. Unlike ATP, the VTP model had 25% more significantly-altered expression values at the later time-point. There are 336 upregulated and 567 downregulated transcript probe-sets common to both time-points, constituting 41% and 33% of the significantly-altered 24-hour and 2-week values respectively. Thus, more than half of the genes differentially-expressed in VTP at each time point are unique to that time point. For the transcript probe-sets common to both time points, a statistically-significant fraction (61%) was less altered at the 2-week time point.

Figure 3 shows the functional categories of genes that are significantly up- and down-regulated in ATP and VTP-dogs. In ATP-dogs, the categories with the most genes altered are DNA/RNA synthesis/degradation and signal transduction. Almost all significantly-changed genes were down-regulated. For all but the ribosomal-gene category, more genes were changed at 24 hours (black bars) than 1 week (white bars). The grey bars, representing genes changed at both 24 hours and one week, show that for most groups all genes changed at 1 week were also significantly altered at 24 hours. Several gene-categories (apoptosis, extracellular matrix (ECM), and transport) have no representation at 1 week. In contrast, for VTP-dogs most of the functional groups show unique 24-hour and 2-week responses, with overlap representing less than half the

total response. Approximately as many values in each group represent up-regulation as down-regulation.

To evaluate whether gene-groups respond uniformly to each intervention or whether specific gene-groups change differentially, we calculated the percentage-change relative to sham in each dog for each significantly-altered transcript probe-set and ranked all changes from largest to smallest, with 1 being the most-changed gene and the highest rank-number the least-changed gene. We then plotted for each gene-group the fraction of its ranks that fell within each cohort of genes as ranks increased by integer from 1 (the most changed expression-value) to the least-changed value. To assess statistical significance, we calculated the sum of ranks for each functional gene-group and then randomly reassigned expression ratios to groups. For each permutation, we calculated the sum of ranks for the random groups and compared them to the originals. This process was repeated 100,000 times, and those gene-groups whose sum of ranks were lower/higher than the random groups more than 97.5% of the time (2-tailed $P < 0.05$) were considered to have significantly larger/smaller expression-changes compared to overall behavior. Results following average behavior are shown by black lines; groups deviating significantly from average are shown by blue or red lines for larger or smaller changes respectively (Figure 4). For 24-hour VTP-dogs (Figure 4A), genes associated with metabolism, ECM, and cell structure/mobility showed the largest changes. At 2-week VTP (Figure 4B), the same functional categories show larger-than-average changes, along with immunity/coagulation genes. At both time points, ribosome-associated genes showed smaller-than-average changes, but DNA/RNA synthesis/degradation genes only deviated from average at 2 weeks. The analyses are less clear for ATP-dogs (on-line Figure 1), because of the much smaller number of significantly-changed genes. At 24 hours, immunity/coagulation and metabolism genes occupy significantly higher

ranks than other groups, whereas at 1 week no groups deviate significantly from average responses. On-line Table 4 shows detailed values and distribution properties from these analyses.

Real-time RT-PCR Results. Figure 5 compares the expression levels of selected genes as determined by microarray and real-time RT-PCR methods in the first series of dogs. The genes were selected to include genes believed to be of pathophysiological significance, as well as genes with over-expression, under-expression and no apparent expression change. Overall, there was a strong linear correlation between results with the 2 methods ($R^2=0.96$). Because most of the values were concentrated within the 0-5 fold change range, this section of the graph is expanded at the left for better resolution. Detailed results are presented in On-line Table 5. There is generally close agreement between the independent determinations of mRNA expression by the two methods. Of 36 sample-sets showing statistically-significant changes by microarray, 22 (61%) show statistically-significant changes of the same order and direction by RT-PCR. For the 14 sample-sets with significant changes by microarray and non-significant changes by RT-PCR, 11 (79%) show changes of the same direction and order with both methods.

Western-blot Results. Figure 6 shows typical blots for the 9 gene products selected for Western-blot analysis. Table 2 presents the mean results of Western-blot analyses, along with the corresponding results from microarray analysis. Statistical congruence was observed for 28 of 36 sample sets: 24 sample-sets (shown in green in Table 2) did not change significantly by either gene-chip or Western blot, and 4 sample-sets (shown in yellow in Table 2) changed significantly in the same direction. For 5 of the remaining 8 sample-sets (pink in Table 2), changes were statistically significant for only one of gene-chip or Western blot, but were in the same quantitative direction. For 3 sample-sets (cathepsin L in 2-week VTP and cathepsin S in 24-hour

and 2-week VTP dogs), statistically-significant increases or decreases of the order of 30-50% were seen in one measurement and either directionally-discrepant or no change was observed with the other. There was thus good general agreement between changes in protein expression and changes in mRNA-expression, although some quantitative differences were clearly present (e.g. for collagen-III, KChIP2 and IL1-RA).

Discussion

We have analyzed changes in canine atrial mRNA expression induced by atrial-tachycardia remodeling and ventricular-tachypacing induced heart failure over time. The results highlight major differences in the molecular basis of these two atrial arrhythmogenic-remodeling paradigms and indicate important time-dependent evolution of gene-expression changes.

Relationship to Previous Findings Regarding Gene-expression Profiles in AF. Several gene-microarray studies have been performed in AF patients. Kim et al found up-regulation of pro-oxidant and down-regulation of antioxidant genes.¹¹ Investigators subsequently found 33 genes with >50% up-regulation and 63 with >50% down-regulation,^{12,13} with changes in genes related to cell signalling, inflammation, oxidation and cellular respiration.¹³ Barth et al found that the human atrial transcriptome changed to a ventricular-like pattern in AF-patients.¹⁴ One limitation of these studies was the difference in heart disease between AF-patients (valve disease, often with cardiac hypertrophy, dilation and/or dysfunction) compared to sinus-rhythm controls (coronary-artery disease with well-preserved ventricular function). It is therefore difficult to separate changes due to AF from underlying disease-related remodeling. We recently analyzed AF-related transcriptome remodeling in heart-disease matched patients with AF versus sinus rhythm.^{15,23} Most gene-expression changes were attributable to underlying heart disease: ~2/3 of ion-channel

gene-changes¹⁵ and >90% in the complete transcriptome²³ occurred in both sinus-rhythm and AF patients.

Much less information is available from animal models of AF. Changes in cellular structure, metabolism, gene-expression regulation and differentiation genes were observed in a goat model.²⁴ In a porcine atrial-tachypacing model, 387 genes were altered.¹⁶ In neither model was ventricular-rate controlled, so a contribution of tachycardia-induced cardiomyopathy cannot be excluded.

Here, we used canine-specific microarrays to study changes with ~21,000 transcript probe-sets over time in ATP and VTP-dogs. Our results show striking differences in the quantity, magnitude and types of gene-expression changes induced by the two interventions. Whereas atrial-tachypaced dogs primarily showed decreasing numbers of transcript-expression changes over time, VTP-dogs displayed complex temporal evolution with some transcripts becoming less affected over time and others more affected. Particularly striking were changes in ECM-gene expression, with relatively small changes in most genes at 24 hours and very large changes at 2 weeks (e.g. 8 collagen-genes up-regulated >10-fold, fibrillin-1 8-fold and MMP2 4.5-fold; On-line Table 3). However, fibronectin was >10-fold and lysine oxidase-like (LOXL)-2 was ~5-fold up-regulated at both 24-hour and 2-week time-points. ECM genes were virtually unchanged in ATP-dogs, with small (~20-30%) decreases in 3 collagen genes at 24 hours and no significant ECM-gene changes thereafter.

Relevance to Mechanisms of AF-related Remodeling. Ventricular tachypacing-induced CHF produces structural and ionic remodeling resembling the substrate for chronic AF in man.^{3,7,10} Our results provide extensive new information about the nature and number of atrial gene-systems affected over time during the evolution of CHF. The prominence of changes in ECM

genes, particularly those associated with collagen production, is consistent with the fibrosis that appears central to arrhythmogenesis.^{25,26} Collagen-associated mRNA expression is dramatically increased at 2-week VTP, when fibrosis approaches maximum, and is much less affected at 24 hours, when fibrosis has not yet appeared.¹⁷ Early-phase reactive ECM genes, such as α_1 -antitrypsin and fibronectin (activity increased ~5 and ~10-fold at 24-hour VTP), may be involved in early changes leading to fibrosis. Altered regulation of genes involved in metabolism and cellular contraction are consistent with energy-saving adaptations.

To pursue the gene-response analysis, we considered genes whose protein-products interact with TGF β , in view of evidence for a potentially-important role of TGF β in AF-related fibrotic remodeling.^{27,28} We identified all proteins in the Human Protein Reference Database that interact with TGF β or a TGF β -interacting protein. For 383 proteins identified, we used BLAST to find corresponding probe-sets on our microarray. Of 214 genes whose expression could be measured, 85 were differentially expressed in VTP-dogs (On-line Figure 2). Interestingly, connective-tissue growth factor (CTGF) gene-expression was enhanced by 24-hour VTP. CTGF is up-regulated by angiotensin 2,²⁹ TGF β 1,³⁰ or alterations in the cytoskeleton.³¹ CTGF promotes fibrosis in pathological conditions by blocking a negative TGF β -feedback loop mediated by Smad 7 signaling, allowing continued TGF β -related activation.³² The addition of CTGF to primary mesangial cells induces fibronectin production, cell migration, and cytoskeletal rearrangement.³³ Fibronectin expression is enhanced by 24-hour VTP and fibronectin interacts with a wide range of TGF β -related products of genes altered in VTP (On-line Figure 2). Thus, CTGF is an interesting potential candidate for a significant role in VTP-related remodeling. Further exploration of this and other networks identified by the rich genomic data obtained in the present work is indicated, but goes beyond the scope of this study. The very large number of

genes affected by VTP points out the potential pitfalls in assessing a small number of selected genes without understanding the gene-response background against which such changes occur.

In contrast to VTP-remodeling, ATP-remodeling is associated with preserved tissue architecture and a predominance of ionic remodeling.^{7,9,34} The virtual absence of ECM-gene changes in the ATP data set is consistent with this structurally-benign remodeling. We observed relatively limited changes in ion-channel genes, despite the importance of ion-channel alterations in ATP-induced AF promotion.^{3,9,34} This may reflect important post-transcriptional mechanisms,^{35,36} but likely also reflects relatively low-level expression of ion-channel genes that makes it difficult to differentiate ion-channel gene-expression changes from background noise in a pan-genomic microarray. To assess ion-channel subunit mRNA changes accurately requires specialized microarrays¹⁵ that are presently unavailable for the dog. The decreasing number of gene-expression changes that occurred over time with ATP-remodeling suggests a time-related reduction in the stimuli for gene-expression change, consistent with atrial adaptation to the stress of ATP.

Potential Significance. Clinical gene-microarray studies in AF are limited by a range of factors (e.g. underlying cardiac disease, drug therapy, duration of AF, etc) varying within the population. Animal models permit the assessment of transcriptomal changes under controlled duration and nature of atrial-remodeling stimuli. The present study is the first assessment of mRNA-expression remodeling in animal AF models to use species-specific microarrays. In addition, it is the first to compare atrial-transcriptome remodeling due to atrial tachycardia *per se* with remodeling caused by an AF-promoting cardiac condition (CHF) and the first to study the evolution of gene-changes over time. Our results illustrate the importance of considering underlying disease-related gene-expression changes in AF populations. They also clearly contrast

the relatively modest mRNA-expression changes caused by atrial tachycardia with the extensive alterations induced by CHF.

Potential Limitations. We selected analysis time-points based on evidence that early-phase VTP-induced atrial changes peak at 24 hours,^{17,27} important atrial electrophysiological remodeling occurs with ATP at 1 week^{8,31} and with VTP at 2 weeks.^{17,27} Time-points additional to the ones we used might be interesting to examine. We do not know whether cardiac mRNA-level alterations were due to changes in synthesis or degradation. The studies necessary to resolve this question are not presently feasible at the scale that would be needed for the large number of genes we studied. We used an isolated-cardiomyocyte preparation for which we previously found very little contamination by other cell-types, but we cannot totally exclude contributions from non-cardiomyocyte cell populations. Atrial remodeling could affect the expression of controls (GAPDH, 18-S rRNA respectively) for immunoblots and RT-PCR analyses; however, this proved not to be the case (On-line Table 6).

Acknowledgments. Supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Quebec Heart and Stroke Foundation and the MITACS Network of Centers of Excellence. SC received a Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) studentship and Sabrina Le Bouter FRSQ-INSERM and HSFC fellowships. The authors thank Chantal Maltais, Nathalie L'Heureux and Chantal St-Cyr for technical help and France Thériault for secretarial support.

References

1. Steinberg JS. Atrial fibrillation: an emerging epidemic? *Heart*. 2004;90:239-240.
2. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103:769-777.
3. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002;415:219-226.
4. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995;92:1954-1968.
5. Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation*. 1996;94:2953-2960.
6. Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation*. 1997;96:4027-4035.
7. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100:87-95.
8. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;81:512-525.
9. Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:137-148.
10. Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation*. 2000;101:2631-2638.

11. Kim YH, Lim do S, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med*. 2003;35:336-349.
12. Ohki-Kaneda R, Ohashi J, Yamamoto K, Ueno S, Ota J, Choi YL, Koinuma K, Yamashita Y, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U, Shimada K, Mano H. Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320:1328-1336.
13. Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U, Shimada K. Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. *Int J Cardiol*. 2005;102:233-238.
14. Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, Steinmeyer K, Bleich M, Kaab S, Hinterseer M, Kartmann H, Kreuzer E, Dugas M, Steinbeck G, Nabauer M. Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res*. 2005;96:1022-1029.
15. Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Léger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;112:471-481.
16. Lai LP, Lin JL, Lin CS, Yeh HM, Tsay YG, Lee CF, Lee HH, Chang ZF, Hwang JJ, Su MJ, Tseng YZ, Huang SK. Functional genomic study on atrial fibrillation using cDNA microarray and two-dimensional protein electrophoresis techniques and identification of the myosin regulatory light chain isoform reprogramming in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004;15:214-223.

17. Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and - independent pathways. *Cardiovasc Res.* 2003;60:315-325.
18. Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol.* 1996;270:H2157–H2168.
19. Li D, Zhang L, Kneller J, Nattel S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ Res.* 2001;88:1168-1175.
20. Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol.* 2001;2:0032.1-0032.11.
21. Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:31-36.
22. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:5116-5121.
23. Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier C, Lande G, Demolombe S, Escande D, Nattel S, Léger JJ, Steenman M. Gene expression profile changes associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40:173-184.
24. Thijssen VL, van der Velden HM, van Ankeren EP, Ausma J, Allessie MA, Borgers M, van Eys GJ, Jongsma HJ. Analysis of altered gene expression during sustained atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res.* 2002;54:427-437.
25. Shinagawa K, Shi Y-F, Tardif JC, Leung T-K, Nattel S. Dynamic nature of atrial fibrillation substrate during development and reversal of heart failure in dogs. *Circulation.* 2002;105:2672-2678.

26. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, Nattel S. Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation*. 2004;109:412-418.
27. Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypaced-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 2004;63:236-244.
28. Verheule S, Sato T, Everett T 4th, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res*. 2004;94:1458-1465.
29. Liu B, Yu J, Taylor L, Zhou X, Polgar P. Microarray and phosphokinase screenings leading to studies on ERK and JNK regulation of connective tissue growth factor expression by angiotensin II 1a and bradykinin B2 receptors in Rat1 fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2006;97:1104-1120.
30. Mulsow JJ, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Transforming growth factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. *Ann Surg*. 2005;242:880-887.
31. Ott C, Iwanciw D, Graness A, Giehl K, Goppelt-Strube M. Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2003;278:44305-44311.
32. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res*. 2005;307:305-314.
33. Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced

- extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:44187-44194.
34. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li G-R, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;81:512-525.
 35. Brundel BJ, Ausma J, van Gelder IC, Van der Want JJ, van Gilst WH, Crijns HJ, Henning RH. Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002;54:380-389.
 36. Christ T, Boknik P, Wohrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D. L-type Ca^{2+} current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation*. 2004;110:2651-2657.
 37. Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation*. 1997;96:4027-4035.

TABLE 1. Hemodynamic and Electrophysiological Changes**A. Results in 1st series: VTP-sham, 24-h and 2-w VTP, 24-h and 1-w ATP-dogs**

	VTP-Sham	24-h VTP	2-w VTP	24-h ATP	1-w ATP
SBP (mmHg)					
Systolic	136±7	109±16	108±15	133±20	129±10
Diastolic	90±5	68±9	70±12	75±14	77±8
LVP (mmHg)					
End-diastolic	1±1	5±2	16±5**	2±2	2±2
AERP (ms)					
BCL					
360	122±11	119±8	136±12	113±18	70±5**
300	125±10	117±9	133±13	120±12	71±5**
250	124±13	113±11	129±12	119±7	76±7**
200	117±7	108±10	121±13	112±5	75±7**
150	98±7	96±10	102±7	98±8	76±9*
DAF (s)	39±25	300±360	837±436*	15±8	339±384

SBP=systemic blood pressure; LVP=left-ventricular pressure; BCL = basic cycle length.

*, ** $P<0.05$, 0.01 versus VTP-sham.

B. Results in 2nd series: ATP-sham, VTP-sham, and 6-w ATP-dogs

	VTP- Sham	ATP- Sham	6-w ATP
SBP (mmHg)			
Systolic	133±14	134±11	121±3
Diastolic	85±11	74±7	65±1*
LVP (mmHg)			
End-diastolic	4±2	4±4	1±2
AERP (ms)			
BCL			
360	124±4	120±2	86±12**
300	120±3	121±3	88±10**
250	124±13	113±11	87±9**
200	127±10	121±7	88±9**
150	108±7	102±6	83±8*
DAF (s)	87±39	21±6	997±324**

SBP=systemic blood pressure; LVP=left-ventricular pressure; BCL = basic cycle length.

*, **, $P<0.05$, 0.01, versus VTP-sham.

TABLE 2. COMPARISON BETWEEN MICROARRAY AND WESTERN BLOT RESULTS

Protein	Gene ID	Group	Microarray	Western	Blot
				mean	SEM
Calmodulin Signal transduction	1583631	24-h VTP	1.18	0.81	0.08
		2-w VTP	1.45	0.56	0.25
		24-h ATP	1.15	1.02	0.09
		1-w ATP	1.56	1.15	0.05
Cathepsin L Apoptosis	1583225	24-h VTP	0.59*	0.89	0.23
		2-w VTP	1.21	0.63*	0.15
		24-h ATP	0.77	0.93	0.12
		1-w ATP	0.72	0.95	0.2
Cathepsin S Apoptosis	15996801	24-h VTP	1.30*	1.01	0.78
		2-w VTP	1.49*	0.64	1.1
		24-h ATP	1.25	1.12	0.34
		1-w ATP	1.3	1.15	0.17
P53 Apoptosis	1582452	24-h VTP	1.06	0.75	0.15
		2-w VTP	0.97	0.92	0.29
		24-h ATP	0.94	1.04	0.35
		1-w ATP	0.93	0.92	0.28
Collagen III Extracellular matrix	1591762	24-h VTP	2.27	0.98	0.34
		2-w VTP	20.18*	1.79**	0.29
		24-h ATP	2.78	1.19	0.37
		1-w ATP	4.49	0.87	0.27
MMP-2 Extracellular matrix	1582764	24-h VTP	1.07	1.39	1.13
		2-w VTP	4.46*	3.18**	2.4
		24-h ATP	1.23	0.75	0.17
		1-w ATP	1.52	2.36	0.77
FLAP Immunity	1601853	24-h VTP	3.32*	1.29	0.45
		2-w VTP	4.70*	1.57	1.45
		24-h ATP	1.58	1.3	0.08
		1-w ATP	2.05	1.29	0.64
IL1-RA Immunity	1582494	24-h VTP	3.42	0.89	0.14
		2-w VTP	9.97	0.58	0.18
		24-h ATP	1.39	0.95	0.2
		1-w ATP	1.95	0.98	0.27
KCHIP2 Transport	1582775	24-h VTP	0.36*	0.24**	0.07
		2-w VTP	0.17*	0.12**	0.01
		24-h ATP	0.69	0.09**	0.01
		1-h ATP	0.85	0.24**	0.03

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs sham. Yellow=significant on both Gene-chip and Western blot; Green=non-significant on both Gene-chip and Western; Pink=significant on only one of Gene-chip or Western blot but directionally similar. Statistical analysis of Western-blot results was performed by 1-way ANOVA on raw data; however, to facilitate comparison with microarray data results are expressed as ratios relative to VTP-sham controls.

Figure Legends

Figure 1. Overall changes in mRNA expression compared to sham in 24-hour ATP (A), 1-week ATP (B), 24-hour VTP (C) and 2-week VTP (D) samples. The absolute expression, in $\log_e(L)$, where L =mean sample-luminescence, for each intervention-group transcript probe-set is plotted as a function of the corresponding value for the VTP-sham group and represented as a single point. Blue points are not significantly different from sham; red points are significantly different. If no changes in mRNA-expression occurred, all points would fall on the black line of identity.

Figure 2. Overall mRNA-expression comparisons between (A) 1-week ATP versus VTP-sham (B), ATP-sham versus VTP-sham. Format as in Figure 1.

Figure 3. Number of transcript probe-sets in each functional group which was significantly down- or up-regulated by atrial-tachycardia remodeling (left) or ventricular-tachycardia remodeling (right). “Overlap” refers to the number of values that were significantly affected in the same direction at both 24 hours and 1 week.

Figure 4. Cumulative fraction of ranks for each of the functional gene groups in VTP-dogs (for discussion of method, see text). Functional group curves in blue showed expression-ranks significantly greater than that of overall genome indicating larger-than-average changes; functional groups in red showed expression-ranks that were significantly less, indicating smaller-than-average changes.

Figure 5. Correlation between expression changes by real-time PCR versus microarray. Regression lines are shown.

Figure 6. Examples of Western blots for 9 proteins studied to compare protein versus mRNA expression changes.

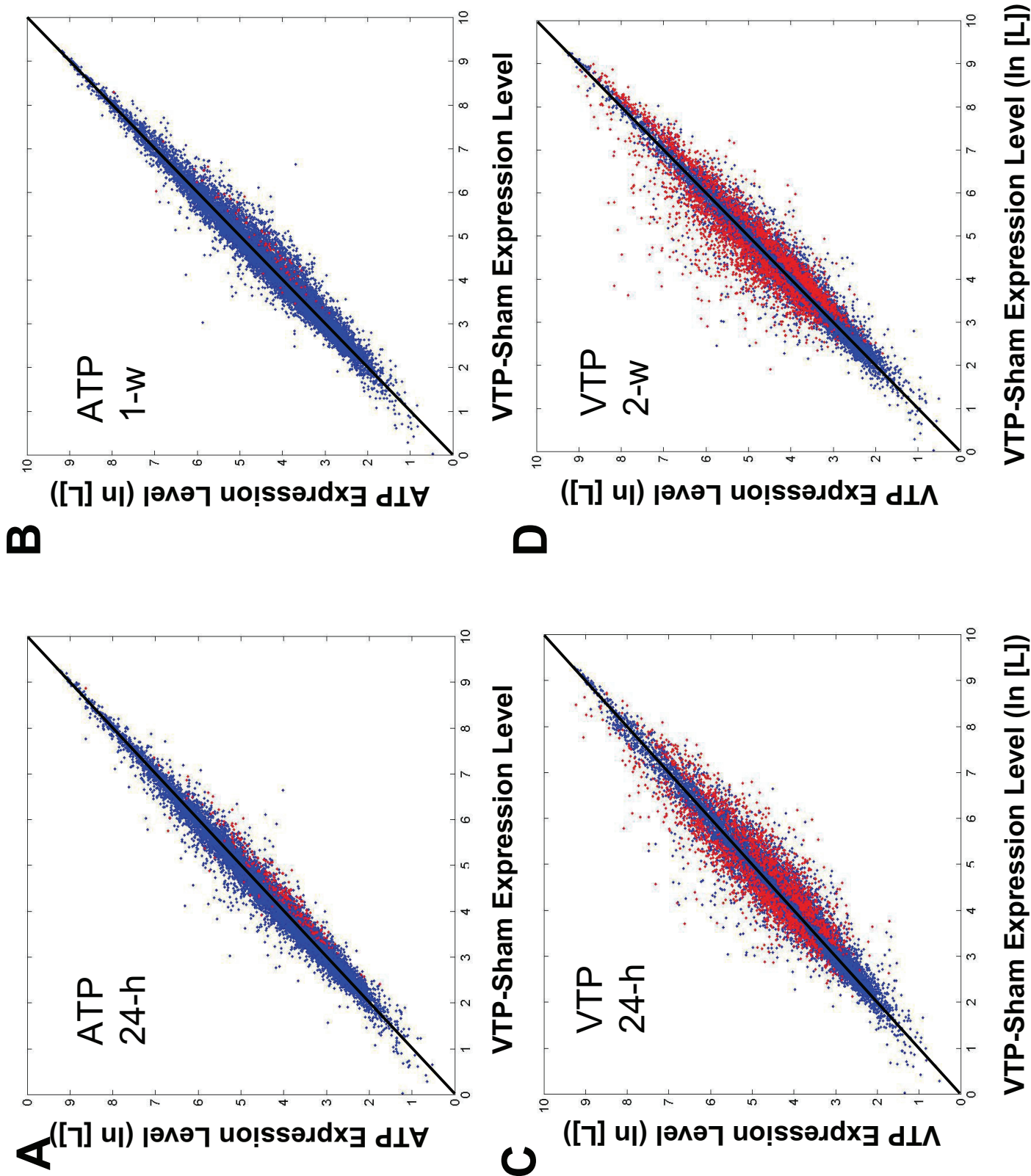


Figure 1

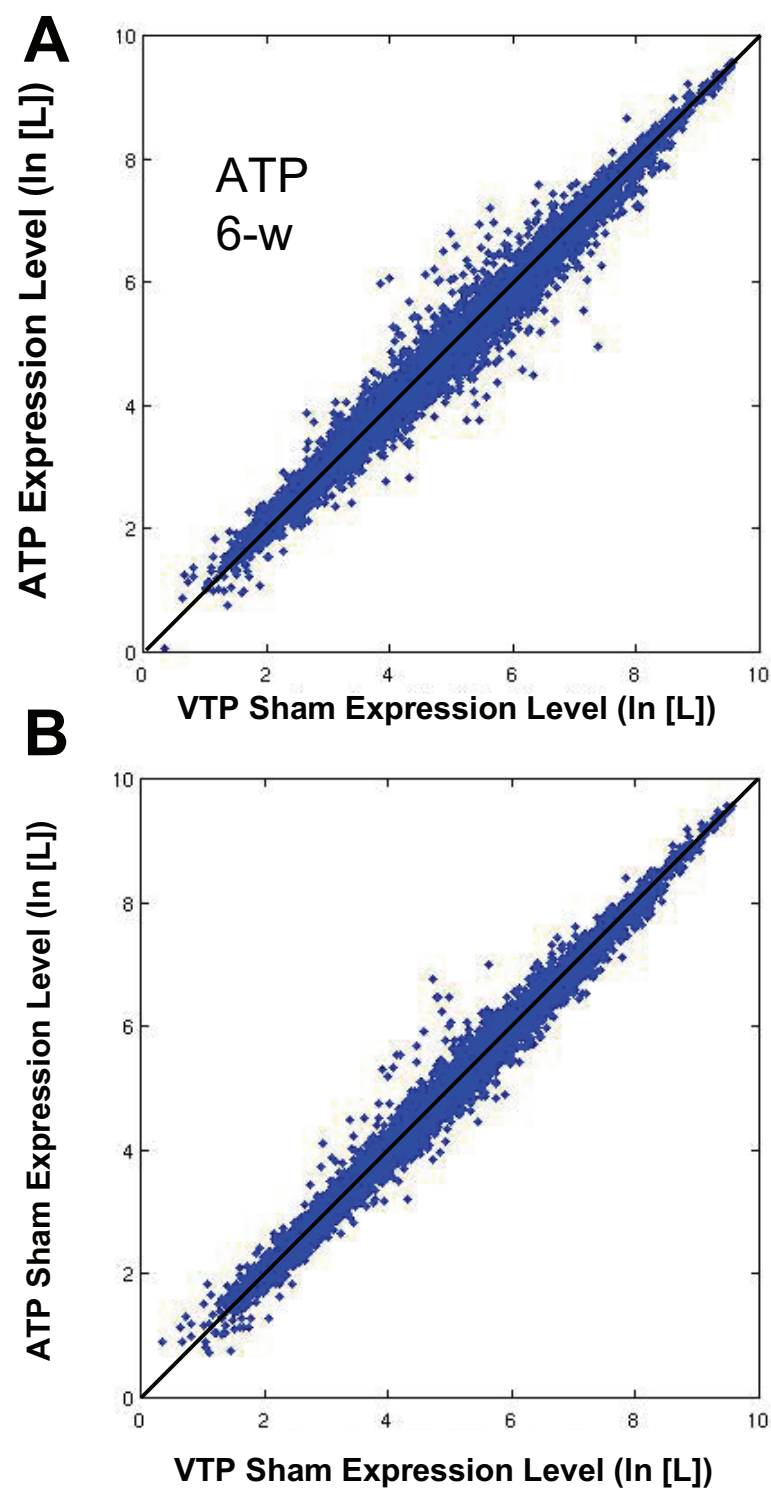


Figure 2

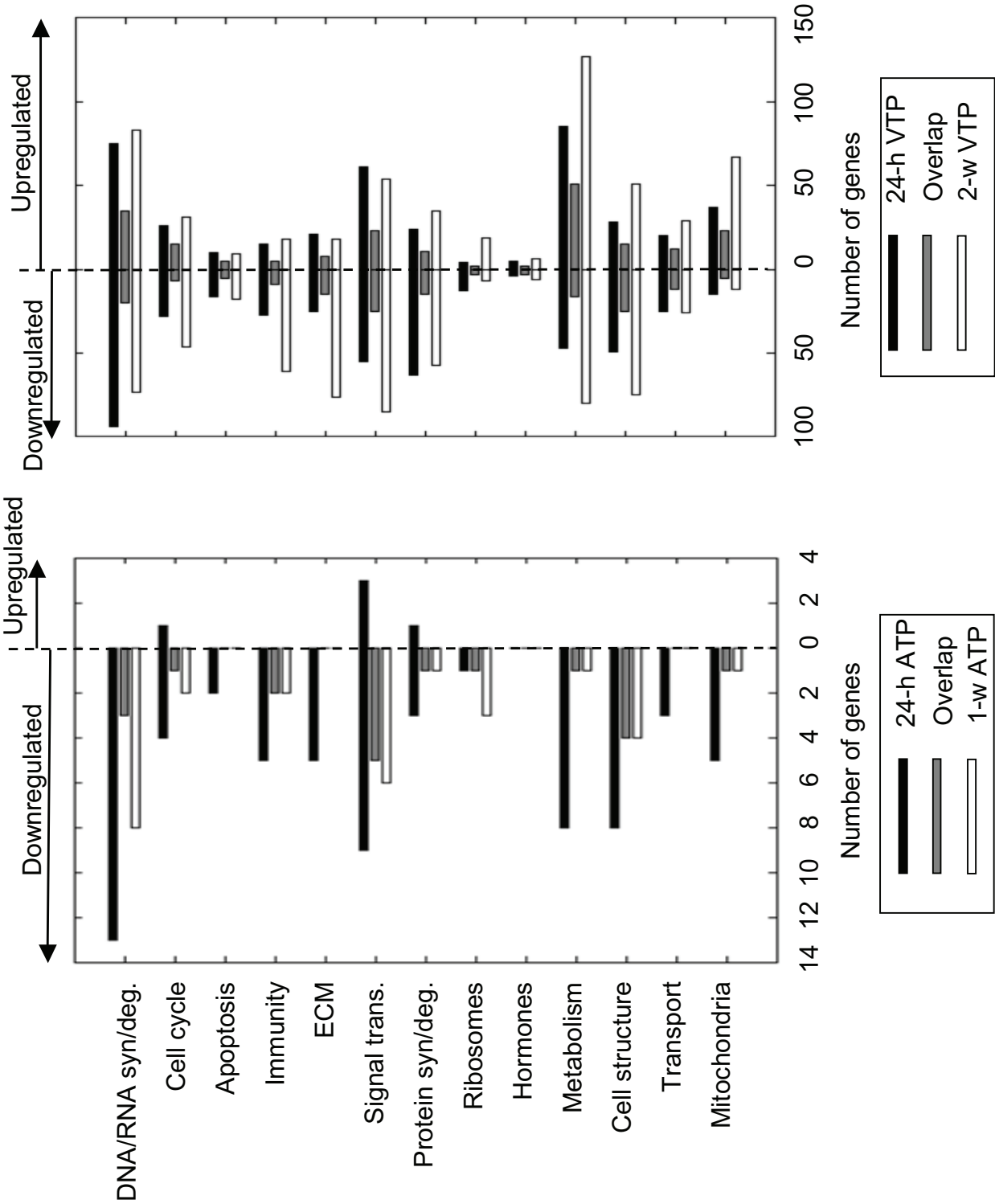
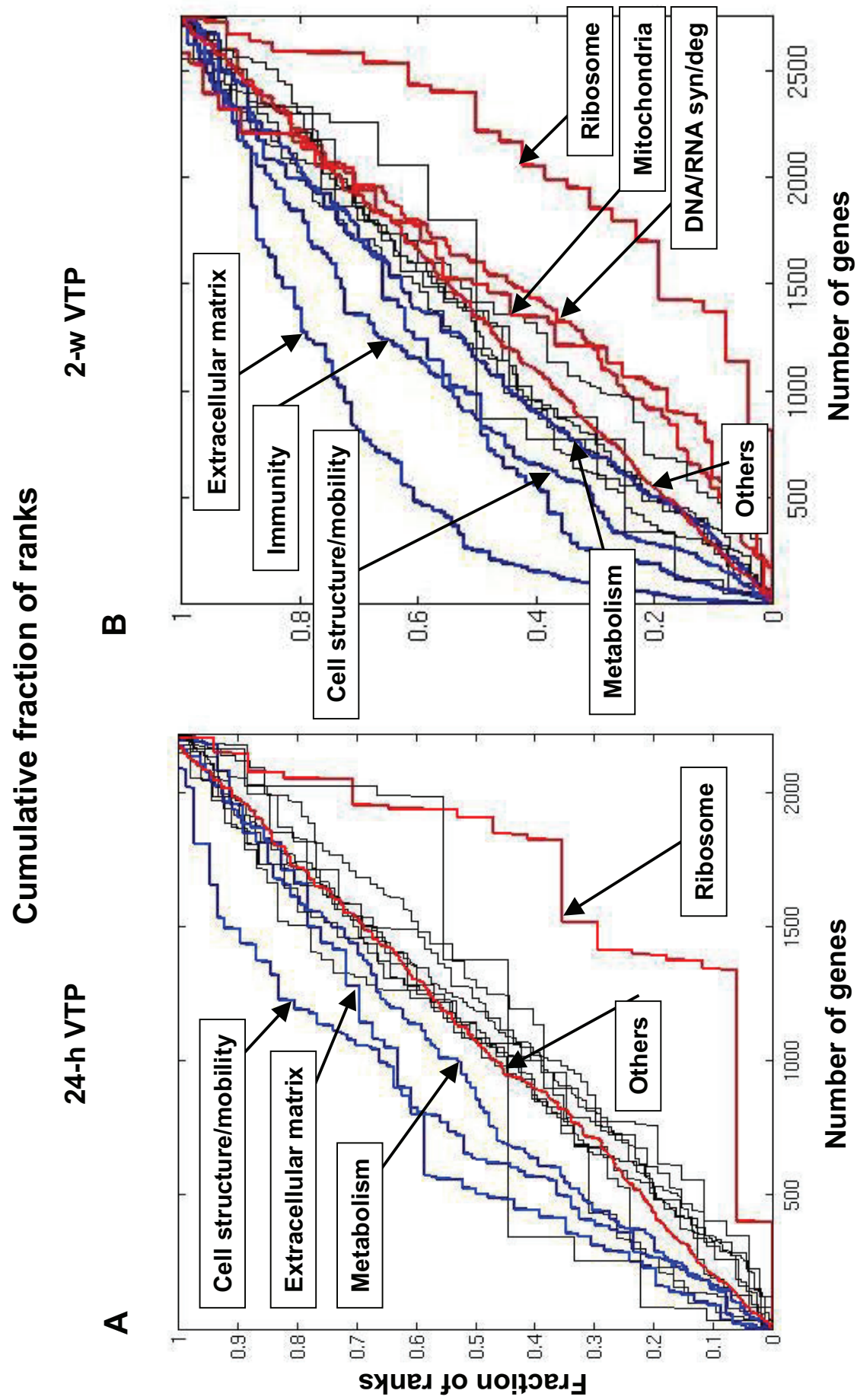


Figure 3



Gene groups deviating from overall VTP expression pattern

Figure 4

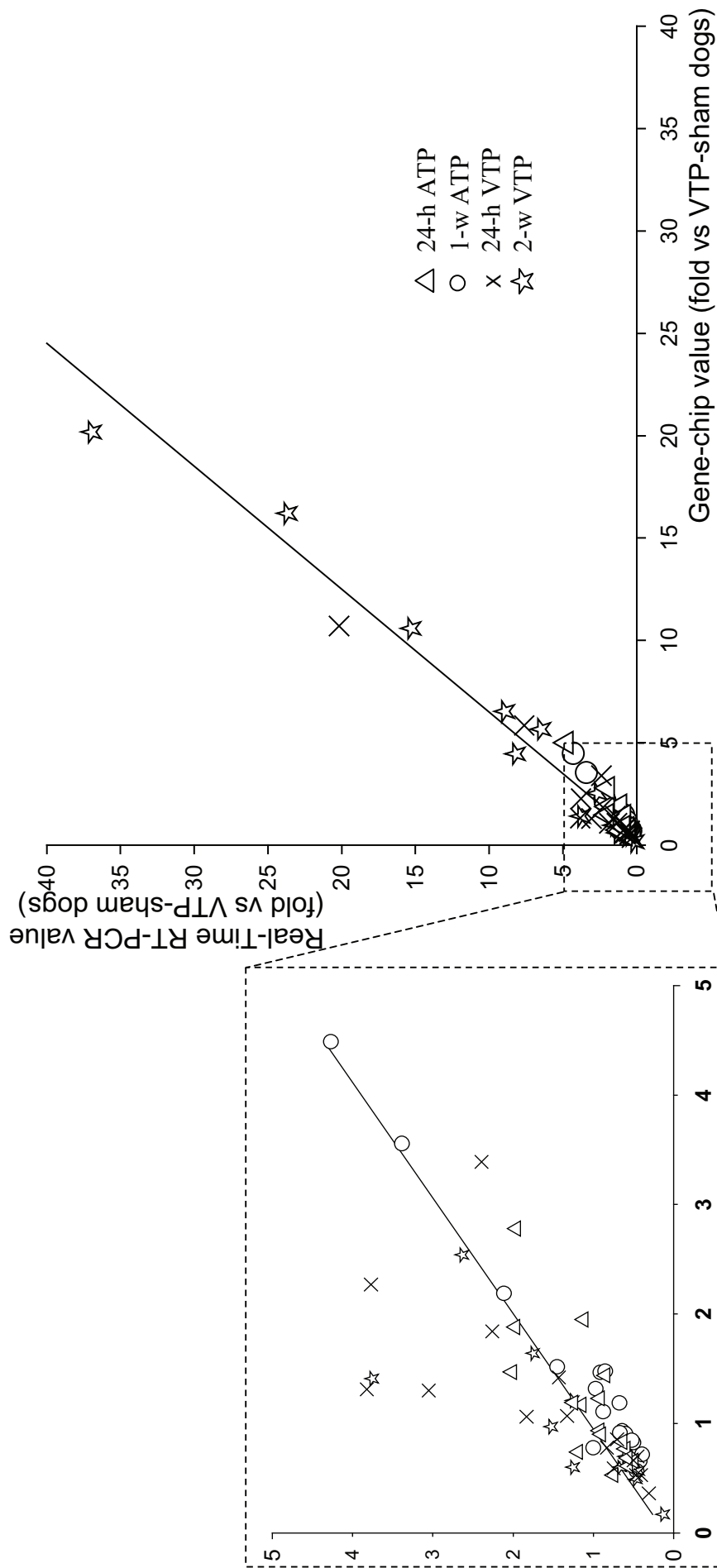


Figure 5

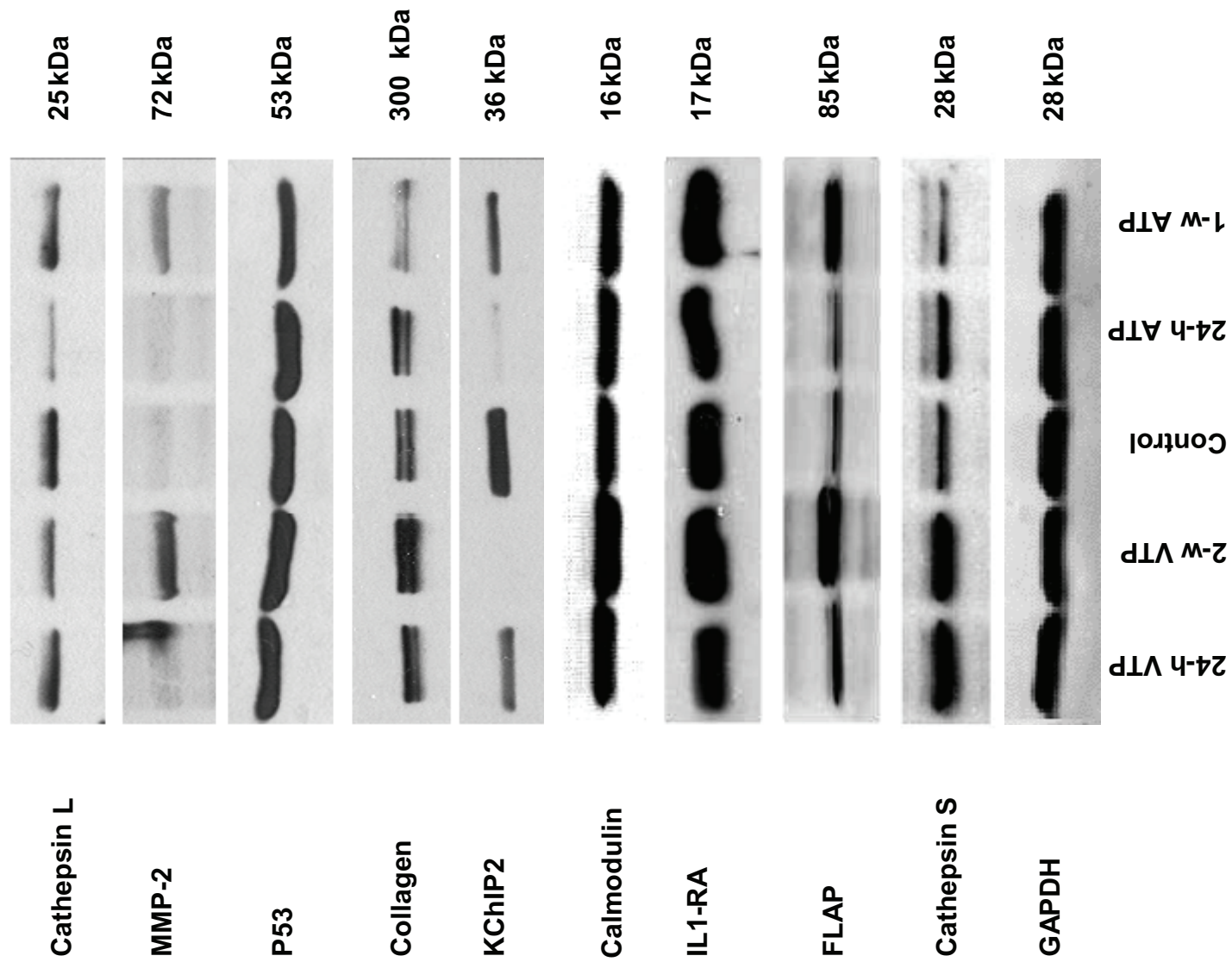


Figure 6

Chapître 4. Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.

L'insuffisance cardiaque entraîne non seulement un remodelage auriculaire, mais aussi un remodelage ventriculaire. L'étude décrit dans chapitre 3 a mis en évidence les grands changements évolutifs dans l'expression génétique au niveau atrial causés par l'insuffisance cardiaque. Nos études précédentes (Hannah et al. 2004) ont cependant montré que les changements biochimiques, histologiques et fonctionnels étaient plus précoces et de plus grande intensité que les changements observés au niveau ventriculaire. La comparaison des bases moléculaires sous-jacentes au remodelage auriculaire et ventriculaire pourraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes du remodelage tissulaire induit par l'insuffisance cardiaque et de mettre en évidence les différences qui existent entre les voies de signalisation impliquées dans le remodelage de chacun des chambres. De plus, la démonstration que certaines voies de signalisation sont plus activées au niveau atrial que ventriculaire pourrait donner des indications sur les cibles thérapeutiques atrial.

Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure

Sophie Cardin,* Patricia Pelletier,* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao,
Stefan Kääh, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel

From Research Center, Montreal Heart Institute (S.C., P.P., S.L.B., S.N.), Department of Pharmacology, Université de Montréal, (P.P., S.N.) Departments of Pharmacology (S.C., L.X., S.N.) and Physiology (E.L., L.G.), McGill University, Montreal, Medical Hosp I, University of Munich (S.K.), Germany, and INSERM, UMR915, l'Institut du Thorax (S.D.), CNRS, ERL3147 (S.D.), and Université de Nantes (S.D.), Nantes, F-44000 France.

Running head: Atrial and ventricular genomics in CHF

* S.C. and P.P. contributed equally to this study and share first authorship.

Correspondence to: Stanley Nattel, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. E., Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel.: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355; E-mail:
stanley.nattel@icm-mhi.org

Abstract

Congestive heart failure (CHF) causes arrhythmogenic, structural and contractile remodelling, with important atrial-ventricular differences: atria show faster and greater inflammation, cell-death and fibrosis. The present study assessed time-dependent left atrial (LA) and ventricular (LV) gene-expression changes in CHF. Groups of dogs were submitted to ventricular tachypacing (VTP, 240 bpm) for 24 hours or 2 weeks, and compared to sham-instrumented animals. RNA from isolated LA and LV cardiomyocytes of each dog was analyzed by canine-specific microarrays (>21,700 probe-sets). LA showed dramatic gene-expression changes, with 4785 transcripts significantly-altered ($Q < 5$) at 24-hour and 6284 at 2-week VTP. LV gene-changes were more limited, with 52 significantly-altered at 24-hour and 130 at 2-week VTP. Particularly marked differences were seen in ECM genes, with 153 changed in LA (e.g. ~65-fold increase in collagen-1) at 2-week VTP versus 2 in LV; DNA/RNA genes (LA=358, LV=7); protein biosynthesis (LA=327, LV=14); membrane transport (LA=230, LV=8); cell structure and mobility (LA=159, LV=6) and coagulation/inflammation (LA=147, LV=1). Noteworthy changes in LV were genes involved in metabolism (35 genes; creatine-kinase B increased 8-fold at 2-week VTP) and Ca^{2+} -signalling. LA versus LV differential gene-expression decreased over time: 1567 genes were differentially-expressed ($Q < 1$) at baseline, 1499 at 24-hour and 897 at 2-week VTP. Pathway analysis revealed particularly-important changes in LA for mitogen-activated protein-kinase, apoptotic, and ubiquitin/proteasome systems, and LV for Krebs-cycle and electron-transfer complex I/II genes. VTP-induced CHF causes dramatically more gene-expression changes in LA than LV, dynamically altering the LA-LV differential gene-expression pattern. These results are relevant to understanding chamber-specific remodelling in CHF.

Key Words: heart failure, arrhythmias, remodelling, gene expression, arrhythmias, metabolism, fibrosis

Introduction

Congestive heart failure (CHF) is a leading cause of hospital admission and presently affects over 5 million Americans [1]. It is also one of the most important causes of atrial fibrillation (AF), the most common sustained cardiac arrhythmia [2]. Both pathologies are associated with important structural, electrophysiological, biochemical and molecular remodelling [3]. There are significant atrial-ventricular gene-expression differences [4], as well as differences between atrial and ventricular remodelling [5]. Ventricular gene-expression changes have been studied in dogs with terminal CHF caused by ventricular tachypacing (VTP) [6].

The VTP model of CHF produces a substrate for AF that reproduces many features observed in patients [7]. As in CHF patients, ventricular-tachypaced CHF dogs show time-dependent development of fibrosis, atrial and ventricular dilatation, and impaired ventricular and atrial function, as well as time-dependent electrophysiological remodelling manifested as ion-channel alterations and AF promotion [5, 8-11]. In view of the different phenotypic features of atrial versus ventricular remodeling with the development of VTP-induced CHF [5], it is reasonable to consider the possibility that there may be chamber-specific patterns of gene-expression alterations. Furthermore, Barth et al. have shown that the atrial gene-expression pattern is changed in AF patients, becoming more similar to the ventricular gene-expression pattern [12]. Whether similar changes in chamber-specific gene-expression patterns occur in animal models of AF is unknown. The canine VTP-model allows for observations at different time points during the development of CHF, as well as the possibility to isolate purified cardiomyocyte preparations in order to obtain information about cardiomyocyte gene-expression with minimal contamination from other cell-types. This study was designed to use canine-specific microarrays to compare the evolution of atrial and ventricular gene-expression changes

over 2 weeks of VTP, sufficient time to achieve the fully-developed AF substrate [13], as well as to determine whether chamber-specific gene-expression patterns are altered over this time.

Materials and methods

Animal Model

Animal care procedures were approved by the animal-research ethics committee of the Montreal Heart Institute following guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Experiments were performed on three groups of five mongrel dogs each, weighing 25-32 kg: 1 group each subjected to 24-hour or 2-week VTP, and a control sham-instrumented group. All groups were handled and followed as previously described [10, 13, 14]. A unipolar ventricular-pacing lead was inserted into the right-ventricular apex under 1.5%-halothane anesthesia and attached to a pacemaker in the neck. The pacemaker was programmed to pace at 240 beats/min.

On study days, an ECG was recorded to confirm continued pacemaker-capture. Dogs were then anaesthetized (morphine, 2 mg/kg s.c.; α -chloralose, 120 mg/kg i.v. load; 29.25 mg/kg/hr maintenance infusion) and ventilated. Arterial and left-ventricular (LV) end-diastolic pressures were measured with fluid-filled catheters.

Dogs were then euthanized by pentobarbital overdose, hearts were removed and placed in Tyrode solution aerated with 100% O₂. Left-atrial (LA) and left-ventricular (LV) free walls were removed and perfused via coronary arteries as previously described [14, 15]. Cell isolation was performed on full-thickness free-wall samples via collagenase digestion. Cell pellets were then snap-frozen and stored at -80°C.

RNA Extraction

Cell pellets were immersed into Trizol (1 mL/100 mg of pellet) and pulverised. Samples were centrifuged at 8,000 rpm, 15 minutes, and 4°C. The aqueous phase was transferred, added to an equal volume of chloroform and centrifuged (5 minutes, 8000 rpm, 4°C). The resulting aqueous phase was added to an equal volume of isopropanol, incubated (-20°C, 45 minutes) and centrifuged (8,000 rpm, 5 minutes, 4°C). Pellets were centrifuged in ethanol, then re-suspended in 70% ethanol and incubated overnight (-20°C). Samples were then re-centrifuged (13,000 rpm, 5 minutes, 4°C) and pellets dried and resuspended in DEPC water. RNA concentrations were characterized on RNA 6000 nano-chips (Agilent 2100 Bioanalyzer). Samples with 260/280 nm OD ratios <1.8 were rejected.

Microarray Processing and Analysis

Fragmented cRNA (10 µg) was hybridized to Affymetrix GeneChip Canine Genome Arrays (23,836 probesets detecting 21,700 transcripts) with Affymetrix GeneChip one-cycle target labeling and control reagents kits. One microarray was used for each tissue sample for each dog. Thus, since 3 groups of 5 dogs each were studied and 2 tissue samples (one from LA and from LV) were analyzed for each dog, results from a total of 30 microarrays were used. GeneChip Fluidics Station 450 was used to stain and wash the chips, followed by visualization on an Affymetrix GeneChip Scanner 3000.

Microarray expression data from each of the 30 chips studied were subjected to Invariant Set Normalization in dChip to correct inter-array difference in average brightness. The dChip algorithm was also used to calculate the Model Based Expression Index to integrate probe

intensities into one representative expression-value/gene. Multiple (~11) pairs of probes were used to measure the level of transcription of each sequence represented on the array. As set, dChip detected and rejected single, probe, and array outliers, using only the intensities of perfect-match probes for analysis. Canine-specific genes representing adrenergic-receptors, glucose-6-phosphatase, and glyceraldehyde-3-phosphate were employed as on-chip controls. Significance Analysis for Microarrays (SAM) was used to identify differentially-expressed genes in VTP versus sham comparisons at $q\text{-values} < 5$, implying that $< 5\%$ of genes identified as differentially-expressed would be false positives (equivalent to a P-value cut-off of $P < 0.05$). Since there was an extremely large number of atrial-ventricular gene differences, we reduced the $q\text{-value}$ for the atrial-ventricular comparison analysis to 1, to decrease false-positive identifications to $< 1\%$ (equivalent to a P-value of $P < 0.01$) and have a more tractable data set.

Genes without Affymetrix annotations were BLAST-searched for mammalian sequence-homologies with $E\text{-value} < 10^{-4}$. For functional annotations, we used Affymetrix's human-to-canine gene-mapping and the human Gene Ontology (GO) database. Genes that could not be identified by this process were classified by literature search.

Real-Time RT-PCR

Real-Time RT-PCR (Gene Amp 5700, Perkin-Elmer) was used to confirm microarray data for 19 selected genes. First-strand cDNA was synthesized from 2 μg total RNA (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems). On-line PCR was performed (duplicate analyses for each sample) with FAM-labelled fluorogenic TaqMan probes and primers (Assay-by-design, Applied Biosystems). Target-gene signals were normalized to 18S-ribosomal RNA-values. Primers and

probe sequences are provided in On-line Table 1. Data were analysed with the comparative threshold cycle (Ct) relative-quantification method.

Western Blot Analysis

Protein-expression for 8 selected genes was analyzed by Western Blot. Protein samples (100 µg) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose or PVDF membranes and incubated with antibodies listed in Online Table 2. Bands were quantified with QuantityOne software and normalized to GAPDH band-intensities on the same samples.

Pathway analysis

Gene network pathways were derived from GenMapp (Gene Map Annotator and Pathway Profiler), a free computer application available at www.genmapp.org designed to visualize gene-expression data on maps representing biological pathways and groupings of genes [16]. GenMapp 2.1 canine maps are homology maps derived from human-based maps and include 42 cellular, 27 metabolic, 11 molecular and 15 physiological process maps. The microarray dataset containing genes for each LA and LV VTP transcript with statistically-significant changes (q value < 5.0, listed in Online Table 3) were uploaded on an Excel spreadsheet containing identifiers (*Entrez gene*) and corresponding expression values. The raw data file was then converted via Expression Dataset Manager into a GenMAPP Expression Dataset format (.gex). Analysis was based on GenMAPP Gene Database canine-specific library Cf-Std_20070517.gdb, downloaded from www.genmapp.org. All the maps were applied and pathways containing multiple VTP-induced gene-expression changes of interest were retained for study/illustration. These maps were redrawn for data presentation with Microsoft PowerPoint 2007, with additional

genes added based on KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) and Reactome (<http://reactome.org/>) websites.

Statistics

Data are shown as mean $\pm$ SEM. All samples were studied as individual tissue samples from individual dogs: no sample pooling was performed. Comparisons were performed with analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

Results

VTP caused a decrease in arterial pressure and increase in LV end-diastolic pressure at 2 weeks (Table 1). At 2 weeks, all dogs had ascites, visibly dilated hearts and pulmonary congestion.

VTP-Induced Changes Relative to Sham

A detailed list of all genes showing statistically-significant differences for at least one analysis is provided in On-line Table 3. Relative to sham dogs, 4785 LA genes were differentially expressed by 24-hour VTP and 6284 by 2-week VTP. In contrast, 52 were differentially expressed in the LV at 24-hour VTP and 130 at 2-week VTP. Figure 1 shows mean mRNA-expression indices for each transcript versus corresponding sham values for each group of dogs. Red points indicate statistically-significant changes versus sham, blue points indicate values that were not significantly different between groups. A full listing of relative expression values, Gene IDs and annotations is provided for all LA and LV VTP transcripts with statistically-significant changes in Online Table 3.

Figure 2 shows the number of significantly up- and down-regulated genes in each functional category. In LA, there were almost equal numbers of genes up- and down-regulated at 24-hour VTP (45% down, 55% up) and in 2-week VTP (50% down, 50% up). In contrast, most of the significant LV changes consisted of down-regulation at 24-hour VTP (88% down, 12% up), a predominance that remained but was less striking at 2 weeks (68% down, 32% up). Substantial changes were seen for all gene groups in LA, but particularly large numbers of changes were seen in DNA/RNA synthesis and degradation, metabolism, protein synthesis and degradation, and signal transduction.

Although the numbers of genes changed were much greater in LA than LV, the relative numbers of up- versus down-regulated genes were often similar for both. For example, at 2-week VTP gene categories with more up- than down-regulated genes in LA included cell cycle and growth (96 up/63 down), immunity (121 up/26 down), and cell structure and mobility (97 up/62 down). Corresponding results for LV were 3 up/1 down, 1 up/0 down, and 4 up/2 down. For ECM genes, 124 were upregulated and 29 down in LA after 2-week VTP, compared to 1 gene each up- and down-regulated in LV. Other gene-classes showed more downregulated than upregulated genes after 2-week VTP, once again with parallel patterns in LA and LV: metabolism-related genes (LA: 175 up/306 down, LV: 4 up/31 down) and DNA and RNA synthesis (LA: 117 up/241 down, LV: 2 up/5 down). Finally, some gene-categories showed similar numbers of up- and down-regulated genes, e.g. signal-transduction genes, with LA: 215 up-regulated and 205 down-regulated after 2-week VTP, LV: 8 up/8 down. For most gene-groups, the relative portion of up- versus down-regulated genes was qualitatively similar for 24-hour and 2-week VTP. A notable exception was protein synthesis and degradation, for

which about twice as many LA genes were up- versus down-regulated at 24 hours (190 versus 97 respectively), whereas the ratio was inverted at 2 weeks (126 up/201 down).

Large LA-LV differences were observed in relation to ECM-gene expression. Many important ECM-genes showed large statistically-significant changes in LA without statistically-significant changes in LV. For example, 16 probe-sets corresponding to 12 transcripts encoding collagen-related genes were significantly increased in the LA at 2-week VTP. Particularly impressive differences occurred in collagen-1/alpha-1 (~65-fold increase versus sham in LA), collagen-3/alpha-1 precursor (~20-fold increase versus sham), and collagen-1/alpha-2, collagen-5/alpha-1 and collagen-12/alpha-2 (all increased ~10-fold). The large LA-LV differences in these collagen genes and the fact that most of the collagen-gene expression increases were significant in LA at 2-week but not 24-hour VTP agrees well with the time-course and magnitude of fibrosis in the 2 chambers [5]. Additional differential ECM-gene changes of interest included those in fibronectin (significant, ~11- and 17-fold increases in LA at 24-hour and 2-week VTP respectively), elastin (~10-fold at 2-weeks), fibrillin-1 (~2.5 and ~8-fold at 24-hour and 2-week VTP), TIMP-1 (~6-fold increased at 24-hour and 2-week VTP) and TIMP-3 (50%-decreased at 24-hour VTP).

Although relatively few genes were significantly altered in LV, some interesting patterns emerged. The most affected categories were signal transduction, protein synthesis and degradation, and in particular, metabolism. A number of respiratory-chain complex genes were down-regulated at 2-week VTP in LV, including NADH dehydrogenase Fe-S protein 8 (35% decrease versus sham), succinate dehydrogenase (25% decrease), and ubiquinol-cytochrome oxidoreductase (25% decrease). Other metabolism-related genes that were significantly and prominently decreased at 2-week VTP in LV included glutathione-transferase (~60% decrease),

NADH-ubiquinone oxidoreductase 30-kDa subunit (~30%), succinate-dehydrogenase precursor (~20%), and succinate-CoA ligase (~25%). Interestingly, creatine-kinase was significantly up-regulated >8-fold in LV at 2-week VTP, versus ~5-fold in LA at the same time point. Two genes encoding proteins involved in Ca^{2+} -related arrhythmogenesis were significantly up-regulated in LV at 2-week VTP: calmodulin (types 1 and 3 increased ~40 and 90% respectively) and FKBP12 (increased ~70%).

Evolution of LA-LV Expression Profile Differences

Figure 3 compares the mean value of mRNA expression levels for all transcripts in LA versus LV, based on paired samples obtained from each dog at each time point. Blue points indicate non-significant changes in LA versus LV while values in red are significantly-different ($q\text{-value} < 1$). In the sham group, 1567 genes were differently-expressed in LA versus LV, while 1499 were differential at 24-hour VTP and 897 at 2-week VTP. Detailed results are presented in Online Table 3. In the sham group, almost as many genes showed lower-level expression as higher-level in LA versus LV (53% versus 47%). At 24-hour VTP, fewer genes showed lower-level expression in LA (44% lower and 56% higher) and this difference increased further at 2-week VTP (33% lower-level and 66% higher-level in LA than LV). Thus, although the number of LA-LV gene expression differences decreased with VTP, their pattern changed, with an increasing proportion becoming attributable to genes upregulated in LA.

The temporal evolution of LA-LV differentially expressed gene groups is illustrated in Figure 4. For a number of gene-groups differently expressed in LA versus LV, differences tended to increase after 24-hour VTP and then to decrease after 2 weeks: e.g. DNA and RNA synthesis (430 differential genes in shams, 444 at 24-hour VTP, 311 at 2-week VTP);

metabolism (sham: 458; 24-hour VTP: 487; 2-week VTP: 395); protein synthesis and degradation (sham: 414; 24-hour VTP: 443; 2-week VTP: 315); signal transduction (sham: 425; 24-hour VTP: 482; 2-week VTP: 387); transport (sham: 227; 24-hour VTP: 273; 2-week VTP: 210). For most gene categories, these changes were equally distributed between increased and decreased expression-level in LA compared to LV for each time point. Immunity-related genes showed a somewhat different pattern (sham: 103; 24-hour VTP: 127; 2-week VTP: 124), with differential genes remaining increased at 2-week VTP.

Real-Time PCR Results

Quantitative real-time PCR was performed on 18 genes for each group of dogs. Genes believed to be of pathological importance were selected to represent over-expressed, under-expressed or nonsignificantly-changed genes. Figure 5 compares gene-expression levels by real-time RT-PCR with microarray results, which showed a good correlation ($R^2=0.90$). Detailed results are presented in Table 2. Of the 76 values obtained by real-time RT-PCR, 76% (57) showed concordant statistical significance or non-significance with microarray analysis. Over 97% (74) of the sample-sets showed changes in the same direction with both methods. Thus, there was good agreement overall.

Western-Blot Results

Western-blot analysis was performed on 8 selected proteins. Figure 6 presents representative blots. Table 3 compares the mean results of Western-blot analysis to corresponding microarray findings. Statistical congruence (significant changes in the same direction for both protein and mRNA or no significant change in either) was seen for 23/32 (72%) of data sets. Of the

remaining 9 cases of statistical non-convergence (significant for one but nonsignificant for the other), the values for 6 of them were of the order of $\pm 25\%$ of each other. Although there was good overall and qualitative agreement between mRNA-expression and protein-expression changes, some quantitative differences existed, particularly for secreted proteins (e.g. IL1-Ra and collagen-3 alpha-1 chain show larger mRNA than protein changes).

Pathway Analysis

Pathway analysis revealed VTP-induced changes for important numbers of genes in 3 signalling pathways, involving mitogen-activated protein kinases (MAPKs), apoptotic signalling, and the ubiquitin-proteasome system. Consistent with the very limited number of ventricular genes affected by VTP, all the signalling pathways highlighted pertained to atrial-gene signalling. In addition, 3 metabolic pathways were highlighted, including respiratory-chain enzymes, the Krebs cycle, and glycolysis. Of note, two of these (Krebs cycle and electron-chain transfer) involved significant changes at the ventricular level.

Previous work suggests a significant role for the MAPKs ERK, p38 and JNK in CHF-related atrial remodeling [5, 13, 17]. LA changes in MAPK-signaling genes highlighted by pathway analysis are shown in On-line Figure 1. VTP-induced up-regulation was evident for key signalling enzymes such as MAPK1 (encoding ERK2), MAPK14 (p38 α) and MAPK11 (p38 β). Interestingly, previous work [17] showed that significant changes in atrial p38-protein expression occur within 24 hours while ERK changes more slowly (reaching statistical significance at 1-week VTP), in keeping with our observation of significant atrial p38-encoding mRNA upregulation at 24 hours and ERK-encoding changes occurring only at 2 weeks in the present study. Upstream activators of MAPK signalling are upregulated in the LA early in VTP-

remodeling, notably including the small G-protein signalling elements RAC1 (showing a 3.7-fold increase at 24-hour VTP) and the RAS-related genes SHC1 and HRAS.

Another gene-pathway that showed interesting changes was apoptotic signaling. Previous studies indicated that atrial apoptotic markers rise strikingly within 24 hours of VTP-onset and decrease thereafter [5, 11]. The changes in apoptosis-regulating systems that we observed are shown in On-line Figure 2. The BCL2L1 gene, encoding an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, was up-regulated in LA after two weeks of tachypacing. Caspase-4, implicated in the response to endoplasmic reticulum stress [18], and calpain 2, but not calpain 1, were also upregulated after 24 hours of VTP. In contrast, the death-associated protein-encoding gene DAXX [19] is strongly downregulated after 24-hour VTP, pointing to the activation of counter-regulatory measures to limit apoptosis.

In addition to transcript changes encoding apoptotic proteins *per se*, we noted important alterations in the ubiquitin-proteasome system (On-line Figure 3), which regulates apoptosis [20, 21]. The most prominent changes occurred in the LA after 24-hour VTP, with fewer alterations at 2 weeks and no statistically-significant changes in the LV. At 24-hour VTP, 6 LA genes in the E2-ubiquitin conjugating enzyme system were altered (5/6 upregulated) and 3 genes in the E3-ligase system. Both 19S and 20S proteasome components of the 26S proteasome complex showed significant alterations. Two genes encoding lid subunits and 6 encoding base subunits of the 19S proteasome were upregulated in LA at 24-hour VTP, and 7 genes in the 20S proteasome were upregulated.

In contrast to the other pathways that we assessed, which showed virtually no significant LV changes, there were significant alterations in metabolic systems, principally in the Krebs cycle (On-line Figure 4) and electron-chain transport (On-line Figure 5). ACO2 encodes

aconitase, which catalyzes the transformation of citrate into isocitrate in the Krebs cycle and SUCLG1 encodes succinate-CoA ligase: both were significantly downregulated in LV tissue after 24-hour and 2-week VTP, whereas fumarate hydratase was downregulated in LA. Many genes encoding electron-chain transport enzymes were altered (primarily downregulated) by VTP, with all 5 complexes affected in LA tissue but only complexes I and II affected in LV, with 7 and 2 genes significantly downregulated respectively. In contrast to the Krebs cycle and complexes I and II of electron-chain transport, which were significantly altered in LV, genes encoding glycolytic enzymes were affected only in LA (On-line Figure 6). Sixteen genes were affected by VTP in the LA, with similar numbers altered at 24 hours and 2 weeks of VTP.

Discussion

In this study, we compared mRNA-expression changes in LA and LV over two weeks of VTP-induced CHF in the dog. The results show striking discrepancies in the atrial versus ventricular response, time-dependant evolution of expression-changes and alterations in chamber-selective gene-expression profiles.

LA-LV Gene-Expression Differences With and Without HF

A variety of investigators have noted substantial gene-expression differences between atrial and ventricular tissues of mouse [22], dog [23] and human hearts [12, 24, 25]. A particularly detailed analysis was reported by Barth et al. [24]. They used a commercially-available microarray directed towards 11,740 transcripts to compare gene-expression between 17 right-atrial (RA) appendages from patients undergoing open-heart surgery with LV transmural tissue-slices from 5 non-failing donor hearts. At a false-discovery rate of <0.03, they found differences in 6,274

transcripts (53% of probe-sets available), with 3,300 being more strongly-expressed in atrium and 2,974 in ventricle. They noted stronger expression of genes related to metabolism in LV and a predominance of genes involved in signal transduction and apoptosis in atrium, findings similar to ours. The overall number of atrial-ventricular differences that they observed is slightly more than what we noted here with a somewhat stricter statistical-significance cut-off and the balance between atrial-predominant and ventricular-predominant genes is similar.

We are not aware of previous studies that analyzed the evolution of atrial-ventricular gene-expression differences with the development of CHF. Barth et al noted that in atria of AF patients upregulation occurred predominantly in “ventricular-predominant” genes and down-regulation in “atrial-predominant” genes, producing a “ventricularization” of the atrial gene-expression profile [12]. We noted a similar type of phenomenon, with the number of statistically-significant LA-LV gene-expression differences decreasing with the advent of CHF (Figure 3). A total of 1273 of the 1599 genes with significantly-differential LA-LV expression in shams were no longer significantly different at 2-wk VTP, presumably mostly because of LA expression changes (since few statistically-significant changes occurred in LV). On the other hand, 1086 genes that were LA-LV equivalent in shams showed significant LA-LV differences at 24-hour VTP and 576 at 2-week VTP. Thus, it seems that CHF greatly reduces the LA-LV gene-expression differences that are present in the normal heart, only to replace them by a range of chamber-selective pathological responses.

Gene-Expression Changes in CHF and Differential Atrial-Ventricular Response

CHF causes deterioration in cardiac function and significant reprogramming of cardiac gene-expression. Barrans et al. found over 100 of 10,848 expressed sequence-sequence tags to be

changed >1.5-fold in LVs of patients with end-stage cardiomyopathy [26]. Relatively few studies have compared atrial versus ventricular gene-expression changes in CHF. Kääb et al. studied human atrial and ventricular gene-expression response differences by comparing 8 terminally-failing ischemic and dilated cardiomyopathic hearts with 5 non-failing donor hearts via microarray-analysis [4]. They found about twice as many significantly-changed genes at the atrial level, and noted a predominance of down-regulated genes (103) compared to upregulated (13) in the ventricles. We similarly found a predominance of gene downregulation in the LV (Figure 2B), and although there was a much greater quantitative discrepancy we also noted a stronger gene-response to CHF in the atrium versus ventricle. Kääb et al. noted that only ~7% of significantly-changed genes were common to both atria and ventricles, a figure of a similar order to what we observed (~2%).

We were unable to identify studies comparing directly atrial with ventricular gene-expression profile changes in animal CHF models. Gao et al. used human gene microarrays to compare ventricular gene-expression between 4 normal dogs and 4 dogs with terminal CHF caused by 4-wk VTP [6] (atrial gene-expression was not assessed). They noted a large number of statistically-significant ventricular gene-expression changes in CHF, over 1000, once again with about 20 times as many genes (971) down- as up- (49) regulated. Like us, they found down-regulation of metabolic pathways and transport genes. The discrepancy in the number of statistically-significant ventricular gene-expression changes between their study and ours is likely due to the fact that they studied dogs with terminal CHF after 4-wk VTP (LVEDP~30), whereas our dogs had less severe cardiac decompensation with a maximum of 2-wk VTP.

The differential atrial-ventricular gene-expression response to VTP-induced CHF that we noted in the present study is coherent with markedly different atrial versus ventricular tissue

responses that we detailed with the same dog model in a previous report [5]. In that study, the LA showed much stronger changes in terms of leukocyte-infiltrative inflammatory response, total and apoptotic cell-death rate and tissue fibrosis than LV. There was also a differential evolution of histological changes. Acute responses (white-cell infiltration and cell death) peaked in the LA at 24 hours and then returned to baseline over 5 weeks, in contrast to fibrosis which increased progressively over 5 weeks. In the LV, white-cell infiltration and cell death were less intense than in LA (5-10 fold) but were less transient, remaining at about the same level or increasing from 24-hour to 5-week VTP.

Extracellular Matrix Remodeling

Extracellular matrix (ECM) remodeling is of particular importance in creating the AF substrate in CHF [2, 3, 5, 7-10]. ECM-related genes showed dramatically-different remodeling in LA versus LV. About 150 LA ECM-transcripts were significantly altered at 2-wk VTP, compared to 2 at the LV level. Some notable examples include highly-significant ~20 and ~65-fold increases in LA collagen-3 and collagen-1 genes respectively, versus statistically non-significant 4.5 and 7.9-fold increases in the LV. LA fibronectin gene-expression increased significantly by ~12 and ~18-fold at 24-hour and 2-week VTP, while LV fibronectin averaged ~1.5 and ~2.7 times sham values at 24-hour and 2-week VTP (P=NS for both). Tissue-inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) was ~6-fold increased in LA at 24-hour but not 2-week VTP, whereas matrix metalloproteinase-9 (MMP9) was increased ~6-fold at 2-week but not 24-hour VTP; neither were significantly altered in LV. These important ECM-gene expression differences parallel and account for the much greater fibrotic response previously observed in LA versus LV tissue in this model [5].

Metabolism

The failing myocardium is characterized by an important reduction in high-energy phosphate and phosphotransferase enzymes such as creatine kinase. The single largest group of LV gene-changes occurred in genes involved in metabolism. Although most metabolism-related genes were down-regulated, the creatine-kinase B (CK-B) gene showed striking 8-fold up-regulation at 2-wk VTP. The creatine kinase isoenzyme CK-B is involved in the formation of the active forms CK-BB and CK-MB. Previous studies have shown that the activity of the CK-MM isoform is decreased by ~30%, but the activity of the CK-MB isoform is at least two-fold higher in the failing heart, correlating with a 5-fold increase in CK-B isoenzyme in the ventricles [27, 28].

Gao et al noted down-regulation of ventricular genes involved in energy production in end-stage VTP-induced CHF [6]. We also observed marked decreases in components of the respiratory chain complex. NADH dehydrogenase Fe-S proteins 3 and 8 (CI), succinate dehydrogenase complex (CII) and ubiquinol-cytochrome C oxydoreductase (CIII) all showed reduced expression at 2-wk VTP in both LA and LV. NADH and succinate dehydrogenase produce reduction reactions that create a H^+ -electrochemical gradient toward the inner mitochondrial membrane. These H^+ -ions are driven back into the mitochondrial matrix via ATP-synthase and allow the production of ATP. Respiratory-chain systems also play an important role in regulating oxidative stress and thereby apoptosis, which is of great importance in CHF progression [29, 30].

Ca²⁺-Signaling

Remodeling of Ca²⁺-handling is emerging as an important pathophysiological paradigm in atrial and ventricular arrhythmogenesis related to heart disease [31]. Key components include the Ca²⁺-calmodulin-dependent protein-kinase-II (CaMKII) and ryanodine receptor-FKBP12/12.6 systems [31-33]. Of the relatively small number of LV genes up-regulated at 2-week VTP, FKBP12 and calmodulin are prominent. FKBP12 was also increased in LA at 24-hour and 2-week VTP.

Pathway analyses

A number of signalling and metabolic pathways were significantly altered by VTP. In keeping with evidence for an important role of MAPK signalling at the protein level [5, 13, 17], many mRNA species encoding components of the MAPK system were affected and most of them were upregulated (On-line Figure 1). Interestingly, transcripts encoding the small G-protein Rac1 were the most strongly upregulated, increased ~3.7-fold at 24 hours and 1.9-fold at 2 weeks. There is evidence for an important role of Rac1 in the pathophysiology of AF [34, 35], and since Rac1 is an important target of statin action, its alteration may account for the beneficial effects of statins in CHF-associated atrial structural remodeling [35, 36].

Apoptosis appears to play an important role in CHF-associated AF [5, 13, 37], and pathways related to apoptosis, both directly (On-line Figure 2) and via the ubiquitin-proteasome system (On-line Figure 3) were significantly affected. Elements of both systems involved in endoplasmic reticulum stress responses were altered, consistent with evidence for an important role of oxidant stress in CHF [30] and AF [31]. The extensive LA changes observed at multiple levels in the ubiquitin-proteasome system are consistent with a hypothesized role of the system

in CHF [20], and with evidence for hyperubiquitinated proteins in terminally-failing human hearts [38].

Genomic analysis at the ventricular level was striking for the relative paucity of changes observed, with the notable exception of specific metabolic pathways. These observations are in keeping with the prominent role of metabolic changes in the pathophysiology of CHF [39]. It must also be noted that metabolic derangements related to high LV metabolic demands at a heart rate of 240 bpm are likely to be central to the development of CHF in the VTP model. The downregulation of genes encoding enzymes in the first part of the Krebs cycle may favour the use of 2-ketoglutarate derived from glutamate in energy metabolism. Downregulation of mitochondrial electron-chain enzyme genes linked to complex II may be a response to minimize free radical formation by reverse electron flow.

Potential Significance

The present study is, to our knowledge, the first systematic assessment of atrial versus ventricular mRNA-expression remodeling differences in an animal CHF model. In addition, we made comparisons over time that allowed us to identify the dynamic development of gene-expression changes. Our findings show a striking difference between the LA and LV response, which sheds light on previously-noted differences between the atrial and ventricular neurohumoral responses, apoptosis, inflammation, cell-death and fibrosis in the same model [5]: the LA changes peaked much earlier and were up to 10-fold greater in magnitude compared to LV [5]. Taken together with the results of previous work, our findings suggest that the rapidly-developing CHF associated with tachycardiomyopathy places a particularly great burden on the atria. The differential gene-response must reflect strongly-induced programs of atrial adaptation

to a very major stress. Further work designed to clarify the atrial-remodeling programs may help in the development of novel approaches to preventing atrial arrhythmogenic substrate development, an important evolving theme in AF therapeutics [40]. The relatively limited number of LV gene-expression changes likely reflects a greater capacity of the ventricles to cope with a tachycardic stress and is consistent with previous observations of dramatic ventricular recovery upon termination of tachypacing. Interestingly, although hemodynamic function and ventricular dimensions recover completely following the cessation of VTP, atrial structural remodeling remains, as does a persistent substrate that can sustain AF [8, 9].

Potential Limitations

The time-points we examined were selected based on previous evidence for important early-phase changes at 24 hours and near steady-state late-phase changes at 2 weeks of VTP-induced remodeling, particularly at the atrial level [5, 13]. However, other time-points would be interesting to study, particularly as ventricular function deteriorates rapidly towards terminal CHF. The model that we used (VTP) is widely-employed and mimics well some forms of clinical CHF [41]; however, observations of LA versus LV remodeling in other clinically-relevant experimental paradigms might provide different results and would be of great interest. With the model that we used, CHF develops within 2 weeks and becomes terminal in 4-5 weeks. This time-course is much faster than that of many clinical forms of CHF, which often evolve over many months to years. This limitation, which also applies to most other animal models of CHF, needs to be considered in extrapolating our results to clinical contexts.

We used a statistical cut-off for VTP-induced changes in the present paper of $q < 5$, implying a false-positive rate of 5% (equivalent to a P-value of $P < 0.05$), whereas in our previous

study of atrial-cardiomyocyte genomics with CHF versus atrial-tachypacing the cut-off was a $q\text{-value} < 1$, implying a false-positive rate of 1% or $P < 0.01$ [14]. This approach explains the larger number of statistically-significant changes we noted at the atrial level in this study, and would of necessity have increased the number of false-positive detections. We were forced to use the less restrictive statistical criterion because with the stricter cut-off, there were no statistically-significant VTP-induced changes detected in the LV.

We obtained a detailed portrait of changes at the mRNA level for a wide range of genes in the LA and LV of dogs subjected to VTP for varying periods. This clearly, however, represents only a small part of a much larger picture, potentially including changes in protein production, processing and trafficking. Much more work will be needed to identify the additional elements required for a complete picture of the dynamic processes governing atrial and ventricular remodeling over time during the development of CHF.

Acknowledgments

Supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Quebec and Heart and Stroke Foundation. SC received a Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) studentship and Sabrina Le Bouter FRSQ-INSERM and HSFC fellowships. The authors thank Nathalie L'Heureux, Chantal Maltais and Chantal St-Cyr for technical help, France Thériault for secretarial support and Christine Des Rosiers, PhD, for helpful discussions regarding metabolic remodeling.

Q:\Secrétariat Central\therfr\PUBLJ Mol Cell Cardiol\Atrial_SN_ft\Atrial_SN_ft(August 2008).doc

References

- [1] Jessup M, Brozena S. Heart failure. Review. *N Engl J Med* 2003;348:2007-18.
- [2] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Cardin S, Pelletier P. Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance. *Curr Opin Cardiol* 2005;20:21-5.
- [3] Brundel BJ, Melnyk P, Rivard L, Nattel S. The pathology of atrial fibrillation in dogs. *J Vet Car* 2005;7:121-9.
- [4] Kääb S, Barth AS, Margerie D, Dugas M, Gebauer M, Zwermann L, et al. Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure. *J Mol Med* 2004;82:308-16.
- [5] Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004;63:236-44.
- [6] Gao Z, Xu H, DiSilvestre D, Halperin VL, Tunin R, Tian Y, et al. Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:76-86.
- [7] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel B, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 2005;48:9-28.
- [8] Shinagawa K, Shi Y-F, Tardif J-C, Leung T-K, Nattel S. Dynamic nature of the atrial fibrillation substrate during development and reversal of the heart failure in dogs. *Circulation* 2002;105:2672-8.
- [9] Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, et al. Dissociation between ionic remodelling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004;109:412-8.

- [10] Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999;100:87-95.
- [11] Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000;101:2631-8.
- [12] Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, et al. Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res* 2005;96:1022-9.
- [13] Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung T-K, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: Angiotensin-dependent and independent pathways. *Cardiovasc Res* 2003;60:315-25.
- [14] Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, et al. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. *Circ Res* 2007;100:425-33.
- [15] Xiao L, Zhang L, Han W, Wang Z, Nattel S. Sex-based transmural differences in cardiac repolarization and ionic-current properties in canine left ventricles. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2006;291:H570-80.
- [16] Dahlquist KD, Salomonis N, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat Genet* 2002;31:19-20.
- [17] Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001;104:2608-14.

- [18] Liao PC, Tan SK, Lieu CH, Jung HK. Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2008;104:1509-23.
- [19] Roubille F, Combes S, Leal-Sanchez J, Barrère C, Cransac F, Sportouch-Dukhan C, et al. Myocardial expression of a dominant-negative form of Daxx decreases infarct size and attenuates apoptosis in an in vivo mouse model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2007;116:2709-17.
- [20] Powell SR. The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol.)* 2006;291:H1-H19.
- [21] Patterson C, Ike C, Willis PW 4th, Stouffer GA, Willis MS. The bitter end: the ubiquitin-proteasome system and cardiac dysfunction. *Circulation* 2007;115:1456-63.
- [22] Tabibiazar R, Wagner RA, Liao A, Quertermous T. Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ Res* 2003;93:1193-201.
- [23] Zhao XS, Gallardo TD, Lin L, Schageman JJ, Shohet RV. Transcriptional mapping and genomic analysis of the cardiac atria and ventricles. *Physiol Genomics* 2002;12:53-60.
- [24] Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, et al. Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression. *Pflugers Arch* 2005;450:201-8.
- [25] Ellinghaus P, Scheubel RJ, Dobrev D, Ravens U, Holtz J, Huetter J, et al. Comparing the global mRNA expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1383-90.
- [26] Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew CC. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol* 2002;160:2035-43.

- [27] Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, et al. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 1996;94:1894-901.
- [28] Heinke MY, Wheeler CH, Yan JX, Amin V, Chang D, Einstein R, et al. Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. *Electrophoresis* 1999;20:2086-93.
- [29] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999;85:357-63.
- [30] Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res* 2001;89:198-200.
- [31] Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y-H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: Heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007;87:425-56.
- [32] Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res* 2005;97:1314-22.
- [33] Anderson ME. Calmodulin and the philosopher's stone: Changing Ca^{2+} into arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:195-7.
- [34] Adam O, Frost G, Custodis F, Sussman MA, Schäfers HJ, Böhm M, et al. Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:359-67.
- [35] Tsai CT, Lai LP, Kuo KT, Hwang JJ, Hsieh CS, Hsu KL, et al. Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and

- fibroblasts: implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation* 2008;117:344-55.
- [36] Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Burstein B, Leung TK, Mitamura H, Ogawa S, et al. Effects of simvastatin on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2007;74:75-84.
- [37] Aimé-Sempé C, Folliguet T, Rücker-Martin C, Krajewska M, Krajewska S, Heimbürger M. et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1577-86.
- [38] Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, Dunn MJ. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics* 2003;3:208-16.
- [39] Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 2004;555(Pt 1):1-13.
- [40] Camm AJ. Medical management of atrial fibrillation: state of the art. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17(Suppl 2):S2-6.
- [41] Moe GW, Armstrong P. Pacing-induced heart failure: a model to study the mechanism of disease progression and novel therapy in heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;42:591-9.

TABLE 1. Hemodynamic Changes

	Sham	24-hour VTP	2-week VTP
Pressures (mmHg)			
Systolic-arterial	136±7	109±16*	108±15*
Diastolic-arterial	90±5	68±9*	70±12*
LV End-diastolic	1±1	5±2	16±5**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ versus sham.

TABLE 2. Comparison between mRNA Expression Fold-Changes by Microarray versus Tagman Real-time RT-PCR

Gene ID	24-hour LA			2-week LA			24-hour LV			2-week LV		
	Real-Time	Gene chips	Real-Time	Real-Time	Gene chips	Real-Time	Real-Time	Gene chips	Real-Time	Real-Time	Gene chips	Gene chips
Signal transduction												
Calmodulin	1604374	1.46±0.17	0.99±0.02	1.68±0.20	1.19±0.12*	1.80±0.46	1.80±0.46	1.27±0.11	2.24±0.48	1.89±0.11*		
Apoptosis												
p53	1582452	1.83±0.44	1.06±0.05	1.52±0.24	0.97±0.05	1.25±0.32	1.25±0.32	1.16±0.05	1.46±0.26	1.12±0.09		
Cathepsin S	1582636	14.02±5.36	5.71±1.65*	9.64±4.19	6.98±1.75*	0.68±0.25	0.68±0.25	0.99±0.11	0.98±0.34	1.28±0.19		
Caspase 1	1582623	10.69±4.14	2.53±0.52*	5.33±2.36	1.82±0.50	0.72±0.41	0.72±0.41	0.85±0.05	0.81±0.27	0.79±0.03		
Cell structure and mobility												
Smooth muscle gamma actin	1586210	2.39±0.44	3.39±0.52**	6.45±3.60*	5.66±2.95	1.16±0.21	1.16±0.21	1.37±0.22	1.64±0.48	1.88±0.37		
Skeletal myosin light chain 2	1583107	0.50±0.03*	0.66±0.03**	0.51±0.05*	0.66±0.04**	1.16±0.16	1.16±0.16	1.18±0.10	1.01±0.27	1.32±0.32		
Extracellular matrix												
TIMP-1	1582383	7.62±2.36	5.85±1.72*	8.91±3.57	6.53±1.84*	1.28±0.88	1.28±0.88	1.01±0.45	1.23±0.46	1.09±0.09		
MMP-2	1582764	1.33±0.31	1.07±0.18	8.17±1.38**	4.46±0.34**	1.55±0.64	1.55±0.64	1.15±0.14	2.36±1.23	2.01±0.51		
Fibronectin	1582768	20.19±7.15*	10.70±2.33**	23.67±7.68**	16.20±2.62**	1.68±0.84	1.68±0.84	1.49±0.32	2.04±0.46	2.75±0.42		
Collagen alpha 1(III) chain prec.	1591762	3.77±0.98	2.27±0.61	36.93±7.83**	20.18±1.54**	1.41±0.80	1.41±0.80	1.83±0.61	2.75±1.11	4.46±1.11		
DNA-RNA synthesis												
EF-TFII	1585822	0.64±0.07	0.65±0.09*	0.52±0.14	0.51±0.06**	1.55±0.48	1.55±0.48	0.88±0.04	1.06±0.33	0.74±0.03*		
EF-TU	1583725	1.26±0.14	1.25±0.14	0.66±0.10	0.72±0.09*	1.50±0.34	1.50±0.34	1.00±0.07	0.85±0.16	0.80±0.09		
Immunity												
Von Willebrand factor (VWF)	1582505	1.43±0.20	1.42±0.24	2.63±0.35**	2.54±0.18*	2.11±0.58	2.11±0.58	1.21±0.33	2.78±0.51	1.91±0.27		
Integrin beta-1 binding protein 2	1591346	2.41±0.32**	1.97±0.21**	1.33±0.07	1.09±0.05	0.79±0.29	0.79±0.29	0.57±0.05*	0.67±0.17	0.62±0.04*		
FLAP	1601853	12.83±4.28*	3.32±0.58**	12.37±3.47*	4.70±0.74**	1.23±0.52	1.23±0.52	1.19±0.10	1.02±0.27	2.47±0.29*		
IL1-Ra	1582494	5.80±2.36	3.42±1.15	15.24±8.58	9.94±3.36*	0.37±0.18	0.37±0.18	0.60±0.05	1.49±0.88	0.65±0.05		
Ion transport												
ERG	1582833	0.57±0.04	0.76±0.04**	0.87±0.13	1.00±0.07	1.85±0.45	1.85±0.45	1.31±0.03*	1.13±0.19	1.33±0.18		
KChIP-2	1582775	0.31±0.07**	0.36±0.06**	0.13±0.03*	0.17±0.03**	1.14±0.35	1.14±0.35	0.57±0.12	0.72±0.17	0.48±0.04		
Metabolism												
Cytochrome-c oxidase subunit VIa	1583218	2.26±0.43	1.84±0.15**	1.75±0.14**	1.64±0.04**	0.99±0.21	0.99±0.21	0.96±0.13	1.21±0.25	1.15±0.07		

* $P<0.05$. ** $P<0.01$ versus sham dogs. 24-hour LA; 2-week LA = left atrial tissue from dogs ventricular-tachypaced for 24 hours and 2 weeks respectively; 24-hour LV and 2-week LV = left ventricular tissue from dogs ventricular-tachypaced for 24 hours and 2 weeks respectively.

TIMP= Tissue inhibitor of metalloproteinase; MMP= Matrix Metalloproteinase; EF=Elongation factor; FLAP=5-lipoxygenase activating protein; IL1=interleukin-1; ERG=ether-a-go-go related gene; KChIP= K⁺-channel interacting protein.

TABLE 3. Comparison between Microarray and Western Blot Results (Fold-changes)

Protein	Gene ID	Group	Microarray	Western Blot (mean)	SEM	<i>P</i> versus CTL
Calmodulin Signal transduction	1604374	24-hr LA	0.99	1.35*	0.08	0.014
		2-wk LA	1.19	1.37	0.25	0.111
		24-hr LV	1.27	1.22	0.21	0.172
		2-wk LV	1.89*	1.65*	0.151	0.017
P53 Apoptosis	1582452	24-hr LA	1.06	0.86	0.15	0.271
		2-wk LA	0.97	0.98	0.29	0.922
		24-hr LV	1.16	0.97	0.1	0.368
		2-wk LV	1.12	1	0.13	0.488
Cathepsin L Apoptosis	1583225	24-hr LA	0.59**	0.56	0.23	0.082
		2-wk LA	1.21	0.34*	0.15	0.004
		24-hr LV	0.78	0.96	0.15	0.381
		2-wk LV	1.07	1.06	0.06	0.184
Collagen 3 α1 Extracellular matrix	1591762	24-hr LA	2.27	0.87	0.34	0.647
		2-wk LA	20.18**	1.79*	0.29	0.035
		24-hr LV	1.83	0.91	0.05	0.075
		2-wk LV	4.46	1.09	0.15	0.267
MMP-2 Extracellular matrix	1582764	24-hr LA	1.07	1.73	1.13	0.443
		2-wk LA	4.46**	6.16*	2.4	0.047
		24-hr LV	1.15	1.27	0.15	0.088
		2-wk LV	2.01	1.22	0.25	0.195
FLAP Immunity	1601853	24-hr LA	3.32**	2.16*	0.45	0.037
		2-wk LA	4.70**	4.57*	1.45	0.048
		24-hr LV	1.19	0.96	0.12	0.37
		2-wk LV	2.47*	1.38	0.18	0.063
IL1-RA Immunity	1582494	24-hr LA	3.42	1.46*	0.14	0.026
		2-wk LA	9.94*	1.50*	0.18	0.032
		24-hr LV	0.6	0.57*	0.07	0.01
		2-wk LV	0.65	0.62*	0.06	0.013
KCHIP2 Transport	1582775	24-hr LA	0.36**	0.24*	0.07	0.009
		2-wk LA	0.17**	0.12*	0.01	0
		24-hr LV	0.57	0.44*	0.08	0.007
		2-wk LV	0.48	0.35*	0.06	0.002

* Statistically significant difference; *P* versus CTL indicates *P* value for difference from control protein expression (Western blot). Microarray results, ** statistically significant $Q < 1$, * $Q < 5$. Dark grey=significant on both Genechip and Western; Light Grey=non-significant on both. 24-hr LA P; 2-wk LA = left atrial tissue from dogs ventricular-tachypaced for 24 hours and 2 weeks respectively; 24-hr LV and 2-wk LV = left ventricular tissue from dogs ventricular-tachypaced for 24 hours and 2 weeks respectively.

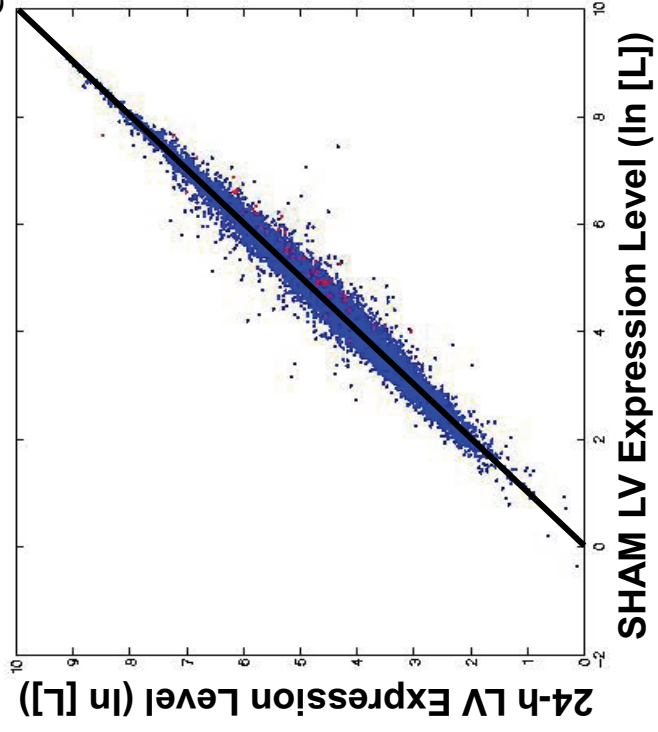
Figure legends

- Figure 1.** Overall mRNA expression-changes compared to sham at 24-hour VTP in LA (A) and LV (B), and at 2-week VTP in LA (C) and LV (D) samples. The relative probe intensity, in $\log_e(L)$, where L =mean sample luminescence, of each intervention-group gene is plotted as a function of the corresponding value for the VTP-sham group gene and represented as a single point. Red points are significantly different from sham-controls ($Q < 5$) whereas blue points are not significantly different. Without any changes in mRNA-expression, all points would fall on the black line of identity.
- Figure 2.** Total number of genes of each functional group for which mRNA expression was significantly changed. Graph shows respective number of genes down- or up-regulated by ventricular-tachycardia remodelling in atria (A) or ventricles (B). “Overlap” refers to the number of genes that were significantly affected in the same direction at both 24 hours and 2 weeks of tachypacing.
- Figure 3.** Changes in mRNA expression in LA compared to LV in shams (A), 24-hour VTP (B), and 2-week VTP (C) samples. Format as in Figure 1. The relative probe intensity, in $\log_e(L)$, where L =mean sample luminescence, of each intervention group gene is plotted as a function of the corresponding value for the VTP-sham group gene and represented as a single point. Red points are significantly different from sham-controls whereas blue points are not significantly different. Without any changes in mRNA-expression, all points would fall on the black line of identity.

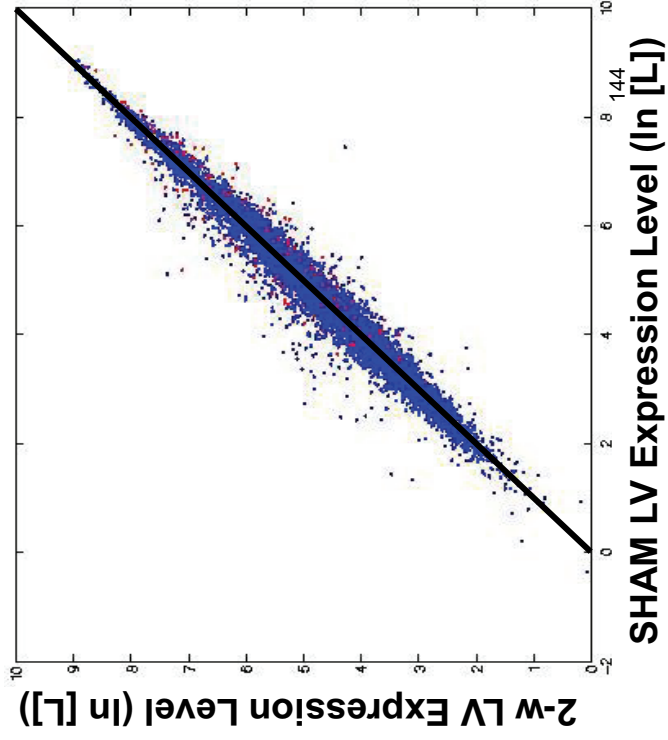
- Figure 4.** Total number of genes of each functional group for which levels were significantly different in LA versus LV in shams, 24-hour VTP or 2-week VTP.
- Figure 5.** Correlation between expression changes by real-time PCR versus microarray for each sample, for each of 18 genes. Regression lines are shown. Many points are clustered in the <5-fold change range, which is therefore shown on an expanded scale at the left.
- Figure 6.** Examples of Western blots for 8 proteins studied to compare protein versus mRNA expression changes, along with an immunoblot for the internal control (GAPDH). All gels were run with lanes in an identical order except those for MMP2, which therefore had to be cut from one original gel and pasted in the appropriate order to match the other protein samples shown. Results for all proteins other than MMP2 are taken from single original gels in intact sequence.

Figure 1

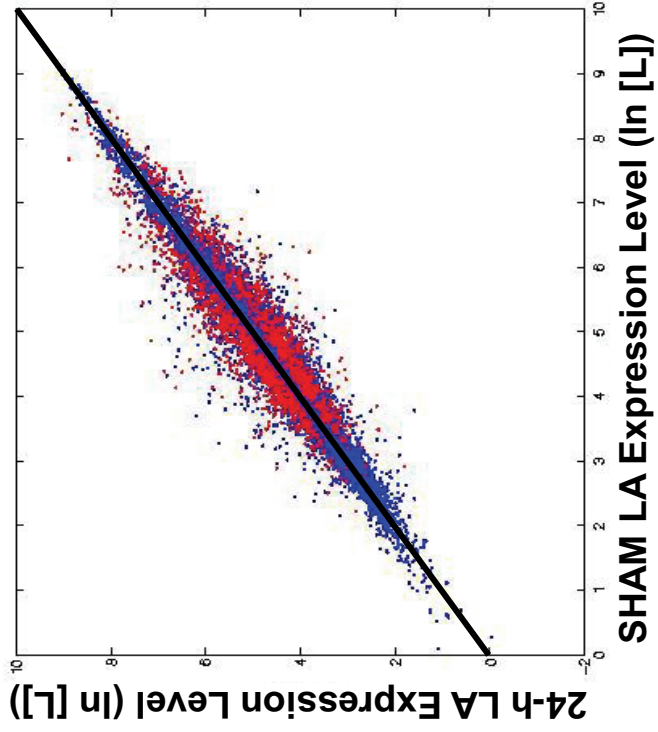
B



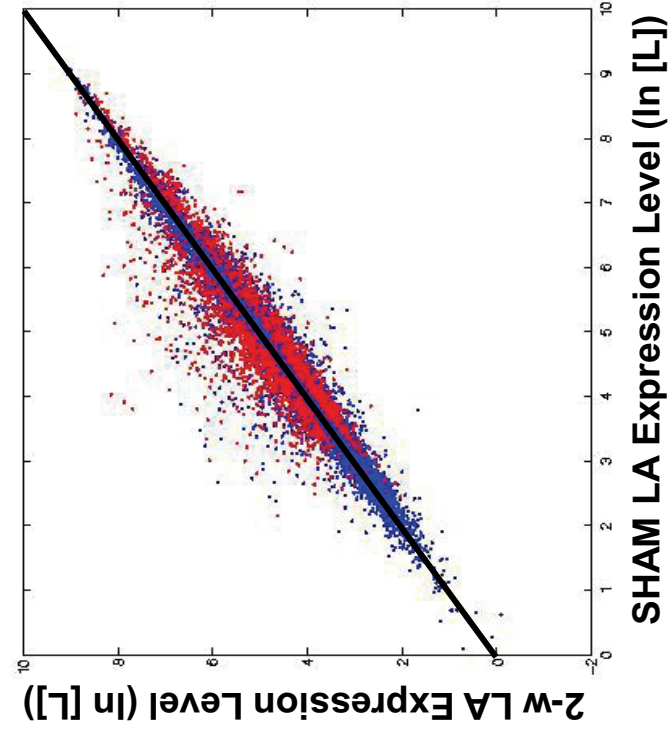
D



A



C



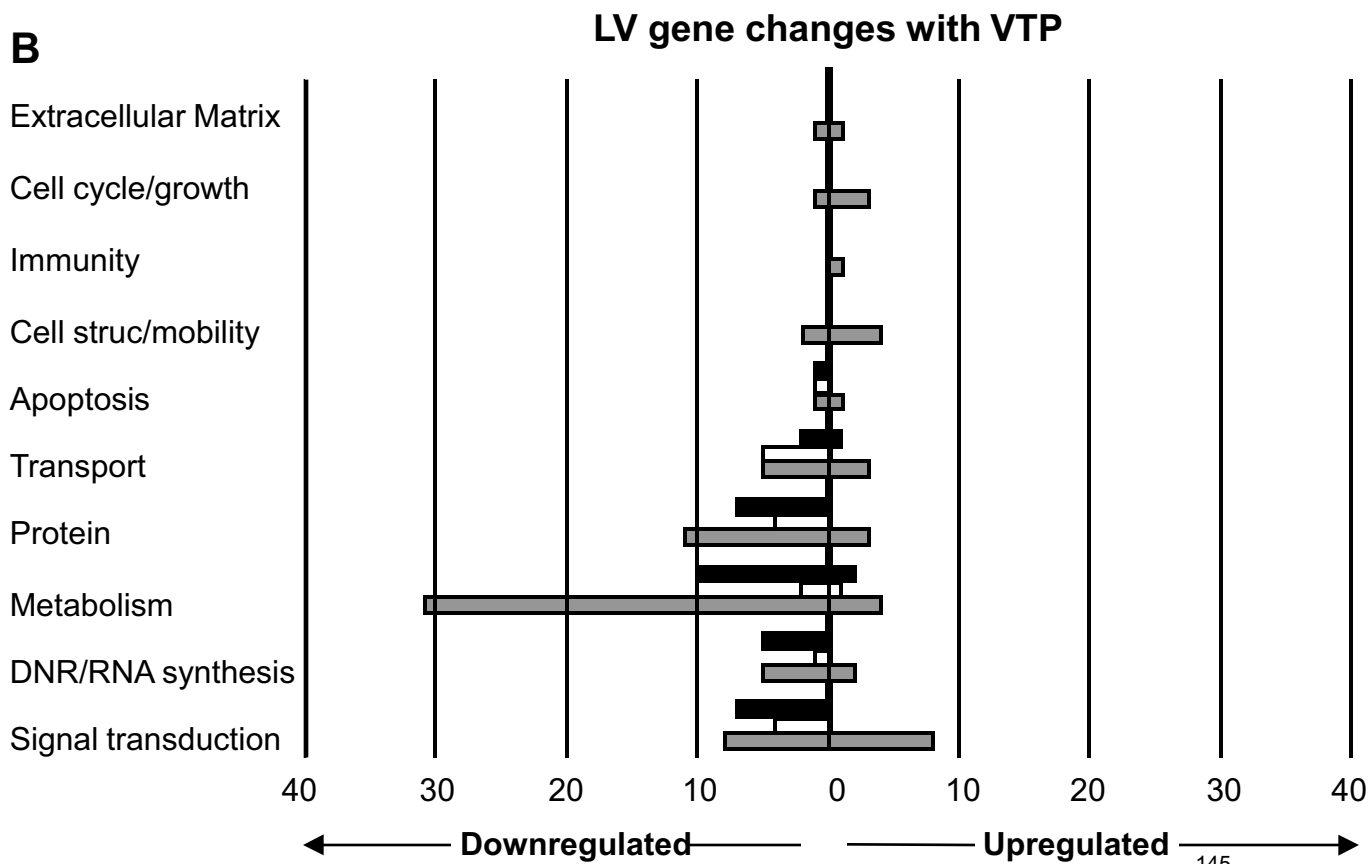
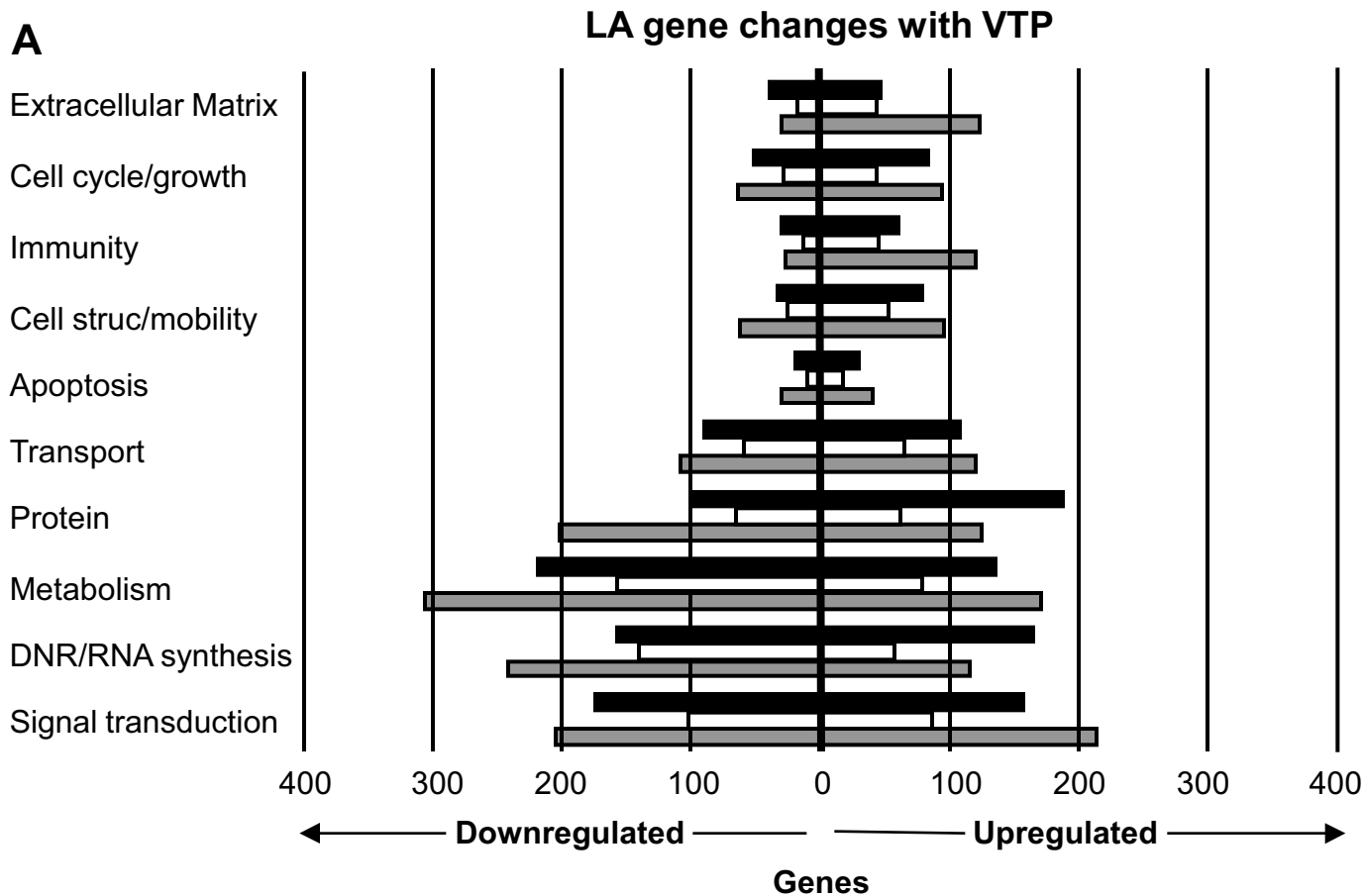


Figure 2

24-hour VTP
 2-week VTP
 Overlap

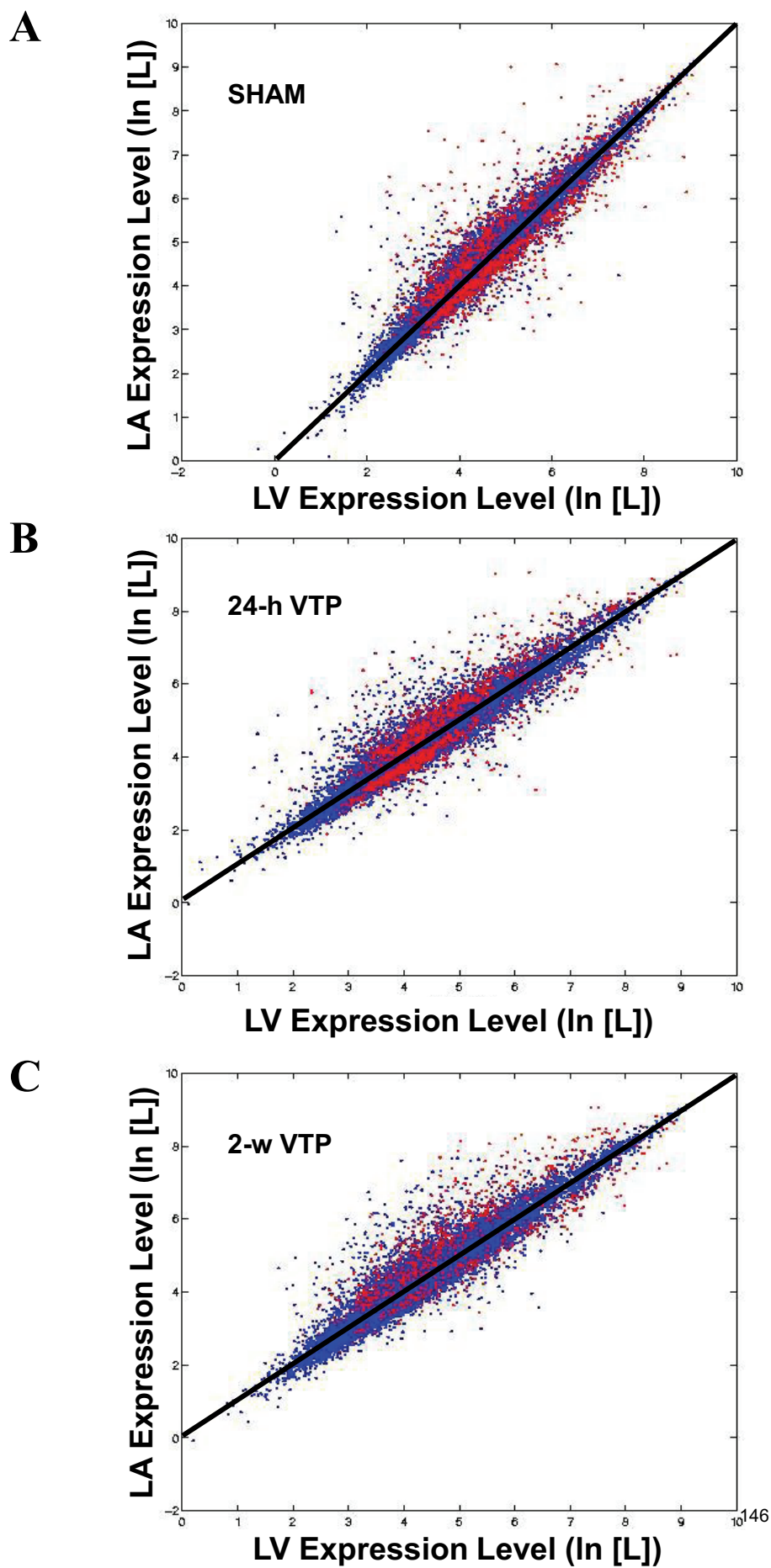


Figure 3

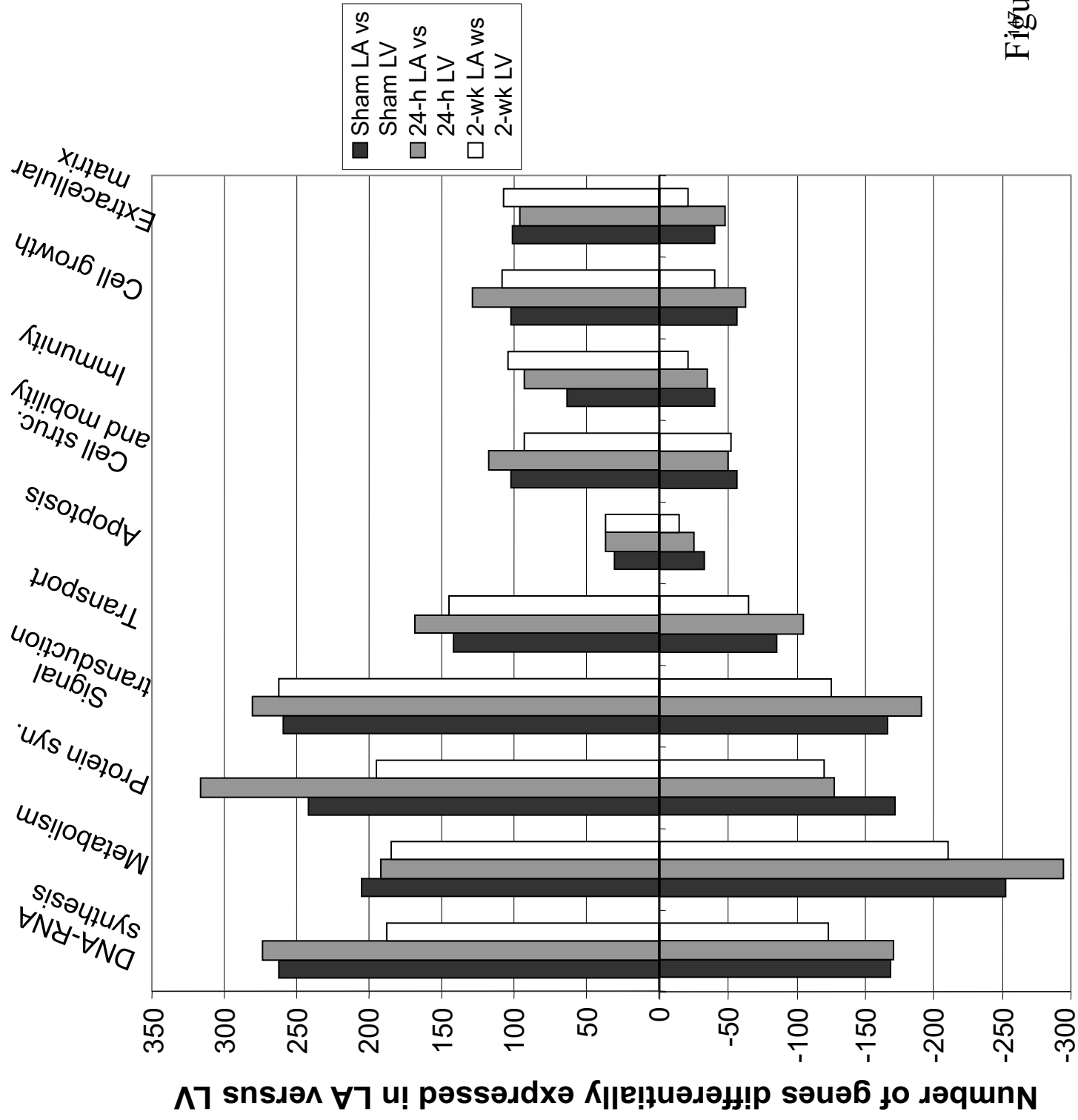


Figure 4

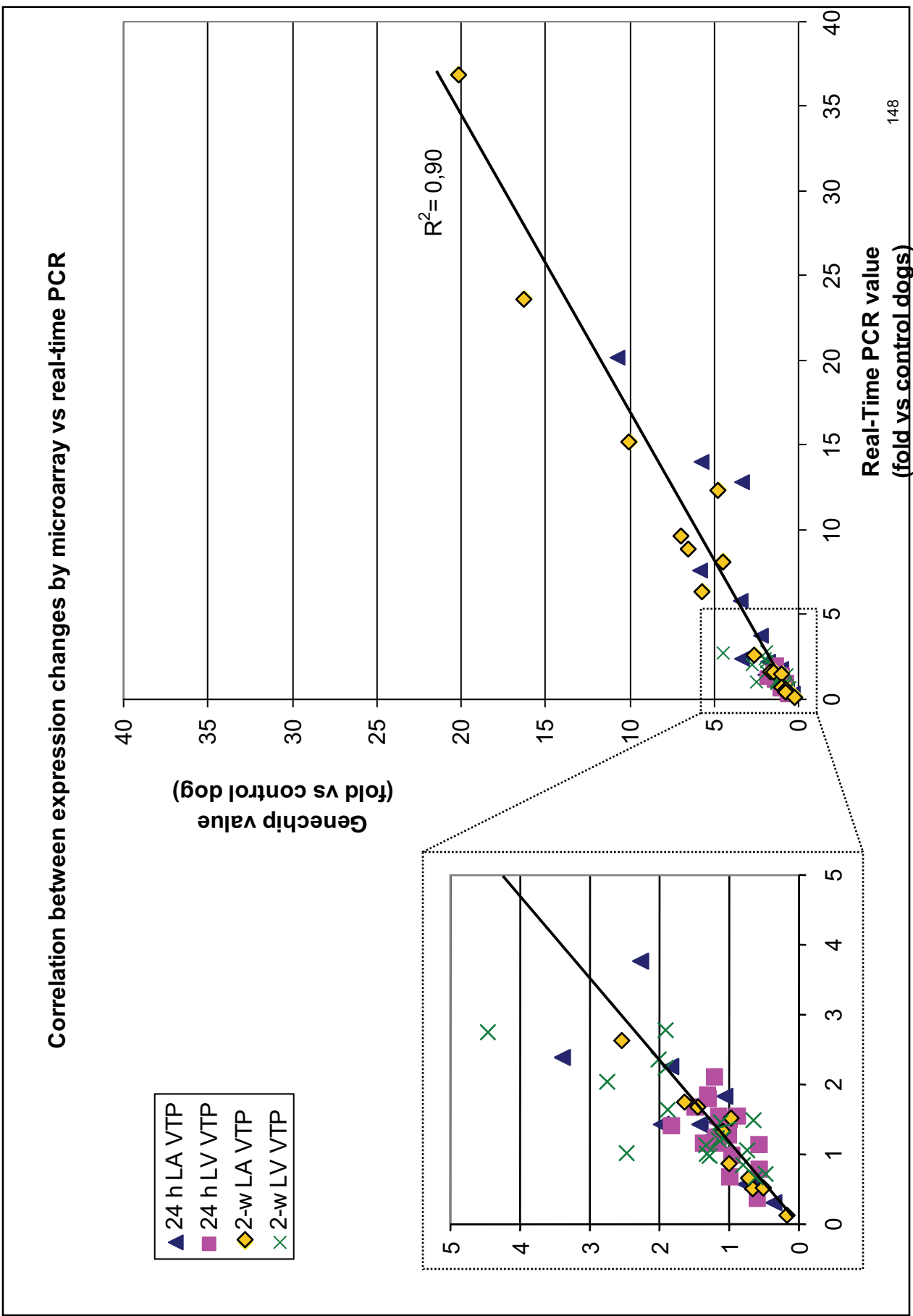


Figure 5

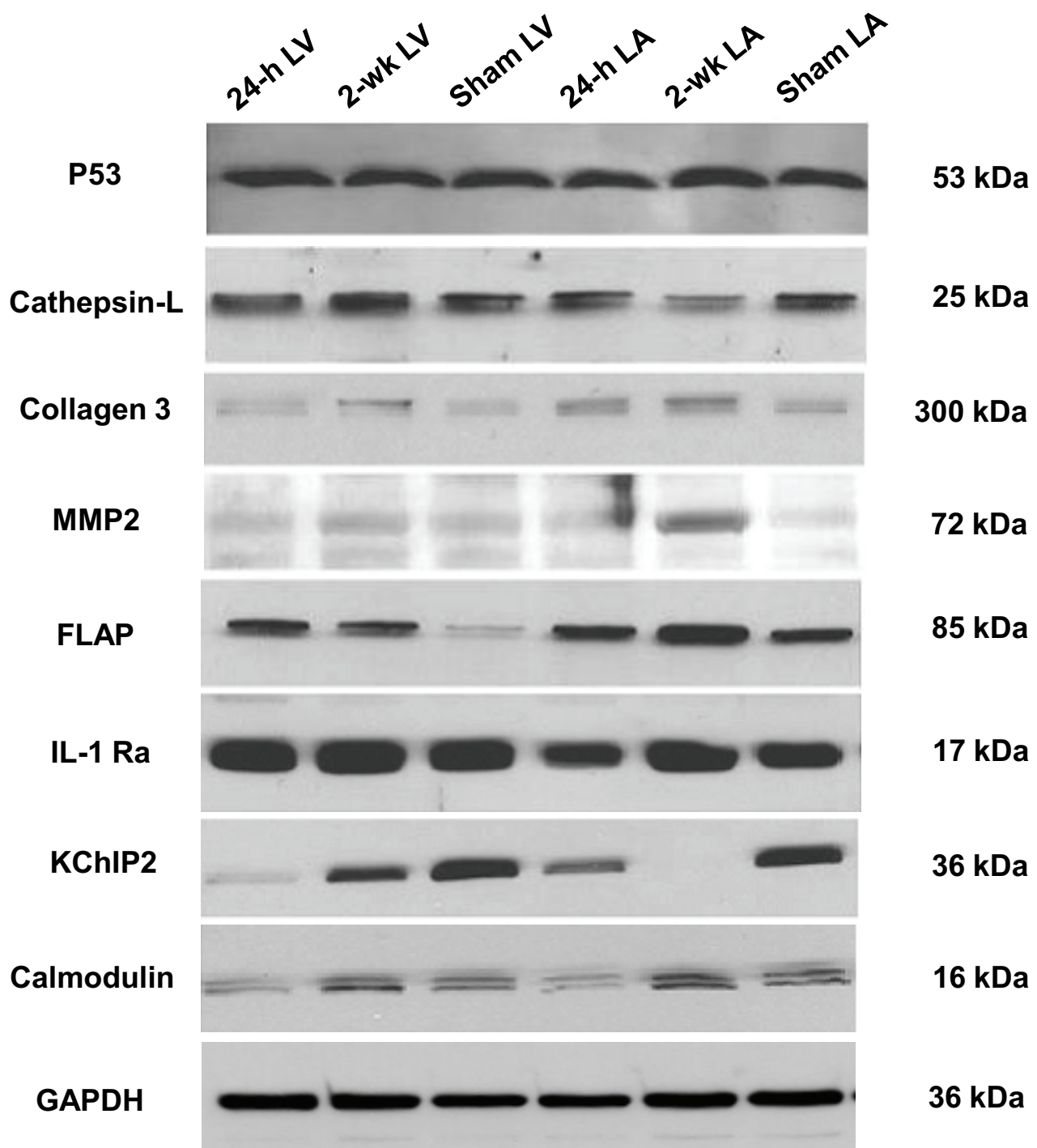


Figure 6

Chapître 5. Proteomic and metabolomic analysis of atrial profibrillatory remodeling in congestive heart failure.

Plusieurs classes fonctionnelles de gènes se sont avérées impliquées dans le remodelage auriculaire induit par tachycardie ventriculaire. Cependant, certaines voies de signalisation pourraient être régulées au niveau traductionnel plutôt qu'au niveau transcriptionnel. L'étude des changements impliqués dans le remodelage au niveau protéomique pourrait permettre de confirmer les résultats obtenus en génomique, de clarifier certaines voies de signalisation ou mettre en évidence de nouvelles voies, régulées au niveau traductionnel. De plus, nos études de génomique ont suggéré l'implication de groupes fonctionnels liés au métabolisme cellulaire. La mesure du niveau de certains métabolites, par métabolomique, permettra de clarifier l'implication de la régulation de cette fonction dans le processus de remodelage auriculaire.

Proteomic and Metabolomic Analysis of Atrial Profibrillatory Remodelling in Congestive Heart Failure

Ayesha I De Souza,^{*} Sophie Cardin,^{*} Robin Wait, Yuen-Li Chung, Meeraa
Vijayakumar, A. John Camm, Stanley Nattel

From Department of Cardiac & Vascular Sciences, St. George's University of London, UK, (A.I.D.S., M.V., A.J.C.); Department of Medicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, (S.C., S.N.); Imperial College London, UK, (R.W.); and Department of Basic Medical Sciences, St. George's University of London, UK (Y.L.C., current address: Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK).

Running Head: Proteomics and Metabolomics of AF in CHF

^{*}Contributed to an equivalent extent and share first authorship.

Correspondence to: Ayesha De Souza, Cardiac & Vascular Sciences, St George's University of London, Cranmer Terrace, Tooting, London SW17 0RE
Tel: +44-208-7253482; Fax: +44-208-7252812; E-mail: adesouza@sgul.ac.uk

Abstract

Congestive heart failure (CHF) leads to atrial structural remodeling and increased susceptibility to atrial fibrillation. The underlying molecular mechanisms are poorly understood. We applied high-throughput proteomic and metabolomic analysis to left-atrial cardiomyocytes and tissues obtained from sham and ventricular-tachypaced (VTP, 240 bpm×24 hours and ×2 weeks) CHF dogs. Protein extracts were subjected to two-dimensional gel electrophoresis using differential in-gel electrophoresis technology. Differentially-expressed ($P<0.05$) proteins were identified by tandem mass-spectrometry. Cardiac metabolites were assayed with high-resolution NMR spectroscopy. Extensive changes were seen in structural proteins, particularly at 2-week VTP, with desmin and filamin fragmentation indicating structural damage. Oxidant stress was evidenced by decreased antioxidant proteins (superoxide dismutase and peroxiredoxin) at 2-week VTP. Extensive changes in cardioprotective heat shock proteins (HSPs) occurred, with several proteins increasing rapidly (HSP27, HSP60 and HSP70) and others showing a delayed rise (GRP78, α -B-crystallin, and HSP90). An evolving adaptive response to metabolic stress was suggested by early upregulation of malate dehydrogenase (DH), α -/ β -enolase and pyruvate dehydrogenase (α -subunit of E1 component) and delayed downregulation of a host of enzymes, along with extensive metabolomic changes indicating impaired glycolysis and energy utilization at 2-week VTP. Early changes in protein expression that persisted as CHF developed included downregulation of the contractile protein myosin light chain 2, which may contribute to contractile remodeling, and the metabolic enzyme ubiquinol cytochrome C reductase. VTP-induced CHF causes time-dependent changes in the atrial proteome and metabolome that provide insights into molecular mechanisms underlying arrhythmogenic atrial remodeling.

Key Words: atrial fibrillation; congestive heart failure; proteomics; metabolomics; remodeling

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained arrhythmia encountered in clinical practice, eventually occurring in ~25% of individuals [1, 2]. A 2.5-3.0-fold increase in AF-incidence is projected over the next 50 years [3], with aging increasing both the prevalence and economic impact of AF progressively [4]. Effective prevention is crucial for the control of AF-related morbidity and mortality, but current pharmacological treatments are limited by inadequate efficacy and proarrhythmic risk. New insights into underlying mechanisms are needed for the identification of novel therapeutic targets.

Clinically-relevant animal models have advanced our understanding of this complex problem [5-7]. Ventricular-tachypacing (VTP)-induced congestive heart failure (CHF) produces a fibrotic AF-substrate that relates to persistent AF-substrates in man, whereas atrial-tachycardia models relate to AF-promoting functional changes that make AF harder to control over time (“AF begets AF”) [5, 8]. The aim of this study was to use a global proteomic and metabolomic approach to decipher molecular mechanisms that contribute to the development of CHF-induced AF. Two time points for remodeling were examined: early after the onset of tachypacing (24 hours) and at a time of near steady-state remodeling (2 weeks).

Materials and Methods

Animal Model

Animal handling followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and was approved by the Animal Care committee of the Montreal Heart Institute. Initial studies to analyze proteomics were performed in mongrel dogs weighing 25-32 kg subjected to VTP for 24-hour (n=5) or 2-week periods (n=8). Sham-operated animals (instrumented but not paced)

were used as controls (n=4 and 9 for 24-hour and 2-week groups respectively). Surgical procedures were performed as described previously [6]. A unipolar ventricular-pacing lead was inserted in the right-ventricular apex via the right jugular vein under 1.5%-isoflurane anaesthesia. The lead was attached to a pacemaker implanted in the neck and programmed at 240 bpm.

Electrophysiological Measurements

At the end of the pacing period, dogs were anesthetized (morphine 2 mg/kg s.c.; α -chloralose, 120 mg/kg i.v. load; 29.25 mg/kg/hr maintenance) and ventilated. Femoral veins and arteries were cannulated and body temperature maintained at 37°C with a heating pad. A fluid-filled catheter was connected to a femoral artery or directly inserted into ventricular cavities with a 21-gauge needle to obtain systemic and intra-ventricular pressures, respectively. A median sternotomy was performed and Teflon-coated stainless-steel electrodes were hooked into left and right atrial appendages. Atrial effective refractory periods (ERPs) were measured at different basic cycle lengths (360, 300, 250, 200, 150 ms) by the extrastimulus technique [6]. AF was induced multiple times with burst pacing (8-10 Hz, 5-10 s) to measure mean AF duration in each dog.

Cardiomyocyte Isolation

Following electrophysiological measurements, animals were euthanized, hearts removed and placed in Tyrode solution equilibrated with 100% O₂ for dissection. The left atrium (LA) was coronary-artery perfused and cell-isolation performed as previously described [7, 8]. Cells were collected into fresh Tyrode solution and centrifuged at 800 rpm for 3 minutes. Supernatant was

removed and cardiomyocyte-enriched pellets were snap-frozen in liquid-N₂ and stored at -80°C for subsequent protein extraction and analysis.

Sample Preparation and DIGE Labelling

Total protein was extracted from isolated LA-cardiomyocytes and subjected to differential in-gel electrophoresis (DIGE) using adapted techniques from previously described protocols [9]. Snap-frozen cell-pellets were pulverized under liquid-N₂ into a fine powder, which was homogenized in 2-DE lysis buffer (8-M urea, 4% (w/v) CHAPS, 30-mM TrisCl, pH 8.5) compatible with DIGE labelling (GE Healthcare) containing a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, Roche). Samples were left on ice for 30 min prior to centrifugation for 15 min at 4°C, 13.2 krpm. The supernatant was removed and the protein concentration determined using Bradford assay [10]. The fluorescence-dye labelling reaction was carried out at a dye/protein ratio of 200-pmol/50-µg. After incubation on ice for 30 min, the labelling reaction was stopped by scavenging non-bound dyes with 10-mM lysine for 15 minutes. Fluorescently-labelled solubilized proteins were stored at -80°C until required.

Two-dimensional Gel Electrophoresis

Labelled samples were mixed with 2×buffer (8-M urea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) pharmalyte pH 3-10 and 2% (w/v) DTT for IEF), 50-µg per sample were diluted in rehydration buffer solution (8-M urea, 0.5% (w/v) CHAPS, 0.2% (w/v) pharmalyte pH 3-10 and 0.2% (w/v) DTT) and loaded onto immobilized pH gradient (IPG) strips (180 mm, pH 4-7L (linear), GE Healthcare) for overnight in-gel hydration. First dimension isoelectric focusing (IEF) was performed at 0.05 mA/IPG strip for 75 kVh at 20°C. The strips were then equilibrated in 6-M

urea containing 30%-glycerol, 2%-SDS and 0.01%-Bromophenol blue, with the addition of 1%-DTT for 15 min, followed by the same buffer without DTT, but with 4.8%-iodoacetamide for 15 min. SDS-PAGE was performed using 12%T, 2.6% C separating polyacrylamide gels without a stacking gel using the Ettan™ DALTsix vertical electrophoresis system (GE Healthcare). The second dimension was performed at 10°C and was terminated when the Bromophenol dye front had migrated off the gels. Following completion of electrophoresis, fluorescent images were acquired using a Typhoon Variable Mode Imager 9400 (GE Healthcare) and gels fixed overnight prior to silver staining. For documentation, silver-stained gels were scanned in transmission-scan mode using a calibrated scanner (GS-800, Bio-Rad). Fluorescent gel images were analyzed using Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics). All 2-DE gels were of high quality in terms of resolution as well as consistency in spot patterns. Differentially-expressed ($P < 0.05$) protein-spots were excised for identification by tandem mass-spectrometry (MS-MS).

LCQ MS/MS

Silver-stained spots were manually excised for identification by MS-MS. In-gel trypsinolysis was performed using an Investigator ProGest (Genomic Solutions, Huntingdon, UK) robotic digestion system [11]. Following enzymatic degradation, peptides were separated by capillary LC on a reverse-phase column (BioBasic-18, 100 x 0.18 mm, particle size 5 μ m, Thermo Electron Corporation) and applied to a LCQ mass spectrometer (Finnigan LCQ Deca XP Plus, Thermo Electron Corporation) interfaced with a Finnigan Surveyor autosampler (Thermo Electron Corporation). The peptides were eluted using an ACN/0.1% formic-acid gradient. Spectra were collected from the mass analyzer using full ion-scan mode over the m/z range 300-

2000. MS/MS scans were performed on each ion using dynamic exclusion. Database searches were performed using TurboSEQUEST (BioWorks Browser v3.1, Thermo Electron Corporation) against UniProt database. The following filters were applied: for charge state 1, XCorr>1.50; for charge state 2, XCorr>2.00; for charge state 3, XCorr>2.50.

Western Blot

Equal amounts of protein for sham and VTP dogs (25 or 50 micrograms) were loaded on 12% Bis-Tris gels (Invitrogen), subjected to electrophoresis and blotted to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and probed using the Western Breeze Chemiluminescent Kit (Invitrogen). Primary antibodies were obtained against: Heat-shock protein 70 (HSP70), glucose-regulating protein 78 (GRP78) and superoxide dismutase (SOD, Stressgen); desmin and vimentin (Abcam); and peroxiredoxin-3 (PRX-3, Lab Frontier). Secondary antibodies were alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG. Primary antibodies against SOD and PRX-3 were rabbit polyclonals and the others mouse monoclonals.

Phosphoprotein Identification

Our 2-D gels suggested changing phosphorylation patterns. As a test of this notion, we directly assessed the phosphorylation of one potentially-important protein, HSP27. Phosphoprotein identification was obtained on micropreparative (450-μg) 2-D gels of pooled sham and VTP proteins. Total protein extracts were separated on pH 4 to 7 L IPG strips, followed by a 12% SDS polyacrylamide gel. Phos-tag (Perkin Elmer) phosphoprotein gel stain was used to selectively stain phosphoproteins in polyacrylamide gels, scanned on a Typhoon 9400 scanner

(GE Healthcare) at 540 nm. Subsequently, Phos-tag gels were stained with a mass-spectrometry compatible silver stain.

Metabolomic Analysis

Because of substantial changes in metabolism-related proteins, we performed an additional study with matched 24-hour VTP (n=6) and 24-hour VTP sham (n=5), 2-week VTP (n=6) and 2-week VTP sham (n=7) groups. Cardiac metabolite concentrations were measured with high-resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. LA tissues were excised from the beating heart *in situ* and immediately snap-frozen in liquid-N₂. Metabolites were extracted in 6%-perchloric acid. Neutralized extracts were freeze-dried and reconstituted in deuterium oxide, with 500 microlitres of each extract transferred to 5-mm NMR tubes. To each sample, 50 microlitres of 5-mM 3-trimethyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP) was added for chemical shift calibration and quantification. Immediately prior to NMR analysis, the pH of each sample was readjusted to 7.0 with perchloric acid or potassium hydroxide. NMR spectra were obtained using a Bruker 600-MHz spectrometer.

Statistical Analysis

Group data are presented as mean±SEM. Statistical comparisons were by unpaired Student's t-tests for individual comparisons between each VTP-group and its respective sham control. Differential protein-expression changes from proteomic experiments were determined with the 2D-gel analysis software Progenesis SameSpots, which provides automated same-spot detection, background subtraction, normalization and matching. Statistical analysis was performed on log-transformed data to ensure normality of distribution. Protein spots were ranked by *P*-value from

the one-way ANOVA analysis and assigned a unique ID. Protein spots of interest ($P<0.05$) were highlighted for downstream identification by MS-MS.

Results

Haemodynamics and Electrophysiology

Decreased systolic and diastolic blood pressures were observed following 2-week VTP (Figure 1A), along with increased left-ventricular end-diastolic pressure (Figure 1B). VTP-dogs showed significant ERP-prolongation after 2 weeks (Figure 1C). AF duration increased with VTP, reaching statistical significance *versus* sham at 2 weeks (Figure 1D).

Proteomic Findings

Figure 2 shows representative individual DIGE images from a sham (Cy5) and a 2-week VTP (Cy3) dog, together with the overlay of the two images. Proteins on the sham sample are labelled with Cy5 (red, upper right panel) and VTP proteins are labelled with Cy3 (green, upper left). Overlay (bottom) shows distinct protein-spots that are green when upregulated in VTP and red when downregulated. Individual examples are shown in circles; identified proteins are indicated by numbers. Overall, 118 proteins (77 increased and 41 decreased in VTP *versus* sham) showed differential expression ($P<0.05$) in 24-hour VTP dogs *versus* sham. At 2-week VTP, approximately twice as many proteins (238) were altered (124 increased and 114 decreased). Discrete spots were excised from silver-stained gels (examples illustrated in Supplemental Figures 1 and 2) and subjected to MS-MS for identification. MS-MS successfully identified 45 of 118 differential proteins in 24-hour VTP dogs and 115 of 238 proteins in 2-week VTP dogs (Supplemental Table 1).

Most of the identified differentially-expressed proteins fell into functionally-distinct groups (Supplemental Table 2). Figure 3 highlights three differentially-expressed proteins related to the heat-shock family and antioxidant defences (GRP78, HSP27 and SOD), with the proteins of interest on the silver-stained gel circled in purple. Expanded examples for each group corresponding to the spots indicated are provided in coloured boxes, with overall data provided as colour-coded bar charts. HSP27-expression increased significantly within 24-hour VTP, becoming non-significantly different from sham at 2 weeks. On the other hand, GRP78 and SOD expression were not significantly different from sham at 24 hours, with GRP78 showing significant upregulation and SOD downregulation at 2-week VTP.

Heat-Shock Proteins

Substantial changes in a variety of HSPs occurred with characteristic patterns over time (Figure 4, Supplemental Table 2, Supplemental Figure 3). HSP27 and HSP60 were increased (1.3-fold) only at 24 hours, whilst α -B-crystallin, HSP 90kDa β member 1 and GRP78 were increased (1.4, 1.8 and 1.8-fold) only at 2 weeks. The observed isoelectric points (pI) of the two protein-spots identified as HSP27 were shifted to the left (acidic region), at 5.76 and 5.52 (for protein IDs 900 and 905 respectively), consistent with acidic modifications like phosphorylation. Support for this hypothesis was provided by staining with Phos-tag, which is specific for phosphoproteins. Overlays of the same region visualized as the DIGE image or Phos-tag stains indicate that both co-localize to spots 900 and 905 (Supplemental Figure 4). Four protein spots in a charge train identified as GRP78 were significantly increased over sham on both DIGE and Western blot at 2-week VTP (Supplemental Figure 5). HSP alpha crystallin-related B6 was increased at 24 hours (1.4-fold) and remained elevated at 2 weeks (1.7-fold). Two members of the HSP70 family were

increased differentially over time. Heat shock protein 70 was increased only at 24 hours, whilst heat shock 70 kDa protein 8 was increased only at 2 weeks (both 1.3-fold, Figure 4). Western blotting confirmed increased HSP70-expression at 2 weeks (Supplemental Figure 5).

Antioxidant Proteins

Significant changes occurred for three protein-spots related to oxidant-stress response. Decreased expression of the antioxidants PRX-3 and SOD was observed after 2 weeks, but not 24 hours, of VTP (Figure 5, Supplemental Figure 6). Two protein-spots were identified as PRX-3. Both were shifted to acidic regions, suggesting post-translational modifications. Western blotting confirmed decreased SOD and PRX-3 expression (Supplemental Figure 5).

Evidence for Structural Damage

Clear and striking increases in desmin and filamin C protein-fragments were observed at 2-week VTP (Figure 6, Supplemental Figure 7). The corresponding signals at 24 hours were not differentiable from background. A filamin-C fragment observed at 24-hour VTP was also present in shams. These protein fragments are clearly visible on the DIGE image (Figure 2) as protein spots eID4, eID6, eID12, 777 and 738 (desmin) and 609 and 632 (filamin C). Western blotting confirmed changes observed on 2D-gels (Supplemental Figure 5). Increased expression of the intermediate filament, vimentin, was also observed at 2 week VTP compared with sham animals (Supplemental Figure 5).

Metabolic Proteins

Proteomic analysis revealed extensive changes in metabolic enzymes (Figure 7, Supplemental Figure 8). Fifteen metabolic proteins were significantly downregulated at 2-week VTP, compared to only three at 24 hours. Only creatine kinase, the key enzyme responsible for conversion of creatine to phosphocreatine, was significantly (and substantially) increased at 2-week VTP. Several proteins (cytosolic malate dehydrogenase (DH), pyruvate DH E1 alpha subunit, beta-enolase and alpha-enolase) were significantly increased at 24 hours and then downregulated at 2 weeks, suggesting time-dependent evolution of metabolic adaptations. Other changes included enzymes involved in oxidative phosphorylation such as NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate DH (complex II and TCA cycle), ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) and ATP synthase δ -chain and ATP synthase H^+ transporting, mitochondrial F0 complex protein (complex V).

Contractile Proteins

Substantial changes in contractile protein expression occurred (Figure 8, Supplemental Figure 9). Most changes appeared after 2 weeks of VTP, suggesting implication in a more developed cardiac-dysfunction phenotype. Myosin light chain (MLC) 2 (atrial isoform) was the only protein that was significantly reduced at 24 hours, with changes that persisted at 2 weeks. Typical atrial isoforms were downregulated, and ventricular isoforms upregulated. Troponin-T was also significantly downregulated after 2-week VTP.

Metabolites

Supplemental Figure 10 shows representative NMR spectra from sham and 2-week VTP dogs. Twenty-one metabolites were identified (acetate, ADP+ATP, alanine, betaine, choline, creatine,

formate, glucose, glutamate, glutamine, glycine, GPC/Carnitine, α -ketoisovalerate, lactate, myo-inositol, NAD⁺/NADH, phosphocreatine, scyllo-inositol, succinate, taurine and valine). Only 3 metabolites (2 increased and 1 decreased in VTP *versus* sham) showed differential expression ($P < 0.05$) in 24-hour VTP dogs (Figure 9). At 2-week VTP, however, 8 metabolites were altered (7 increased and 1 decreased, Figure 9). The presence of many more metabolite changes at 2-week *versus* 24-hour VTP is consistent with the greater number of significantly-changed metabolic proteins at 2-week VTP. Early metabolic alterations included increased concentrations of alanine and glucose with a corresponding decrease in the amino acid glutamine. Increased concentrations of alanine and glucose were maintained at 2-week VTP along with changes in taurine, ADP+ATP and glutamate. Concentrations of the α -ketoacid, α -ketoisovalerate, were significantly reduced at 2-week VTP.

Discussion

In this study, we applied global proteomic and metabolomic analysis-methods to LA samples from sham and VTP-CHF dogs at two time points, 24 hours and 2 weeks. We found particularly-important time-dependent alterations in the expression of proteins involved in cardiac oxidative injury, stress responses, metabolic function, structural integrity and contraction, along with related changes in metabolite profiles.

Changes in Stress Proteins and Atrial Oxidative Stress

“Heat-shock” or “stress” proteins play a prominent role in the cardiac response to a wide range of insults [12]. There is evidence that they are a significant determinant of the pathophysiology of both CHF [13] and AF [14]. We observed a variety of time-dependent changes in stress

proteins in the present study. HSP27-expression was significantly-increased at 24-hour VTP (Figure 4) and was hyperphosphorylated (Supplemental Figure 4). These changes are likely part of an autoprotective response, since HSP27 has important cardioprotective properties[15-17]. These functions, as well as the AF-preventive action of HSP27, depend on both increased expression and HSP27-phosphorylation [16-18]. The return of HSP27 to baseline with 2-week VTP may contribute to the AF-maintenance substrate observed only at that time-point. HSP60-expression is also increased in experimental CHF [19], although at the ventricular level the increases are maintained at 8 weeks, whereas atrial expression was increased only at 24 hours in our study. GRP78 is an endoplasmic-reticulum (ER) resident chaperone protein that increases with ER-stress and has important cardioprotective actions [20]. The import increases in atrial GRP78-expression at 2-week VTP are thus likely an autoprotective response to atrial ER-stress. Alpha-B-crystallin is also an important phosphorylatable autoprotective small HSP [17], lack of which causes apoptosis-related cardiomyopathy [21]. Expression of this protein was significantly increased at 2-week VTP, consistent with mobilization of HSP-related autoprotective functions. Interestingly the presence of this protein was also seen in a proteomic screening of human AF [22]. HSP70 increases with heart failure and may be involved in immune-related cardiac injury [23]. Its role in AF is unclear, since increased HSP70 may be a marker of post-operative AF risk [24] but HSP70/72 protects against angiotensin-II-induced fibrosis and atrial arrhythmias in a rat model [25] and against ischemic AF in the dog [26].

There are intimate links between the oxidative stress response and HSPs. HSPs are part of the response to reactive-oxygen species exposure of cardiomyocytes [27] and HSP27 inhibits oxidative cardiomyocyte damage [15]. Oxidative stress is an important contributor to AF and associated functional abnormalities [28-30]. Lin *et al.* [31] found that a deletion of 4977 bp in

mitochondrial DNA disrupts aerobic metabolism in AF, facilitating electron leakage from the respiratory chain to generate reactive oxygen species (ROS). Oxidative damage also alters myofibrillar energetics, contributing to the atrial contractile dysfunction in AF [32]. Both SOD and PRX-3 are important endogenous antioxidant proteins, overexpression of which protects against myocardial infarction-induced CHF [33, 34]. The decrease in both that we observed at 2-week VTP likely reflects their consumption in a context of oxygen free-radical injury. Downregulation of the antioxidative protein PRX-1 was observed in human AF confirming a role for oxidative stress in AF [22].

Changes in Structural and Contractile Proteins

We observed evidence of extensive structural remodeling-related fragmentation of atrial structural proteins at 2-week VTP (Figure 6), similar to previous findings in AF patients [22]. The previously-studied AF patients also had valvular heart disease, so our findings suggest that some of the structural-protein fragmentation observed may have been due to underlying heart disease rather than AF *per se*. Desmin is modified and delocalized from intercalated disks in experimental cardiomyopathy, forming aggregates that colocalize with HSP25 [35]. A missense mutation in α -B-crystallin causes desmin-related cardiomyopathy, characterized by the formation of amyloid-positive α -B-crystallin/desmin intracellular aggregates [21].

The contractile proteins troponin-T and MLCs 1 and 2 were downregulated by VTP. Contractile protein downregulation may spare energy, but at the cost of contractile dysfunction. An atrial to ventricular switch was observed, with decreased expression of atrial MLC1 and MLC2 and increases in the corresponding ventricular isoforms. Atrial to ventricular expression mRNA-expression shifts “ventricularization” have been observed in both AF [36] and CHF [37],

in which they evolve over time. Lai *et al.* [38] showed a similar phenomenon in a porcine model of AF. Replacement of the atrial with the ventricular isoform of MLC2 in mice enhances contractility and decreases Ca^{2+} -transient amplitude [39, 40]. Thus, these changes may reflect a compensatory measure to atrial hypocontractility in CHF atrial myocytes, which occurs despite increased Ca^{2+} -transients [41].

Changes in Metabolic Proteins and Metabolites

We observed extensive and complex time-dependent changes in atrial metabolism-related proteins (Figure 7). Cha *et al.* demonstrated extensive changes in creatine, adenosine and guanosine phosphoproteins in CHF-associated atrial remodeling and suggested that metabolic remodeling may contribute to the AF substrate [42]. We observed prominent creatine-kinase upregulation at 2-week VTP, consistent with previous genomic observations suggesting compensatory changes to enhance high-energy phosphate availability [37]. Alpha and beta-enolase expression was increased at 24-hour and decreased at 2-week VTP. Alpha-enolase is also downregulated in human permanent AF [36]. Enolase mediates the penultimate step of glycolysis, converting 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate, and plays an important role in glycolytic energy production. Early increased expression likely reflects a response to increased metabolic needs and longer-term decrease an energy-saving adaptation. We also noted increased expression of the alpha subunit of the E1 component of pyruvate-DH at 24-hour VTP. The pyruvate-DH complex converts pyruvate to acetyl CoA, an irreversible step from glycolysis to the TCA-cycle. The catalytic activity of this enzyme-complex is controlled by α -subunit phosphorylation of the E1 component [43]. Barth *et al.* reported increased expression of pyruvate DH kinase, which phosphorylates and inhibits the enzyme, and decreased expression of pyruvate

DH phosphatase, which reverses the inhibition, in permanent human AF [36]. Alpha-subunit downregulation at 2-week VTP, in agreement with previous genomic observations [37], may also be inhibitory, possibly contributing to glycogen accumulation in AF [44].

Oxidative injury by ROS during human AF is linked to impaired myofibrillar energetics [32]. ROS are produced as a byproduct of metabolism. Oxidative phosphorylation is the principal process by which ATP is formed. The majority of superoxide is generated at complexes I and II of the electron transport chain [45]. The changes we observed in enzymes involved in both complexes I (NADH ubiquinone-oxidoreductase) and III (ubiquinol cytochrome-c-reductase) may have played a pivotal role in oxidative stress. Decreased expression was also observed for succinate dehydrogenase, essential to both the TCA cycle and the electron transport chain, where it links complexes I and III. Increased expression of components of complexes I and III have been observed in AF patients with valvular heart-disease [22]: our observations suggest that the underlying pathology rather than the AF per se is responsible for these changes. Abnormal mitochondrial structure is observed in animal models of AF and heart failure and may be related to extensive changes in mitochondrial energetics [44, 46, 47].

Cytosolic malate DH, upregulated at 24-hour VTP but markedly downregulated at 2-week VTP, is required for transport of NADH equivalents from glycolysis into the mitochondrial matrix for oxidative phosphorylation by the respiratory chain, producing ATP [48]. Decreased expression of this enzyme may decrease the oxidative metabolism of glucose, leading to localized acidosis. Acidosis is a major contributor to reduced inotropy in the ischemic heart [49]. Many of the differentially-expressed metabolic proteins that we observed in this study were also seen in a proteomic screen of chronic hibernating myocardium [50], consistent with the notion that hibernation-like changes are part of the adaptive response in persistent AF [44].

We observed significant alterations in cardiac metabolism that were in agreement with changes in metabolic protein-expression. Increased concentrations of the glycolytic end-product alanine at 24-hour and 2-week VTP, likely resulting from enhanced-alternate pathway conversion from pyruvate, are consistent with alterations to the E1 component of pyruvate DH suggestive of pyruvate to acetyl-CoA inhibition. Increased and decreased concentrations of glucose and α -ketoisovalerate respectively at 2-week VTP indicate a switch from glycolysis to α -ketoacid metabolism, consistent with downregulation of several proteins involved in glycolysis. This change has important consequences for energy availability and regulation, and is consistent with the accumulation of ADP/ATP and glucose we observed at 2-week VTP. α -Ketoisovalerate may also have a role in regulating the pyruvate DH complex [51], suggesting inter-related and complex metabolic alterations. Increased glucose concentrations may result from decreased flux through the glycolytic pathway or increased glucose uptake. Recchia *et al.* showed increased glucose uptake in pacing-induced heart failure [52]. The observed increase of NAD⁺/NADH concentration may be related to decreased protein expression of cytosolic malate DH, which is responsible for transferring cytoplasmic NADH produced during glycolysis to the mitochondria for energy production [48]. Increased concentrations of the main organic osmolyte in the heart, taurine, were also observed at 2-week VTP. Taurine regulates cell volume, ion transport and contractile function, and its accumulation may contribute to contractile dysfunction. The absence of change in creatine and phosphocreatine may be related to the compensatory increase in creatine-kinase expression at 2-week VTP. Increases in glutamate concentration at 2-week VTP may also reflect metabolic adaptation.

Novel Findings and Potential Significance

Our study is the first of which we are aware to analyze in detail atrial protein and metabolite expression-changes with the use of proteomic and metabolomic technologies in an animal model of an evolving AF substrate. The changes we observed point to the central importance of metabolic changes in particular, as well as oxidative stress and associated structural damage, contractile-protein alterations and stress-protein responses in AF-supporting CHF atria. Previous work has pointed to the importance of metabolic changes in AF-promotion [31, 42] The extensive alterations in atrial protein-expression and metabolite-profile that we observed, particularly after 2-week VTP at the time of clear AF-promotion, point to the importance of metabolic factors in the AF-substrate. The time-dependence of the alterations in atrial proteins and metabolites that we saw implicates failure of the adaptive response and the appearance of maladaptive modifications in the development of a molecular, metabolic and functional environment propitious to AF-maintenance. Support for adaptive responses, for example by boosting the HSP-reaction [14], may allow for the development of novel AF-preventing therapies.

Our findings highlight interacting networks of protein-modifications in AF-promoting pathophysiology. HSPs mediate protective responses to oxidative stress [15, 27]. Desmin fragments co-localize with HSPs and their interaction determines the occurrence of experimental and clinical cardiomyopathies [21, 35]. Oxidative stress results from mitochondrial metabolism dysfunction and further impairs both metabolic and contractile function. Thus, favourable therapeutic approaches to CHF-related AF will need to target various components of an interactive network of protein dysfunction to effectively promote improved atrial functional integrity.

Potential Limitations

This canine model of VTP-induced CHF produces a substrate for AF maintenance which is characterized by alterations in local conduction properties and interstitial fibrosis [6]. Fibrosis and AF promotion are limited after 24 hours but become significant after 1 week of VTP [53]. We studied 2 time points corresponding to early and near-steady state VTP-induced atrial changes, but it would be of interest to examine other time points, which we were unable to do because of practical considerations. It would also be interesting to investigate other animal models of AF and CHF in future work. Because of the specific nature of the model that we studied, extrapolation to other systems and models, and especially to man, should be cautious.

The nature of proteomic technology made certain potentially-important protein systems difficult to interrogate, and their absence among the proteins we identified does not exclude a role in CHF-associated AF. For example, extracellular-matrix proteins are secreted from fibroblasts and would not appear in our proteomic screen of isolated cardiomyocytes, despite their importance in AF pathophysiology [6, 53]. Ion-channel protein subunits show relatively low-level membrane-localized expression compared to contractile, structural, heat-shock, metabolic and antioxidant proteins, potentially explaining the lack of ion-channel subunits among the differentially-expressed proteins we identified.

Conclusions

VTP-induced CHF substantially alters the atrial protein expression profile in ways that reflect both stress-induced damage and atrial adaptive mechanisms. This first large scale proteomic and metabolomic analysis of CHF-induced atrial remodeling provides novel insights into molecular

mechanisms underlying an AF-promoting atrial remodeling paradigm of substantial potential clinical relevance.

Acknowledgements

The use of the facilities of the Medical Biomix Centre, St. George's University of London is gratefully acknowledged. The authors thank Nathalie L'Heureux, Chantal St-Cyr and Nina Patel for excellent technical assistance. This work was supported by the Khalid Ali Alturki Foundation, the British Heart Foundation, Canadian Institutes of Health Research (MGP 6957), the Quebec Heart and Stroke Foundation and Foundation Leducq (07/CVD-03, European-North American Atrial Fibrillation Research Alliance).

Disclosure Statement

None.

References

1. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004; 110: 1042-6.
2. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006; 27: 949-953.
3. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006; 114: 119-125.
4. Steinberg JS. Atrial fibrillation: an emerging epidemic? *Heart* 2004; 90: 239-240.
5. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; 92: 1954-1968.
6. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999; 100: 87-95.

7. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 81: 512-525.
8. Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshta-Takeshita A, Le Meur N et al. Contrasting Gene Expression Profiles in Two Canine Models of Atrial Fibrillation. *Circ Res* 2007; 100: 425-433.
9. De Souza AI, Wait R, Mitchell AG, Banner NR, Dunn MJ, Rose ML. Heat shock protein 27 is associated with freedom from graft vasculopathy after human cardiac transplantation. *Circ Res* 2005; 97: 192-8.
10. Weekes J, Wheeler CH, Yan JX, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G et al. Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* 1999; 20: 898-906.
11. Wait R, Gianazza E, Eberini I, Sironi L, Dunn MJ, Gemeiner M et al. Proteins of rat serum, urine, and cerebrospinal fluid: VI. Further protein identifications and interstrain comparison. *Electrophoresis* 2001; 22: 3043-3052.
12. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83: 117-132.

13. Toko H, Minamino T, Komuro I. Role of heat shock transcriptional factor 1 and heat shock proteins in cardiac hypertrophy. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2008; 18: 88-93.
14. Brundel BJ, Ke L, Dijkhuis AJ, Qi X, Shiroshita-Takeshita A, Nattel S et al. Heat shock proteins as molecular targets for intervention in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 422-8.
15. Liu L, Zhang XJ, Jiang SR, Ding ZN, Ding GX, Huang J et al. Heat shock protein 27 regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via reactive oxygen species generation and Akt activation. *Chinese medical journal*. 2007; 120:2271-7.
16. Venkatakrishnan CD, Tewari AK, Moldovan L, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppusamy P et al. Heat shock protects cardiac cells from doxorubicin-induced toxicity by activating p38 MAPK and phosphorylation of small heat shock protein 27. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2680-2691.

17. Dohke T, Wada A, Isono T, Fujii M, Yamamoto T, Tsutamoto T et al. Proteomic analysis reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure. *J Card Fail* 2006; 12: 77-84.

18. Brundel BJ, Shiroshita-Takeshita A, Qi X, Yeh YH, Chartier D, van Gelder IC et al. Induction of Heat Shock Response Protects the Heart Against Atrial Fibrillation. *Circ Res* 2006; 99: 1394-1402.

19. Toga W, Tanonaka K, Takeo S. Changes in Hsp60 level of the failing heart following acute myocardial infarction and the effect of long-term treatment with trandolapril. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2007; 30: 105-110.

20. Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H et al. Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 600-610.

21. Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, Westfall M, Robinson D, Imahashi K et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112: 3451-3461.

22. Mayr M, Yusuf S, Weir G, Chung YL, Mayr U, Yin X et al. Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 585-594.
23. Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Nakamura M. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 810-5.
24. Oc M, Ucar HI, Pinar A, Akbulut B, Oc B, Akyon Y et al. Heat shock protein70: a new marker for subsequent atrial fibrillation development? *Artificial Organs* 2008; 32: 846-850.
25. Wakisaka O, Takahashi N, Shinohara T, Ooie T, Nakagawa M, Yonemochi H et al. Hyperthermia treatment prevents angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation via induction of heat-shock protein 72. *J Mol Cel Cardiol* 2007; 43: 616-626.
26. Sakabe M, Shiroshita-Takeshita A, Maguy A, Brundel BJ, Fujiki A, Inoue H et al. Effects of a heat shock protein inducer on the atrial fibrillation substrate caused by acute atrial ischaemia. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 63-70.

27. Costa VM, Silva R, Tavares LC, Vitorino R, Amado F, Carvalho F et al. Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* 2009; 260: 84-96.
28. Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C et al. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005; 97: 629-636.
29. Shimano M, Shibata R, Inden Y, Yoshida N, Uchikawa T, Tsuji Y et al. Reactive oxidative metabolites are associated with atrial conduction disturbance in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; 6: 935-940.
30. Goette A, Bukowska A, Dobrev D, Pfeifferberger J, Morawietz H, Strugala D et al. Acute atrial tachyarrhythmia induces angiotensin II type 1 receptor-mediated oxidative stress and microvascular flow abnormalities in the ventricles. *Eur Heart J* 2009; 30: 1411-1420.
31. Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH. Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free radical biology & medicine* 2003; 35: 1310-8.

32. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 104: 174-180.
33. van Deel ED, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD et al. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free Radical Biology & Medicine* 2008; 44: 1305-1313.
34. Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M et al. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2006; 113: 1779-1786.
35. Panagopoulou P, Davos CH, Milner DJ, Varela E, Cameron J, Mann DL et al. Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *Journal Cell Biol* 2008; 181: 761-775.
36. Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M et al. Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res* 2005; 96: 1022-9.

37. Cardin S, Pelletier P, Libby E, Le Bouter S, Xiao L, Kaab S et al. Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 821-831.
38. Lai LP, Lin JL, Lin CS, Yeh HM, Tsay YG, Lee CF et al. Functional genomic study on atrial fibrillation using cDNA microarray and two-dimensional protein electrophoresis techniques and identification of the myosin regulatory light chain isoform reprogramming in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15: 214-223.
39. Buck SH, Konyn PJ, Palermo J, Robbins J, Moss RL. Altered kinetics of contraction of mouse atrial myocytes expressing ventricular myosin regulatory light chain. *Am J Physiol* 1999; 276: H1167-1171.
40. Pawloski-Dahm CM, Song G, Kirkpatrick DL, Palermo J, Gulick J, Dorn GW et al. Effects of total replacement of atrial myosin light chain-2 with the ventricular isoform in atrial myocytes of transgenic mice. *Circulation* 1998; 97: 1508-1513.
41. Yeh Y-H W, Qi X-Y, Chartier D, Boknik P, Kaab S, Ravens U et al. Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circulation Arrhythmia Electrophysiol* 2008; 1: 93-102.

42. Cha YM, Dzeja PP, Shen WK, Jahangir A, Hart CY, Terzic A et al. Failing atrial myocardium: energetic deficits accompany structural remodeling and electrical instability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1313-1320.
43. Rardin MJ, Wiley SE, Naviaux RK, Murphy AN, Dixon JE. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Analytical biochemistry* 2009; 389: 157-164.
44. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997; 96: 3157-3163.
45. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences* 2000; 25: 502-508.
46. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995; 91: 1588-1595.
47. Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Journal of Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1757-1762.

48. Safer B. The Metabolic Significance of the Malate-Aspartate Cycle in Heart. *Circ Res* 1975; 37: 527-533.
49. Crampin EJ, Smith NP. A dynamic model of excitation-contraction coupling during acidosis in cardiac ventricular myocytes. *Biophysical J* 2006; 90: 3074-3090.
50. Page B, Young R, Iyer V, Suzuki G, Lis M, Korotchkina L et al. Persistent regional downregulation in mitochondrial enzymes and upregulation of stress proteins in swine with chronic hibernating myocardium. *Circ Res* 2008; 102: 103-112.
51. Robertson JG, Barron LL, Olson MS. Effects of alpha-ketoisovalerate on bovine heart pyruvate dehydrogenase complex and pyruvate dehydrogenase kinase. *J Biol Chem* 1986; 261: 76-81.
52. Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res* 1998; 83: 969-979.
53. Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 315-325.

Figure Legends

Figure 1. Changes in hemodynamic and electrophysiological parameters in sham, 24 hr and 2 wk-VTP dogs. A) Systemic blood pressure (SBP); systolic and diastolic. B) Left ventricular end-diastolic pressure. C) Atrial effective refractory period differences as a function of basic cycle length. D) AF duration. Data expressed as mean±SEM, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ compared with the sham group.

Figure 2. Differential In-Gel Electrophoresis. LA cardiomyocyte-protein spots were labelled with Cy3 (VTP) and Cy5 (sham). The bottom panel shows an overlay of the images, in which green spots are upregulated in VTP and red spots, downregulated. Selected proteins that were identified as differentially-expressed are highlighted, with corresponding IDs in Supplemental Table 1.

Figure 3. Total protein-extracts from LA-cardiomyocytes were separated on pH 4-7 L IPG strips followed by 12% SDS polyacrylamide gel with DIGE technology. Differentially-expressed proteins were indicated by Progenesis SameSpots software and identified by tandem mass-spectrometry. Three differentially-expressed proteins are shown, with representative images for the same spot in each study-group shown in coloured boxes along with mean data.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.0001$.

Figure 4. Differential heat-shock protein (HSP)-expression following 24-hour and 2-week VTP. Results are shown relative to the corresponding sham group.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.0001$.

- Figure 5.** Antioxidant expression following 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams. $*P<0.05$, $**P<0.01$.
- Figure 6.** Structural protein changes following 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams. $**P<0.01$, $***P<0.0001$.
- Figure 7.** Metabolic enzyme expression-changes at 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.0001$.
- Figure 8.** Contractile protein changes at 24-hour and 2-week VTP relative to corresponding shams. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.0001$, $\S P=0.057$.
- Figure 9.** Metabolite changes at 24-hour and 2-week VTP. Metabolite concentrations ($\mu\text{mol/g-wet weight}$) for 24-hour and 2-week VTP are normalized to corresponding sham dogs. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.0001$.

Figure 1

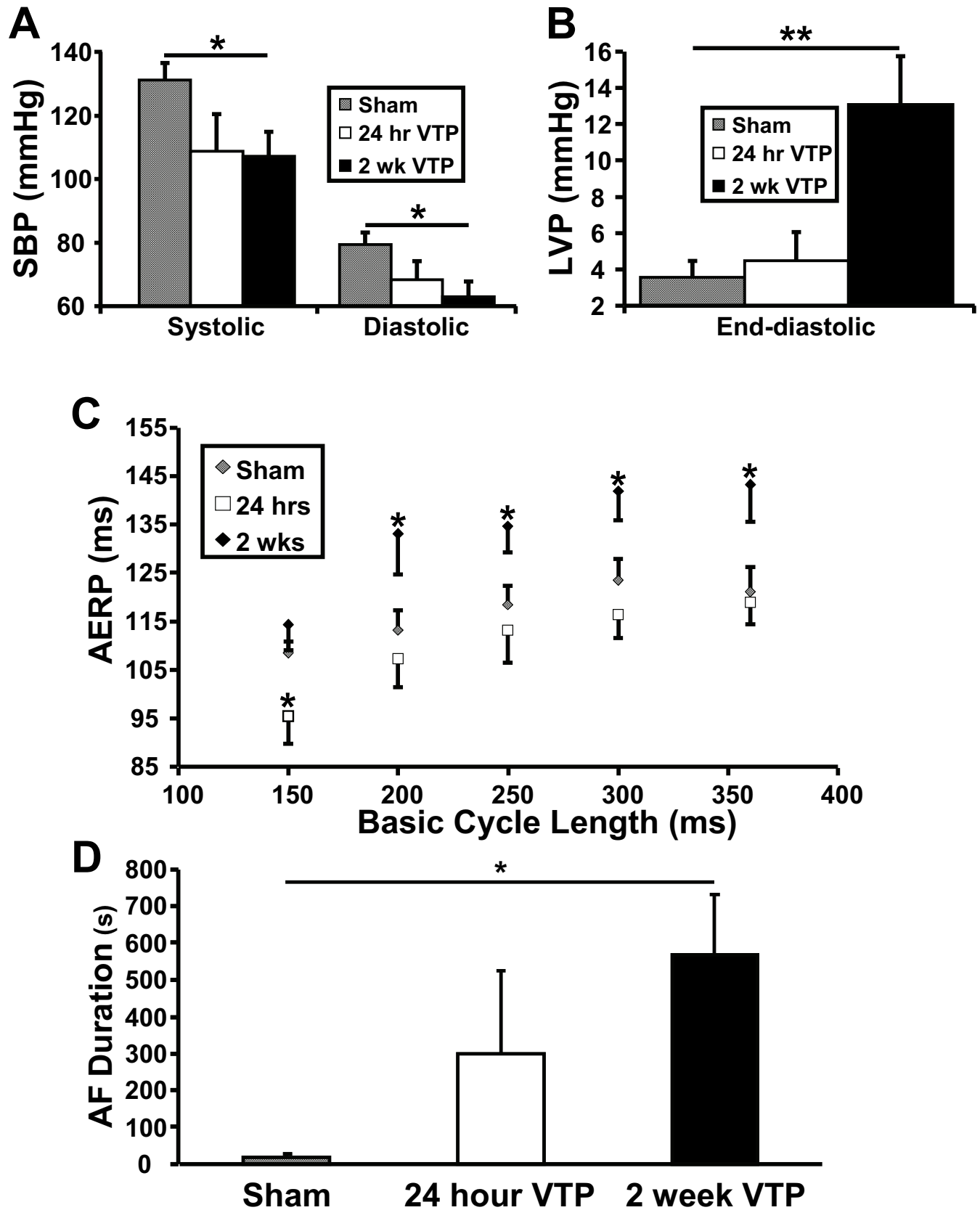
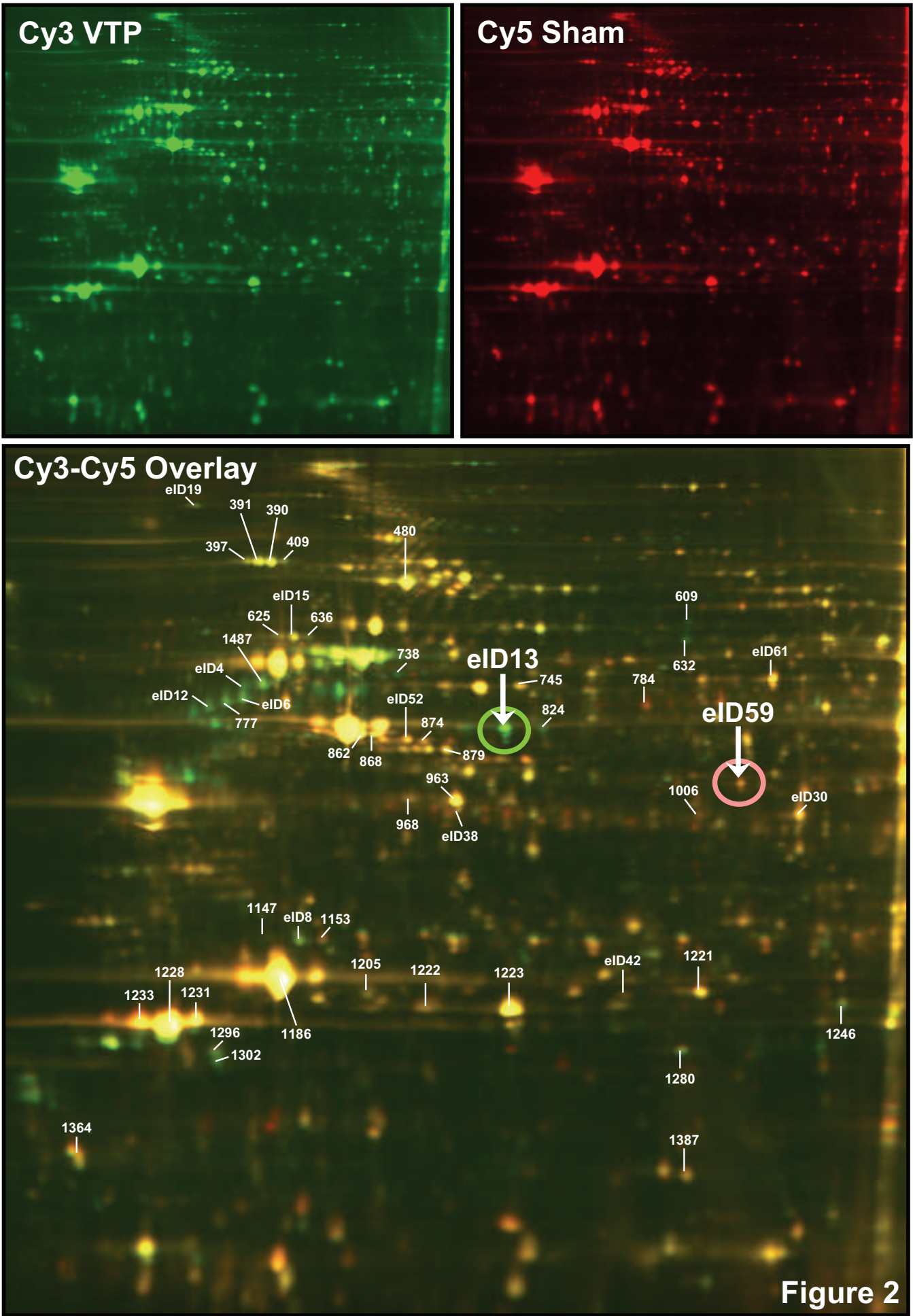


Figure 2



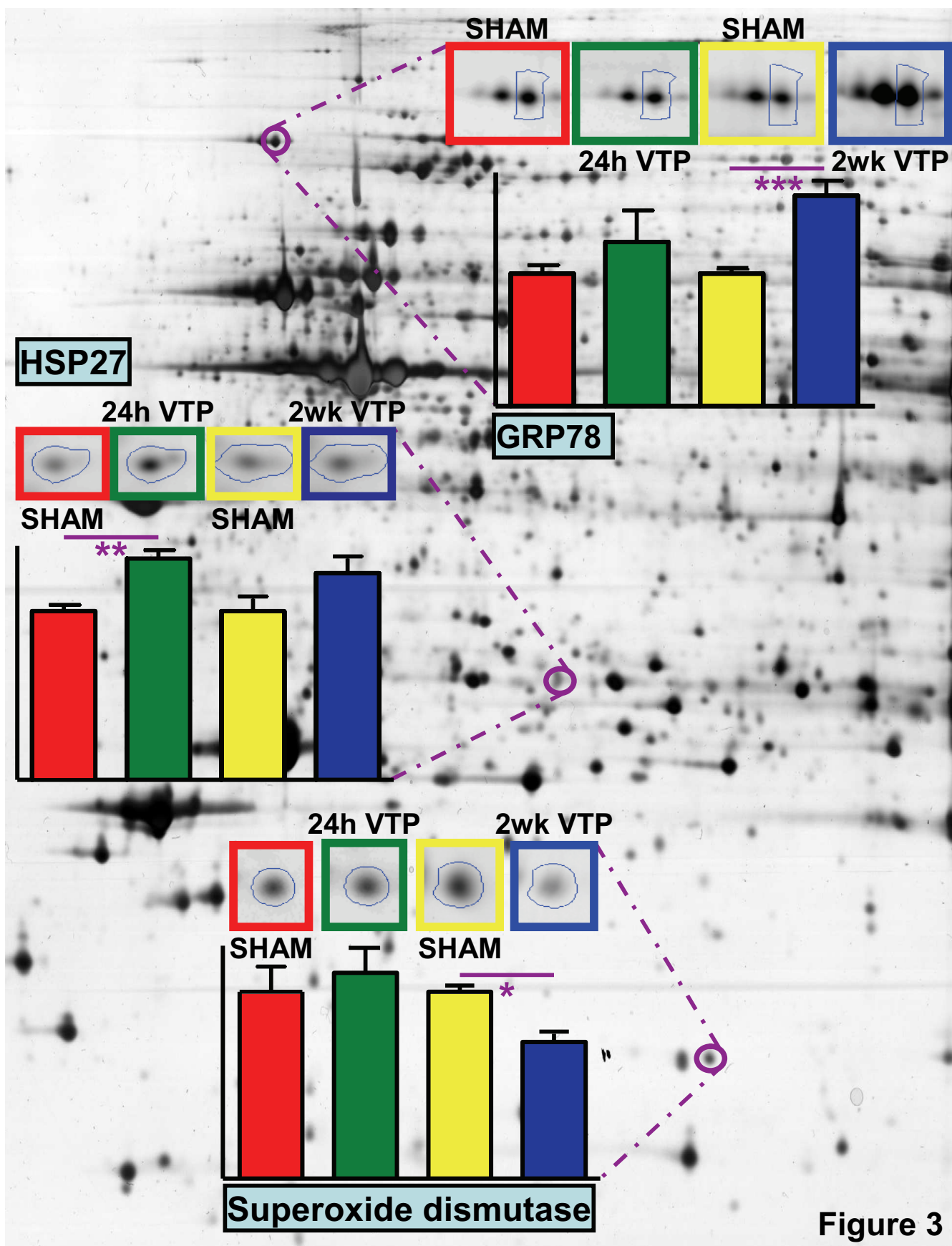


Figure 3

Figure 4

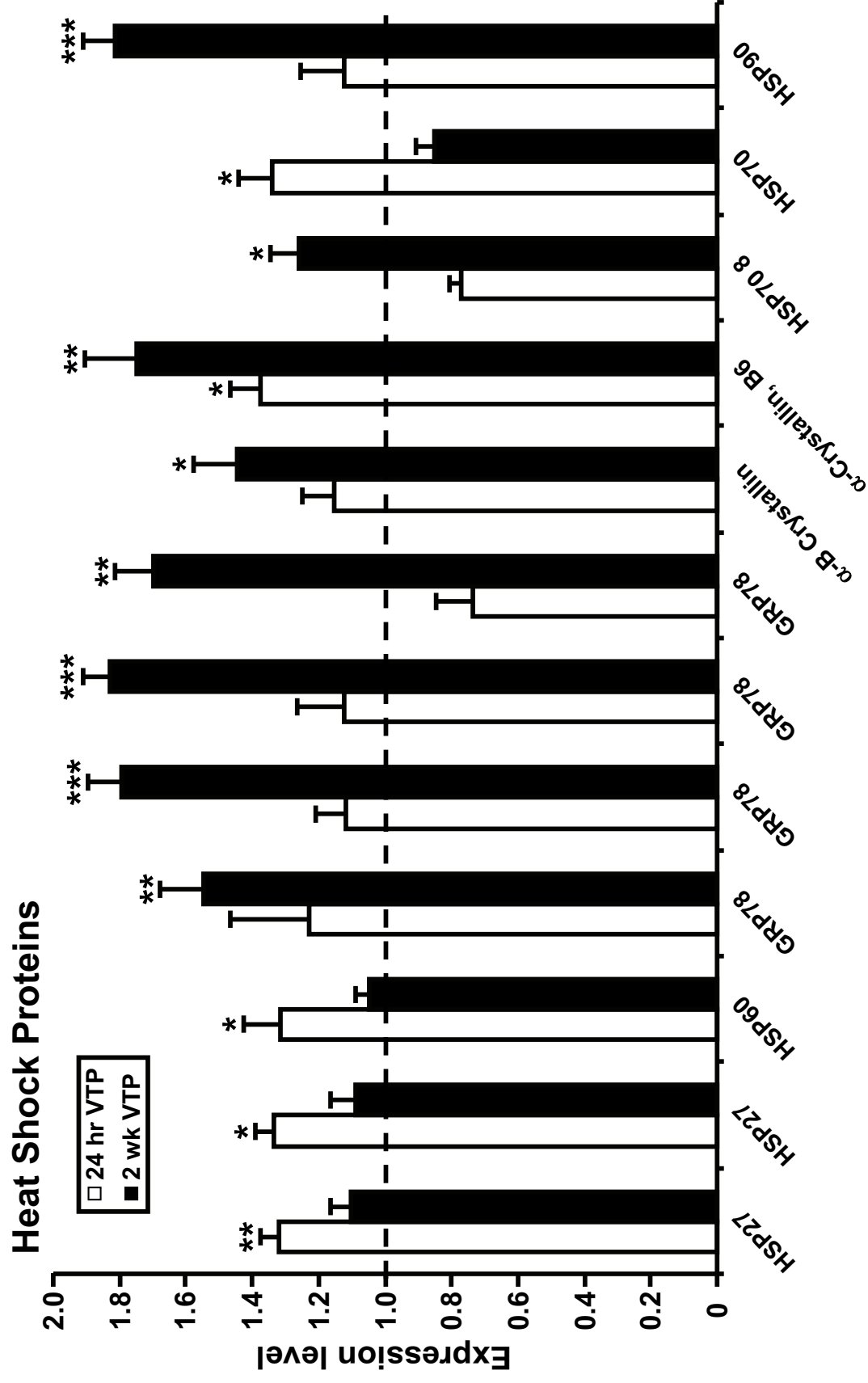


Figure 5

Figure 5

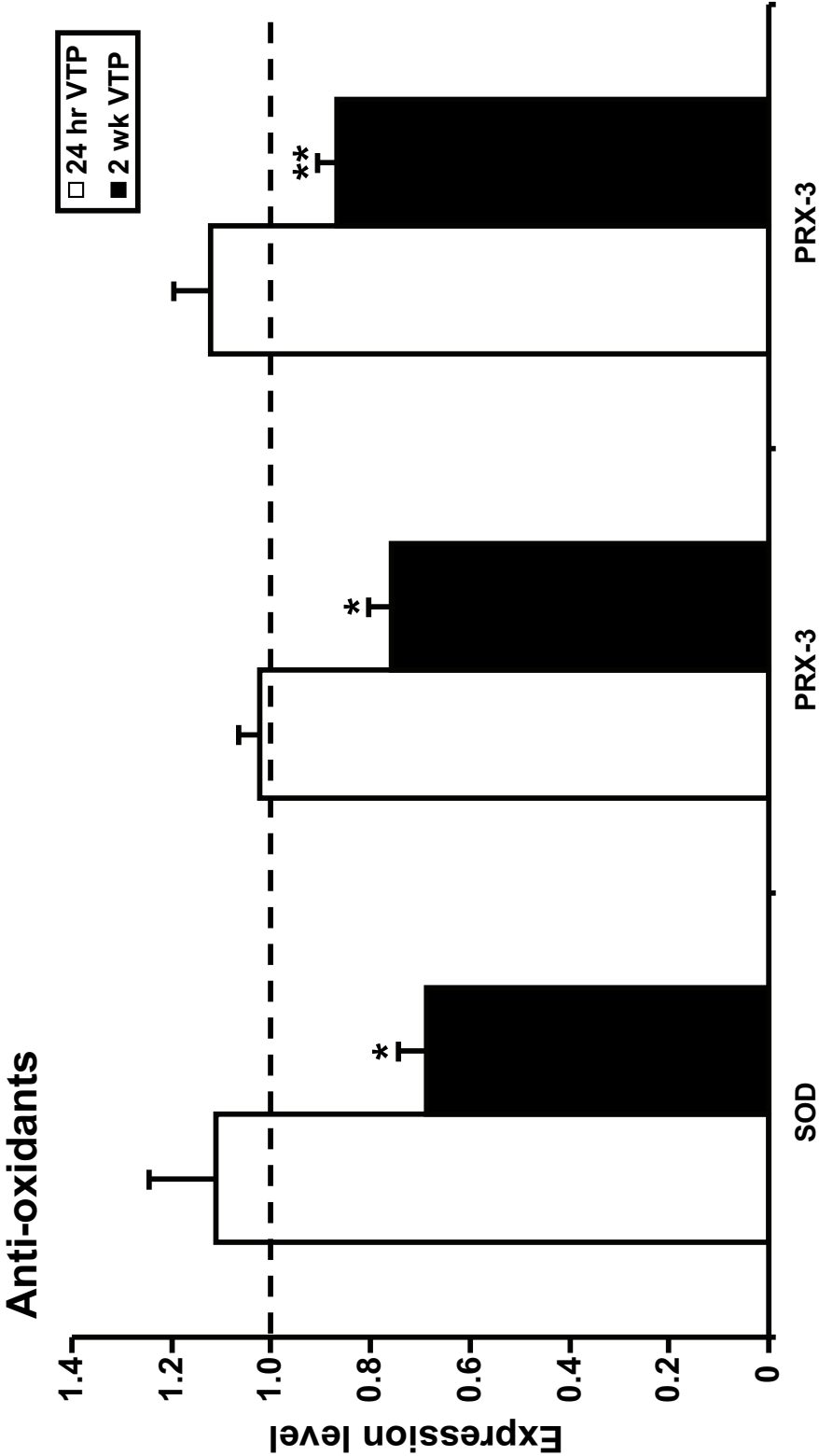


Figure 6

Figure 6

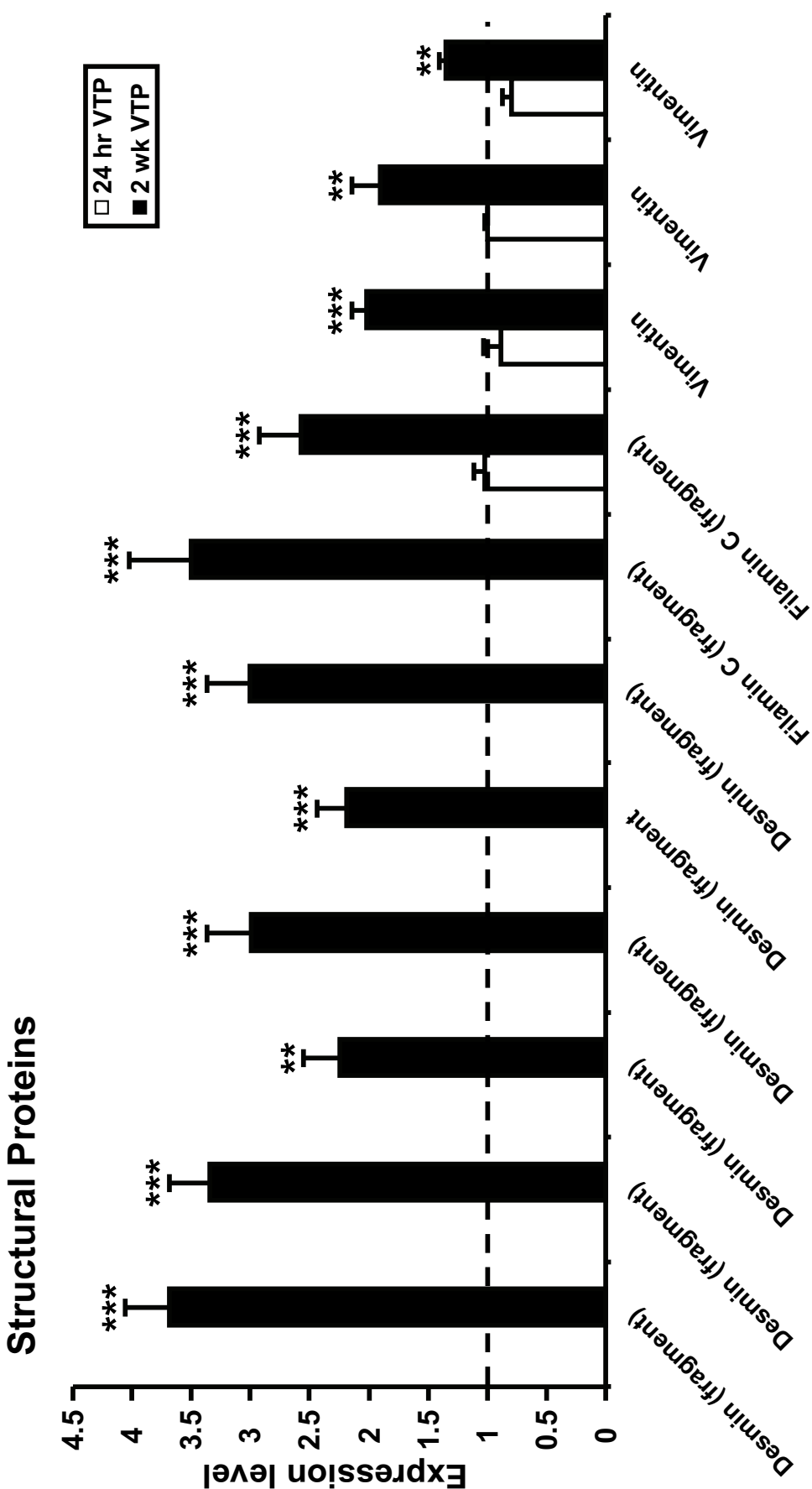


Figure 8

Figure 8

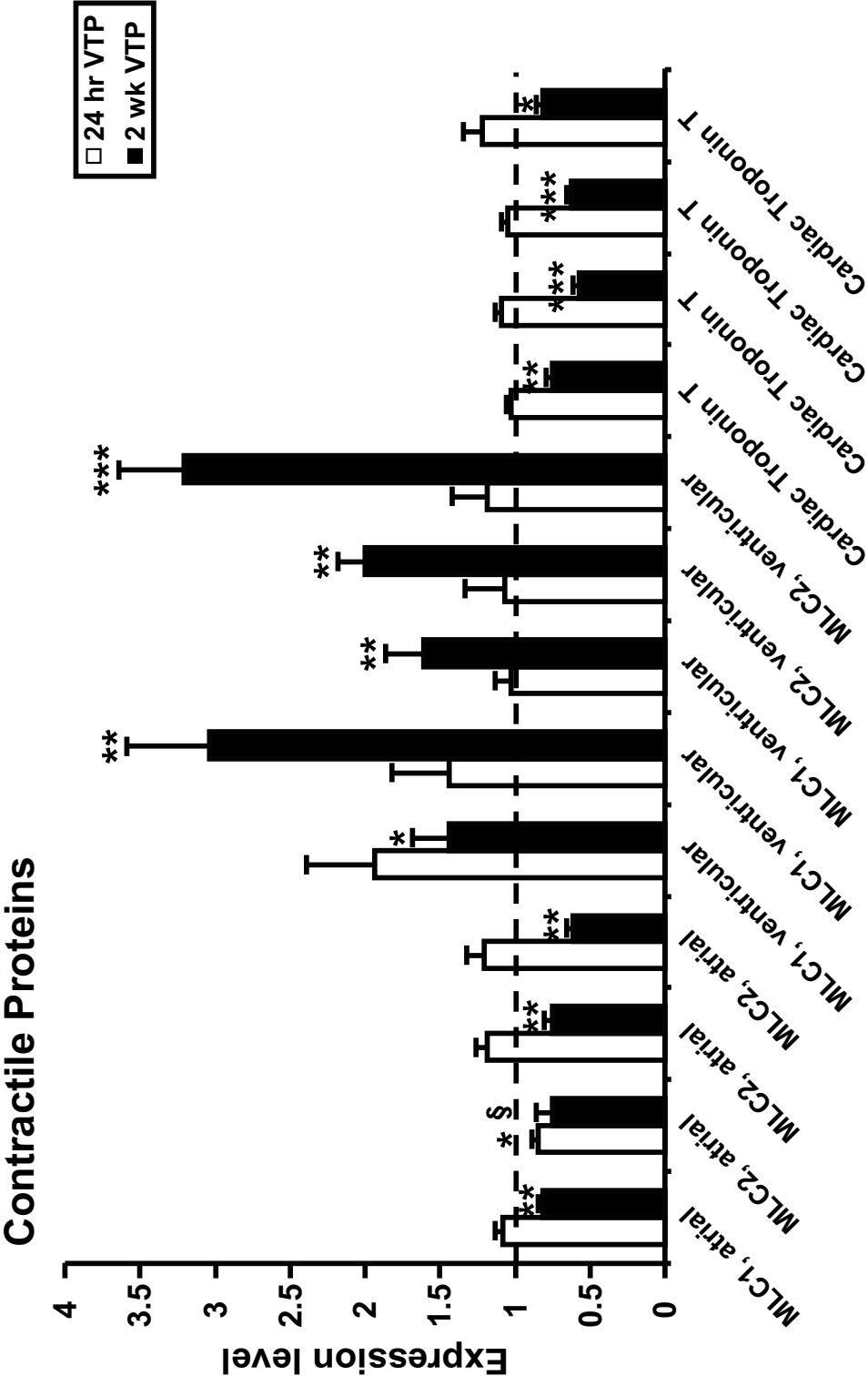
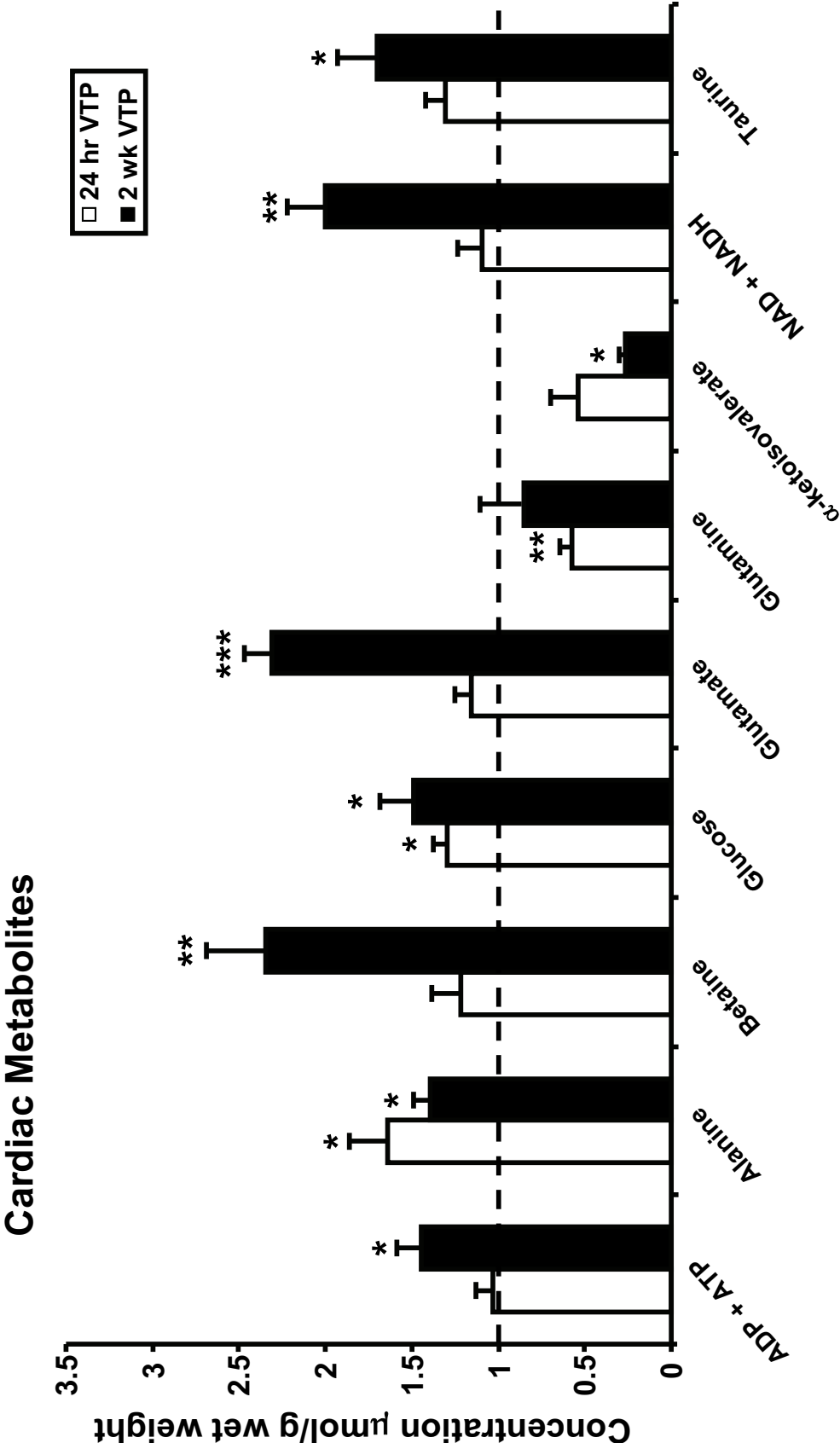


Figure 9

Figure 9



Chapître 6. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure: could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention?

Parmi tous les facteurs impliqués dans le remodelage auriculaire, la fibrose demeure un élément clé, pro-fibrotique. Plusieurs avenues thérapeutiques ont été étudiées pour tenter de prévenir la fibrose interstitielle. Récemment, les microARNs ont été montrés impliqués dans la régulation de gènes impliqués dans la fibrose tels que CTGF et de voie de signalisation stimulant la prolifération et la sécrétion par les fibroblastes. Notre étude vise à vérifier si 1) la voie de signalisation miR21/sprouty-1/ERK, proposée par Thum et al., (2008), est impliquée dans le remodelage auriculaire dans notre modèle et 2) l'utilisation d'une sonde interférant avec miR21 permettra la prévention de la fibrose auriculaire induite par l'insuffisance cardiaque, ainsi que la fibrillation auriculaire associée.

**Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure:
could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention?**

**Sophie Cardin, Xiaobin Luo, Khaï Le Quang, YanFen Shi, Jean-Claude
Tardif, Zhiguo Wang, Stanley Nattel.**

Correspondence to: Stanley Nattel, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. E.,
Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel.: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355;
E-mail: stanley.nattel@icm-mhi.org

Abstract

Background

Atrial tissue fibrosis is a major aspect of heart failure-induced atrial remodeling. ERK1/2 has been shown to be involved in fibroblast growth and proliferation. MicroRNA-21 (miR21) activates ERK1/2 by downregulating Sprouty-1. This study addressed the mechanisms of atrial fibrillation (AF) promotion in a rat model.

Methods and results

We studied atrial remodeling induced heart failure in a rat model of myocardial infarction (MI) and operated but not infarcted sham controls. Echocardiography demonstrated progressive ventricular enlargement and hypocontractility and atrial dilation. Electrophysiological recordings showed ERP prolongation and increased atrial fibrillation maintenance. Atrial connective tissue content increased at 2 weeks post-MI and remained stable thereafter. Phosphorylated-ERK1/2 expression increased from 1 week post-MI and returned to sham values at 4 weeks post-MI. Increased miR21, collagen Ia mRNA, collagen IIIa mRNA and decreased sprouty-1 mRNA occurred at 2 week post-MI. Intervention studies with mir-21 knockdown are in progress and preliminary results are promising.

Conclusions

MI-induced heart failure leads to time-dependant atrial alterations, at structural, electrophysiological and cell signalling levels. The temporal sequence of changes suggests a mechanistic role for mir-21 and preliminary intervention data appear promising.

Introduction

Atrial fibrillation (AF), the greatest cause of cardiac arrhythmia-related hospitalization, was estimated to affect 2.2 million Americans and 4.5 million Europeans in 2006 (Fuster et al., 2006). Several cardiovascular diseases are known to cause AF, including cardiomyopathies (Ohtani et al., 1995), mitral valve disease (Bailey et al., 1968), myocarditis (Frustaci et al., 1991) and hypertension (Wattigney et al., 2003).

Heart failure has been associated with a number of electrical and structural alterations, with atrial tissue fibrosis considered a major pro-arrhythmic player. Studies on a canine model of ventricular tachypacing (VTP) demonstrated progressive connective tissue deposits surrounding atrial cardiomyocytes with heart failure development (Li et al., 2001; Cardin et al., 2003). Animals allowed to recovery from heart failure showed hemodynamic and electrophysiological improvement, without changed atrial fibrillation inducibility or atrial fibrosis (Burstein et al., 2009). Heart failure animals and patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACE), which prevent fibrosis, show reduced atrial fibrillation (Li et al., 2001; Healey et al., 2005).

Interstitial tissue fibrosis results from an altered balance between extracellular matrix (ECM) synthesis and degradation. Fibroblasts secrete several ECM components, like collagen, fibronectin, matrix metalloproteases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (Espira and Czubryt, 2009). In heart failure, fibroblasts actively proliferate and differentiate to become hypersecretory myofibroblasts (Porter and Turner, 2009). In response to hormones, growth factors and pro-inflammatory cytokines, activated myofibroblasts secrete collagens, fibronectin and cytokines that regulate MMPs and TIMPs activities. Excessive myofibroblast response leads to ECM-component accumulation in the cardiac interstitium, constituting fibrosis.

Recently, a new class of small non-coding RNAs, microRNAs, have been shown to regulate gene expression. MicroRNAs bind 3'-UTR regions of target mRNAs to alter their downstream translation (Moss et al., 1997). MicroRNAs play a role in different

aspects of ventricular remodeling such as hypertrophy and fibrosis (van Rooij et al., 2009; Duisters et al., 2009). Thum et al. (2008) showed significant miR21 upregulation, which caused sprouty1 down-regulation, in ventricular fibroblasts from failing hearts. Sprouty1 is a negative regulator of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, a signalling cascade activated in multiple stress conditions. Our study was designed: 1) to assess the changes in atrial-tissue properties, arrhythmia vulnerability and structure with the onset of heart failure caused by extensive myocardial infarction in rats and 2) having found a potential role for ERK1/2 activation, to demonstrate whether miR21 silencing attenuates atrial fibrosis and atrial fibrillation maintenance in this rat model of ischemic dilated cardiomyopathy.

Materials and methods

Animal Handling

All the experiments were carried out with male Wistar rats weighing 200-250g, from Charles River, Saint-Constant, Quebec, Canada. Animals were fed with normal rat chow diet (2018 Harlan) and housed under a 12:12 hour light/dark cycle at 21°C, 50% humidity. Rats had free access to tap water and food. The experiments were carried in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and approved by the Montreal Heart Institute Animal Ethic Committee.

Surgical procedures

Rats were anesthetized under 3% isoflurane, intubated and ventilated. A pre-operative dose of buprenorphine (0.03mg/kg) was injected subcutaneously. The thorax was shaved, carefully washed with water and sterilized with antiseptic solution (2% w/v chlorhexidine gluconate and 70% v/v isopropyl alcohol). A left thoracotomy was performed and ligation of the left anterior descending coronary artery was performed with 6-0 silk suture. The chest was closed with 3-0 silk suture and the skin closed with autoclips. Two other doses of buprenorphine (0.03 mg/kg) were administered subcutaneously, 6 and 12 hours post-surgery.

Transthoracic Echocardiography

Transthoracic echocardiographic studies were performed at baseline before surgery, 2 weeks, and 8 weeks after surgery (under sedation with 3%-isoflurane), using a phased-array 10S probe (4.5 ~ 11.5 Megahertz) in a Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway).

Left Ventricular Myocardial Infarct Model: Left ventricular (LV) short-axis view at the level of papillary muscle was recorded to define infarct area. LV regional wall motion was scored as: normal 1, hypokinesis 2, akinesis 3, dyskinesis 4, and aneurysmal 5, for the 6 segments in this view. Wall motion score index (WMSI) was calculated as (Sum of all scores / 6). Infarct size was classified as small with $1 < \text{WMSI} \leq 1.25$; medium with $1.25 < \text{WMSI} < 1.65$; and large with $\text{WMSI} \geq 1.65$. Rats with $\text{WMSI} \geq 1.65$ were included in this study.

Left Ventricular Structural and Functional Remodeling of the Model: ***A) Systolic function:*** LV area at both end cardiac diastole (LVAd) and systole (LVAs) were measured with papillary muscle being included in the short axis view described above. LV fractional area changing (FAC) was calculated as $(\text{LVAd} - \text{LVAs}) / \text{LVAd} \times 100\%$. LV M-mode spectrum was also obtained in this view, with LV posterior wall velocity (PWV), LV dimension at both end cardiac diastole (LVDd) and systole (LVDs) were measured. LV fractional shortening (FS) was calculated as $(\text{LVDd} - \text{LVDs}) / \text{LVDd} \times 100\%$. The LV inferior wall (*I*) thickness at end cardiac diastole was also measured, and LV relative wall thickness was calculated as $\text{RWT} = (2 \times I) / \text{LVDd}$. ***B) Diastolic function:*** Pulsed wave (PW) Doppler was used to study transmitral flow (TMF) in apical 4-chamber view and peak velocity in early filling E wave was measured. Mitral annulus velocity during early filling Em was measured by tissue Doppler imaging (TDI). E/Em ratio was calculated for both lateral and septal annulus. ***C) Myocardial performance:*** The time interval between mitral closing to opening (MVco) was measured in TMF derived by PW as described above. Transaortic flow was obtained by PW in apical 5-chamber

view, LV ejection time (LVET) was measured. LV Myocardial performance index (MPI) was calculated as $(MVco-LVET) / LVET \times 100\%$.

Biatrial Structural and Functional Remodeling of the Model:

M-mode spectrum in parasternal long axis view at the level of aortic valve was recorded and left-atrial (LA) dimension at end-cardiac diastole (LADd) and systole (LADs) were measured. LA fractional shortening (FS) was calculated as $(LADs - LADd) / LADs \times 100\%$. Apical 4-chamber view was recorded and LA area at end cardiac diastole (LAAd) and systole (LAAs) were measured, LA fractional area changing (FAC) was calculated as $(LAAs - LAAd) / LAAs \times 100\%$. Right atrial (RA) dimension was also measured in apical 4-chamber view. Heart rate was measured on a simultaneously recorded ECG. The average of 3 consecutive cardiac cycles was used for each measurement. Special care was taken to get similar imaging at follow-up study.

Hemodynamic measurements

Systemic and intra-ventricular hemodynamic parameters were obtained with 2.0 and 3.0F Millar catheters inserted into the right carotid artery, left ventricle (via right carotid artery) and right ventricle (via right jugular vein) in 2.5-3.0% isoflurane-anesthetized animals. Data from the catheters were recorded in a computer through IOX software (version 1.8.11.12, EMKA technologies) for monitoring and off-line analysis.

Electrophysiology *in vivo*

Rats under 3%-isoflurane anesthesia were intubated and ventilated. An octopolar catheter (1.9-F) with 0.5-mm electrode interspacing (Scisense) was inserted into the RA via the right jugular vein, to perform stimulation and recording simultaneously. A computer-based stimulator was used to trigger a voltage stimulus isolator (Grass Telefactor model SD9K) and perform diverse stimulation protocols. The stimulator, run in a windows environment, was built using Matlab and homemade C++ library interfaces and allowed the control of up to 8 stimulus isolators, with 1 microsecond timing error. We recorded

surface ECG, intracardiac electrogram and stimulation impulse trace in parallel channels, using IOX software (version 1.8.11.12, EMKA technologies) for monitoring and off-line analysis. Electrogram traces were filtered between 1 and 500 Hz. The threshold voltage, was determined for a train of rectangular 2-ms pulses. Atrial effective refractory periods (AERPs) were measured at two times threshold, with a 15-stimulus drive train (S1), at different basic cycle lengths (100 ms, 80 ms and spontaneous R-R interval minus 20 ms), followed by a premature stimulus (S2) progressively decremented in 2-ms intervals. AERP was defined as the longest S1-S2 interval that failed to generate a response. AF was induced by rapid stimulation (burst pacing) at different cycle lengths, starting from 100 ms and decreasing by 5-ms steps down to 30 ms. Trains of 50 to 100 pulses were used twice for each cycle length. Rapid and irregular atrial rate (>500 beats/min) with variation in electrogram morphology and lasting more than 10 consecutive beats was considered AF. The durations of all induced AF episodes were averaged to determine the mean AF duration for each animal. The sinus node recovery time (SNRT) was defined as the time between the end of the last complex of a train of ten S1s to the beginning of the following spontaneous beat. At the end of experiments, hearts were excised and immersed into buffered formalin or snap-frozen in liquid nitrogen for further analysis.

Histological study

Explanted hearts from 1-, 2-, 4- and 8 weeks post-surgery animals (n=4 Sham, n=4 MI per group) were preserved in 10% buffered formalin until being mounted in paraffin. Serial transversal 12- μ m atrial tissue sections were performed every 500 μ m. Sections were stained with Masson's Trichrome. Image acquisition and analysis were performed at 400X magnification, using Image-Pro 6.2 software. Fifteen to twenty images were analysed for each atrium, from 3 to 5 different sections. Images were selected in mid-myocardium, and perivascular areas were avoided. Interstitial tissue fibrosis percentage was calculated as the area covered by interstitial tissue over the total area of the field.

Protein extraction and Immunoblots

Snap-frozen tissues were pulverized in liquid nitrogen and immersed in cold extraction buffer [25 mmol/L Tris-HCl , 1 mmol/L EGTA, 10% glycerol, 1% Triton-X 100, 10 mmol/L dithiothreitol, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 µmol/L microcystin LR, 10 µg/mL leupeptin, µg/mL aprotinin, µg/mL pepstatin and 0.1 mmol/L 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl-fluoride hydrochloride]. The samples were homogenized with a Polytron at 12000 rpm and incubated 30 minutes on ice. The samples were centrifuged 10 minutes at 4°C, 11,000 rpm. Supernatants were collected and protein concentrations were estimated using Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Protein extracts (100 µg) were denatured and separated by electrophoresis on 12% sodium-dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gels. Proteins were transferred on nitrocellulose membranes (0.45 Am). Membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) +5% nonfat dry milk (NFDM) for 90 minutes at room temperature and incubated in 0.1% Tween 80–TBS-NFDM primary antibody solutions overnight, at 4°C. Membranes were then washed and incubated in 0.1% Tween 80–TBS-NFDM peroxidase-conjugated secondary antibody solution for 60 minutes at room temperature. The membrane was washed and signal was visualised by enhanced chemiluminescence. Densitometry analysis was performed with Quantity-One software (Bio-Rad). Data were normalised to GAPDH density from the same sample on the same membranes.

The following primary antibodies against MAP kinases were used at 1:2000 dilution: mouse anti-phospho-P38 MAP kinase, mouse anti-phospho-ERK1/2 MAP kinases, mouse anti-P38 MAP kinase, mouse anti-ERK1/2 MAP kinase (Cell Signaling Technology, Danvers, Mass). Mouse anti-GAPDH (RDI, Fitzgerald Industries) was used at 1:10,000 dilution. Secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse; Jackson ImmunoResearch laboratories) was used at 1:10,000 dilution.

RNA isolation and Real-Time PCR

Total RNA was isolated using mirVana miRNA isolation kit, according to the manufacturer's protocol (Ambion). RNA extraction concentrations were estimated with *Nanodrop* technology. Real-Time PCR for miR21 was performed with specific miRNA FAM-labelled fluorogenic Taqman assay primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems). Relative quantifications were calculated with the comparative-threshold cycle method (2DDct), with RnU24 as a normaliser. Real-Time PCR for sprouty-1, collagen Ia and collagen IIIa were performed with predesigned rat-specific Taqman primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and relative quantification (2DDct) were calculated with β 2-microglobulin as a normaliser.

In vivo treatment with miR21 knockdown probe

A second set of experiments was performed in additional groups of rats: Sham-operated rats+knock-down probe, Sham-operated rats+knock-down scrambled probe, MI rats+knock-down probe, MI rats+ scrambled knock-down probe. Groups were separated to keep some animals for 2 weeks and some for 8 weeks post-surgery analysis. Rats were anesthetized and prepared for left thoracotomy as described earlier. Knock-down miR21 probe and scrambled-miR21 probe were dissolved in saline solution at a concentration of 5 μ g/ μ l. A final volume of 10 μ l was injected with Hamilton micro-syringe in the left atrial wall, at 5 separate injection points. Ligation of the left anterior descending coronary artery was performed with 6-0 silk suture, 5 minutes after completing intra-atrial injections. The chest was closed and post-operative care given as described earlier.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM. Results are compared with Student t-tests.

Results

Echocardiography data

Echocardiography was performed at baseline (before surgery) and at 2 weeks and 8 weeks post-myocardial infarction (post-MI). Data are presented in Table 1. The wall motion score index (WMSI) is an index of MI extent that was used to classify animals with no (WMSI=1), small ($1 < \text{WMSI} < 1.25$) medium ($1.25 < \text{WMSI} < 1.65$) or large myocardial infarctions ($\text{WMSI} > 1.65$). Only animals classified as large myocardial infarction (MI-group) were selected for the present study, as they are the only ones to develop severe heart failure over a 8-week time course. Only animals with no WMSI abnormality were considered valid Sham-group rats. Ventricular and atrial function indices were evaluated and data are presented in Table 1. Left ventricular diastolic and systolic diameters and areas increased progressively following myocardial infarction while in the Sham group, there were no significant changes at either post-surgery time-point versus baseline. The substantial increases in the MI rats but not Shams indicate significant evolving chamber dilation due to progressive ventricular dysfunction rather than simply animal ageing. Left ventricular fractional shortening, a reflect of wall chamber contractility, was markedly decreased at both 2 weeks and 8 weeks post-MI ($17.9 \pm 2.4\%$ and $9.5 \pm 2.1\%$) compared to values in the Sham animals at the same time-points ($55.6 \pm 5.9\%$ and $61.1 \pm 4.7\%$).

Left ventricular diastolic function was evaluated based on transmitral valve flow. The data show no change in E velocity, but a strong increase of the septal and lateral E/Em ratios indicating diastolic dysfunction. Myocardial performance index, the ratio of left ventricular isovolumic time to ejection time increased with myocardial function deterioration, as shown in clinical studies (Sekuri et al., 2004).

The left atrial dimensions progressively increased from baseline (LADd: 3.22 ± 0.36 mm, LADs: 4.69 ± 0.3 mm) to 2- (LADd: 5.03 ± 0.74 mm, LADs: 6.78 ± 0.55 mm) and 8- (LADd: 7.62 ± 0.85 mm, LADs: 8.72 ± 1.17 mm) weeks post-MI, compared to the sham group, for which size remained unchanged. Left atrial fractional shortening significantly decreased

over time in the MI group but not in the sham group. Taken together, these data demonstrate that heart failure development in our model is associated with severe progressive atrial enlargement and hypocontractility.

Hemodynamic measurements

Hemodynamic measurements were in general agreement with echocardiographic data (see Table 2). Left ventricular end-diastolic pressure increased 1 week after myocardial infarction (22 ± 7 mmHg), compared to the paired Sham (3 ± 2 mmHg) and remained elevated thereafter. Indices of contraction and relaxation (maximal dP/dt and minimal dP/dt respectively) also decreased 1 week after myocardial infarction (3912 ± 520 mmHg/s and -2977 ± 374 mmHg/s, versus sham: 5375 ± 397 mmHg/s and -4654 ± 523 mmHg/s) and remained decreased over time. Right ventricular pressure increases were observed from 2 weeks post-MI (38 ± 8 vs 23 ± 2 mmHg), suggesting an evolution of the pathological condition toward congestive heart failure.

Electrophysiological recordings

Atrial effective refractory period, measured at a basic cycle length (bcl) of 100 ms were significantly prolonged at 2 weeks (53 ± 5 ms), 4 weeks (48 ± 6 ms) and 8 weeks (59 ± 11 ms) post-MI, compared to the paired Sham-groups (2 weeks: 39 ± 6 ms, 4 weeks: 41 ± 4 ms, 8 weeks: 41 ± 4 ms), but didn't change progressively over time (see Table 3). Similarly, atrial effective refractory period was also prolonged at a standardized bcl close to the R-R interval (r-r interval duration minus 20 ms), for each post-MI time-point. The sinus node recovery time corrected for the R-R interval (SNRTc), measured at bcl 100 ms and 80 ms, was not affected by MI condition. Wenckebach cycle length was significantly longer at 2 weeks and 8 weeks post-MI compared to Sham rats, while it was not significantly different in MI versus Sham at 4 weeks post-surgery. Mean atrial fibrillation duration and maximal atrial fibrillation duration were markedly prolonged over time, with a difference statistically significant between MI and Sham attained only at 8 weeks post-surgery. An example of atrial fibrillation induced by an S1-S2 stimulation protocol, recorded in an 8-week post-MI rat, is shown in Figure 1.

Histological data

Atrial fibrous tissue content was measured based on Masson's Trichrome stained serial tissue sections, at 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks post-MI and was compared to paired sham animal groups (see Figure 2). The fibrous tissue content in left atria, expressed as a percentage of connective tissue area over total tissue section area, was significantly elevated at 2 weeks post-MI and remained stable thereafter.

MAP kinases and Pro-Caspase-3 expression level

We measured the phosphorylated expression levels of p38 and ERK1/2 with phosphor-specific antibodies, in the atria of 1 week, 4 week and 8 week post-MI rats, and compared them to paired Sham-groups. We observed no change in the expression level of phosphorylated-p38 at any time-point following MI (Figure 3A). However, there was a 3-fold increase of phosphorylated-ERK1/2 at 1 week post-MI compared to paired sham values (Figure 3B). The expression of phosphorylated-ERK1/2 in MI rats returned to a level similar to the sham animals at 4 weeks and 8 weeks post-MI. Pro-Caspase-3 expression was elevated in 1 week post-MI versus sham (2.3-fold) rats and the level returned to values similar to sham values at 4- and 8-weeks post-MI (Figure 3C). Total ERK1/2 expression levels were also elevated in 1 week post-MI versus sham (1.5-fold) and returned to comparable values in the 3 groups thereafter (Figure 3D). Total p38 expression level was unchanged at any time-point (Figure 3E). Examples of gels obtained from the 1-week post-surgery group for each protein studied are shown in Figure 4.

miR21 expression

As we planned to treat animals with miR21 knockdown probe for prevention of atrial tissue fibrosis, we decided to first assess whether miR21/sprouty-1/ERK1/2 signaling pathway was affected at the time-point where a significant changed occurred in atrial

connective tissue content. Real-Time PCR was used to compare miR-21 expression in left atria between 2 weeks post myocardial infarction and the paired Shams. MI resulted in a 2.5 fold increase in the expression level of miR21 compared to the expression level in sham animals (figure 5). Tissue samples were also obtained at 1, 4 and 8 weeks and will shortly be analyzed to complete the time-course analysis for mir21 expression.

Sprouty 1, collagen 1a and collagen IIIa expression

Real-Time PCR was used to compare mRNA expression levels of sprouty 1, the putative target of miR21, as well as relevant collagen Ia and IIIa genes, between 2 weeks post-myocardial infarction and the paired Shams, in the left atria. MI induced a 2.8-fold decrease in sprouty 1 expression. In agreement with histological data indicating a strong increase in connective tissue content at 2 weeks post-MI, we observed a 2.8-fold increase in collagen Ia and a 3.6-fold collagen IIIa expression increase in MI animals compared to the Shams.

Mir21 knockdown studies

Our experimental data point to a central role for mir21 in fibrosis development. We therefore aimed to knock down mir21 by injecting mir21 anti-oligomer (AMO) into rat atria at the time of acute MI induction and comparing the findings with those in sham rats and rats receiving scrambled AMO-sequences (scAMO). We first conducted dose-response studies to establish effective doses of AMO. The results are shown in Figure 7 and suggest that AMO doses somewhere between 20 and 50 µg produce effective and specific mir21 knockdown. We then injected a series of 60 rats with AMO and scAMO. Injected rats were submitted to LAD ligation or Sham procedures and kept for 2 or 8 week analysis. There were no statistically-significant differences in AF duration between MI and Sham rats, treated with AMO or scAMO, 2 weeks after surgery, consistent with our previous data (see above) showing lack of statistically-significant AF-promotion at 2 weeks. miR21 quantification by Real-Time PCR suggests AMO treatment efficiency to lower miR21 levels in MI rats, to values comparable to sham values, as opposed to scAMO (Figure 8). The rats injected with the 30 µg AMO dose showed no protection against AF at 8 weeks, with a mean AF duration of 1200 s. We had logistical problems

completing our studies because our animal care facility was moved at the time of our experiments and have so far been able to complete only one rat with 50 µg AMO, but this rat had only very brief AF, lasting 48 s. Ongoing studies will resolve the issue of whether AMO injection at doses adequate to return mir21 levels to control (sham rat) values will prevent AF and atrial fibrosis.

Discussion

In this study, we described atrial electrophysiological and structural remodeling, in a rat model of myocardial-induced heart failure. We observed atrial structural (dilation and fibrosis) and cell signalling alterations in post-myocardial infarction versus Sham rats, which may be responsible for increased atrial fibrillation duration.

Changes in ventricular functions

Severe ventricular myocardial infarction in patients induces ventricular functions alterations and heart failure development (Tiyyagura and Pinney, 2006). Transthoracic echocardiography reports in clinical and animal studies show left ventricular enlargement associated with ischemic heart failure (White *et al.*, 1987; Pfeffer *et al.*, 1991; Rhode *et al.*, 1999). Rucker-Martin *et al.* (2006) reported left ventricular end-diastolic diameter in rats, 4 months post-myocardial infarction, compared to shams. In our study, we observed progressive ventricular systolic and diastolic enlargement from 2 weeks post-MI, worst at 8 weeks post-MI. Spinale *et al.* studied porcine CHF caused by pacing-induced supraventricular tachycardia (SVT) showed 56% decrease of the ventricular fractional shortening, along with 33% reduction in cardiomyocyte shortening velocity, 21 days after SVT initiation. Rhode *et al.* (1999) reported contraction abnormalities in mice, 4 days after myocardial infarction induction. In our study, we observed progressive fractional shortening decrease, from baseline to 2 weeks and 8 weeks post- surgery in MI but not in Sham group.

Pressure-sensitive catheter recording was previously used by Lapointe et al. (2002) to demonstrate impaired left ventricular emptying and altered contraction and relaxation, associated with left ventricular dysfunction, in 8-week post-MI rats. In our study, we showed these changes to occur 1 week after MI induction.

Changes in atrial function

Severe atrial dilation was demonstrated by echocardiography in ovine and canine model of ventricular tachypacing-induced heart failure (Power et al., 1998; Shi et al., 2001). In our rat model, atrial dilatation was already dramatic 2 weeks after MI induction and greatly extended 6 weeks later. Similar to Boixel et al. (2003), we observed a significant decrease of atrial fractional shortening in MI compared to Sham rats.

In a study from Rucker-Martin et al. (2006), 4 months post-MI rats follow-up for a 24 hour period by telemetry recording didn't show spontaneous atrial fibrillation events, but demonstrated P-wave and P-R interval increases, indicating atrial conduction disturbances. In our model, we observed induced atrial fibrillation prolongation in 8 week post-MI versus Sham rats. We also observed ERP prolongation, as previously described in a ventricular tachypacing (VTP) canine model of heart failure (Li et al., 1999).

Altered atrial structure

In a study by Boixel et al. (2003), extensive atrial tissue fibrosis was demonstrated in 3-month post-MI heart failure rats. In their study, they observed activation of proteolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family, which are known to play a crucial role in extracellular matrix homeostasis. In our study, we followed connective tissue changes over 8-weeks post-MI and demonstrated a significant increase 2 weeks after myocardial induction which remained stable thereafter.

Cell signalling alterations

In VTP-induced heart failure dogs, Li et al. (2001) showed increased atrial tissue fibrosis and atrial fibrillation maintenance. This study also showed significant up-regulation of phosphorylated-p38, -ERK1/2 and -JNK mitogen-activated protein kinases in left atria.

Treatment with enalapril attenuated fibrosis and decreased phosphorylated-ERK1/2 but not phosphorylated-p38 or -JNK. Tharaux *et al.* (2000) also showed that angiotensin II-induced increases in collagen I expression could involve ERK1/2 but not p38 MAP kinase in mice aorta. Rosenbrank (2004) described angiotensin II induced tissue fibrosis signalling pathways via the AT-1/TGF-beta/Smads activation network. Gao *et al.* demonstrated that angiotensin II treatment of fibroblasts activated ERK1/2 and TGF-beta cascades, while co-treatment with ERK1/2 inhibitor reduced the angiotensin II-induced TGF-beta/Smad cascade and collagen I protein expression. In the present study, we observed up-regulation of the phosphorylated -ERK1/2 but not -p38 MAP kinase, in the first weeks following MI induction. The phosphorylated-ERK1/2 expression level returned to sham values at 4 and 8 weeks post-MI. The phosphorylated-ERK1/2 expression level changes correlate with the development of changes in connective tissue content, which rapidly increased in the early phase of atrial remodeling, when the phosphorylated-ERK1/2 expression level was elevated, and remained stable (failing to increase further) at 4 and 8 weeks post-MI, when the phosphorylated -ERK1/2 expression levels returned to lower values.

Thum *et al.* (2008) showed up-regulation of miR21 in a transverse aortic constriction (TAC) model of heart failure. They also identified sprouty-1 as a target of miR21 and demonstrated sprouty-1 translational repression by miR-21, in transfected cardiac fibroblasts. miR-21 up-regulation was associated with down-regulation of sprouty-1 and up-regulation of phospho-ERK1/2 and interstitial fibrosis in left ventricle from TAC mice. In our study, we observed a significant increase in miR21 in 2 week post-MI rats, the time-point corresponding to the major change in atrial connective tissue content. At the same time-point, we observed significant down-regulation of sprouty-1, the miR-21 target, and up-regulation of collagen I a and collagen III a mRNAs. This suggests a potential role of the miR21/sprouty-1/ERK1/2 cascade in our model of atrial remodeling induced by heart failure condition.

Our results indicate that specific mir21 knockdown is feasible in the atria of rats with the use of injected AMOs and comparison with scAMOs. Preliminary data suggest that

mir21-AMO injection may prevent AF in post-MI rats. Final studies presently under way will clarify whether prevention of mir21-upregulation can prevent fibrosis and AF from developing.

References

- Bailey GW, Braniff BA, Hancock EW, Cohn KE. (1968)** Relation of left atrial pathology to atrial fibrillation in mitral valvular disease. *Ann Intern Med.* 69(1):13-20.
- Boixel C, Fontaine V, Rücker-Martin C, et al. (2003)** Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol.* 42(2):336-44.
- Burstein B, Comtois P, Michael G, et al. (2009)** Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res* 105: 1213-1222.
- Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, et al. (2003)** Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovascular Research* 60; 315– 325.
- Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. (2009)** miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor. Implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res.* 104:170 –178.
- Espira L, Czubryt MP. (2009)** Emerging concepts in cardiac matrix biology. *Can J Physiol Pharmacol.* 87(12):996-1008.
- Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, et al. (1997)** Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 96:1180– 1184.
- Fuster V et al. (2006)** ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients With Atrialthe Heart Rhythm Society Developed in Collaboration With the European Heart Rhythm Association and 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart. *Circulation.* 114: e257-354.
- Healey JS., Baranchuk A, Crystal E., et al. (2005)** Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 45: 1832-1839.

- Lapointe N, Blais C Jr, Adam A, et al. (2002)** Comparison of the effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vasopeptidase inhibitor after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol.* 39(10):1692-8.
- Li D, Shinagawa K, Pang Li, et al. (2001)** Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 104; 2608-2614.
- Moss E.G., Lee R.C., Ambros V. (1997).** The cold shock domain protein Lin-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88: 637-646.
- Ohtani K., Yutani C., Nagata S et al. (1995)** High Prevalence of Atrial Fibrosis in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *JACC* 25; 1162-1169.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. (1991)** Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 260(5 Pt 2):H1406-14.
- Porter K., Turner N.A. (2009)** Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology and Therapeutics* 123: 255-278.
- Power JM, Beacom GA, Alferness CA. (1998)** Susceptibility to atrial fibrillation: a study in an ovine model of pacing-induced early heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9:423-435.
- Rosenkranz S. (2004)** TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 63(3):423-32.
- Shi Y, Ducharme A, Li D, Gaspo R, Nattel S, Tardif J.-C.(2001)** Remodeling of atrial dimensions and emptying function in canine models of atrial fibrillation. *Cardiovascular Research* 52; 217-225.
- Spinale FG, Coker ML, Thomas CV. (1998)** Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res.* 82(4):482-95.
- Tiyyagura SR, Pinney SP. (2006)** Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt Sinai J Med.* 73(6):840-51.
- Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. (2000)** Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension.* 36(3):330-6.

Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008 456(7224):980-4.

van Rooij E, Olson EN. (2009) Searching for miR-acles in cardiac fibrosis. *Circ Res* 104(2):138-40.

Wattigney WA, Mensah GA, Croft JB. (2003) Increasing trends in hospitalization for atrial fibrillation in the United States, 1985 through 1999: implications for primary prevention. *Circulation* 108(6):711-6.

Figure Legends

Figure 1. Atrial fibrillation recording in an 8 week post-MI rat induced by and S1-S2 protocol. Surface ECG, endocavitary ECG and stimuli artefacts were recorded simultaneously.

Figure 2. Histological analysis. (A-D) Examples of left atrial tissue sections from sham, and (E-H) MI rats. Sections are from rats 1 week (A,E), 2 weeks (B,F), 4 weeks (C,G) and 8 weeks (D,H) post-surgery. Connective tissue content quantification (I). Data are expressed as mean percentage area $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$ versus sham from same time-point.

Figure 3. Expression level of proteins extracted from atria, expressed as mean $\pm$ SEM. Expression of phosphorylated-p38 (A), phosphorylated ERK1/2 (B), pro-caspase-3 (C), total p38 (D) and total ERK1/2 (E) normalised to GAPDH. (n=4) * $P < 0.05$ versus sham from same time-point.

Figure 4. Examples of original gels from 1 week post-surgery rats. S:Sham, M: MI.

Figure 5. Expression of miR21 2 weeks-post MI, normalised to the reference gene snU6. Data from Real-Time PCR, expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=4) * $P < 0.05$ versus sham

Figure 6. Expression of (A) sprouty1, (B) collagen Ia and (C) collagen IIIa at 2 weeks-post MI, normalised to the reference gene β 2-microglobulin. Data from Real-Time PCR, expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=4) * $P < 0.05$ versus sham, ** $P < 0.01$ versus sham.

Figure 7. Preliminary expression data for miR21, in left atria from normal rats, 5 days after injection of knock-down miR21 probe (AMO) or scrambled-miR21 probe (scAMO) at 20 μ g, 30 μ g or 50 μ g doses, normalised to the reference gene snU6.

Figure 8. Preliminary expression data for miR21 in left atria, 2 weeks after injection of knock-down miR21 probe (KD-21) or scrambled-miR21 probe (sc), in Sham and MI rats, at 30 μ g or 50 μ g doses, normalised to the reference gene snU6. Note the substantial increase in mir21 expression with MI in the scAMO-injected rat and its dose-dependent attenuation by AMO.

Table 1. Echocardiographic Findings

		Baseline	2 wks	8 wks
WMSI	Sham	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	MI	1.00±0.00	1.92±0.32* ξ	2.22±0.15* ξ
LV Structural & Functional Remodeling				
LVDd (mm)	Sham	7.15±0.48	8.12±0.72	7.65±0.41
	MI	7.12±0.36	10.60±0.25* ξ	11.33±0.84* ξ
LVDs (mm)	Sham	3.34±0.32	3.63±0.79	2.98±0.43
	MI	3.44±0.40	8.71±0.41* ξ	10.26±0.82* ξ †
%FS	Sham	53.3±2.0	55.6±5.9	61.1±4.7
	MI	51.7±4.1	17.9±2.4* ξ	9.5±2.1* ξ †
PWV (cm/s)	Sham	3.20±0.38	3.57±1.07	4.17±1.17
	MI	3.14±0.49	1.91±0.94* ξ	1.34±0.21* ξ †
RWT (%)	Sham	34.8±5.2	42.3±4.9	41.1±3.2
	MI	36.3±2.1	24.7±5.0* ξ	16.6±5.6* ξ †
LVAd (mm ²)	Sham	34.7±4.7	46.9±3.6	42.6±8.3
	MI	36.6±3.8	78.9±9.8* ξ	106.7±11.3* ξ †
LVAs (mm ²)	Sham	7.6±2.3	8.7±1.9	6.4±2.4
	MI	9.4±2.6	53.6±8.9* ξ	78.3±9.1* ξ †
FAC (%)	Sham	78.2±5.2	81.6±3.5	85.2±3.2
	MI	74.3±6.9	32.3±4.2* ξ	26.4±6.5* ξ †
E Velocity (cm/s)	Sham	97.6±7.6	109.8±13.2	96.9±9.7
	MI	96.3±13.6	91.7±17.8	94.7±20.0
E/Em lateral	Sham	17.6±4.2	13.4±4.0	16.2±8.1
	MI	17.1±3.3	39.6±19.8* ξ	51.6±19.0* ξ †
E/Em Septal	Sham	15.7±2.2	9.7±2.5	14.9±4.3
	MI	18.7±3.9	35.4±16.1* ξ	51.7±18.8* ξ †
MPI (%)	Sham	35.5±12.2	25.7±18.1	34.3±24.6
	MI	36.5±5.7	63.4±39.9* ξ	102.7±24.0* ξ †
Bi-Atrial Structural & Functional Remodeling				
LADd (mm)	Sham	3.44±0.67	3.75±0.82	3.09±0.67
	MI	3.22±0.36	5.03±0.74* ξ	7.62±0.85* ξ †
LADs (mm)	Sham	4.83±0.71	5.28±0.71	4.65±0.86
	MI	4.69±0.30	6.78±0.55* ξ	8.72±1.17* ξ †
%FS	Sham	29.0±4.4	29.5±6.7	33.7±3.3
	MI	31.4±5.1	26.1±5.1* ξ	12.3±4.7* ξ †
LAAd (mm ²)	Sham	10.4±2.3	12.0±0.4	14.2±3.6
	MI	11.7±2.1	21.4±7.9* ξ	39.8±7.6* ξ †
LAAs (mm ²)	Sham	22.9±3.1	29.0±1.2	27.2±7.4
	MI	21.7±3.2	35.8±7.6* ξ	45.7±6.0* ξ †
FAC (%)	Sham	54.1±8.3	58.7±1.9	47.5±3.9
	MI	46.3±5.3	40.2±18.1* ξ	13.6±7.9* ξ †
RAD (mm)	Sham	4.81±0.44	6.35±0.12*	4.85±0.54
	MI	4.95±0.73	6.52±0.81*	6.82±1.02* ξ

* : p<0.05 for vs Baseline ; ξ : p<0.05 vs Sham; † : p<0.05 for 2 vs 8 wks.

	1 week		2 weeks		4 weeks		8 weeks	
	Sham	MI	Sham	MI	Sham	MI	Sham	MI
LV	Systolic (mmHg)	103 ± 10	88 ± 9*	91 ± 8	90 ± 9	93 ± 8	98 ± 18	86 ± 7
	Diastolic (mmHg)	-2 ± 1	13 ± 6**	-2 ± 1	12 ± 4**	14 ± 5**	-1 ± 1	12 ± 4**
	End-Diastolic (mmHg)	3 ± 2	22 ± 7**	3 ± 1	21 ± 6**	26 ± 4**	4 ± 2	21 ± 3**
	dP/dt max (mmHg/s)	5375 ± 597	3912 ± 520**	5296 ± 440	4258 ± 521*	3959 ± 550*	4957 ± 866	3594 ± 508**
	dP/dt min (mmHg/s)	-4654 ± 523	-2977 ± 374**	-4126 ± 424	-3013 ± 297**	-2967 ± 443**	-4296 ± 836	-2804 ± 339*
RV	Systolic (mmHg)	25 ± 3	35 ± 8	23 ± 2	38 ± 8**	47 ± 9**	25 ± 3	42 ± 8*
	Diastolic (mmHg)	-3 ± 1	0 ± 2*	-1 ± 2	1 ± 2	5 ± 3*	-1 ± 2	1 ± 1**
	dP/dt max (mmHg/s)	1398 ± 160	1547 ± 285	1217 ± 125	1602 ± 242*	1685 ± 420*	1119 ± 129	1709 ± 310*
	dP/dt min (mmHg/s)	-1109 ± 149	-1218 ± 204**	-953 ± 111	-1356 ± 201**	-1386 ± 412	-1065 ± 58	-1301 ± 289

Table 2. Hemodynamic measurements. Data are mean ± S.E.M.

*P<0.05 , **P<0.01 versus sham at same time-point.

	2 weeks		4 weeks		8 weeks	
	Sham (n=5)	MI (n=12)	Sham (n=12)	MI (n=15)	Sham (n=12)	MI (n=15)
AERP ₁₀₀ (ms)	39 ± 6	53 ± 5**	41 ± 4	48 ± 6**	41 ± 4	59 ± 11**
AERP _{rr-20} (ms)	39 ± 7	54 ± 5**	43 ± 4	50 ± 7*	40 ± 3	58 ± 10**
SNRTC ₁₀₀ (ms)	39 ± 4	42 ± 22	40 ± 19	38 ± 32	36 ± 8	31 ± 20
SNRTC ₈₀ (ms)	30 ± 14	31 ± 14	35 ± 15	17 ± 11	30 ± 11	25 ± 15
WCL (ms)	129 ± 17	156 ± 19*	144 ± 19	151 ± 19	137 ± 11	161 ± 17**
Mean AF duration (s)	1 ± 1	51 ± 60	19 ± 25	231 ± 360	2 ± 1	424 ± 474**
Maximale AF duration (s)	5 ± 4	315 ± 430	57 ± 77	512 ± 786	3 ± 2	1203 ± 1447**

Table3. Electrophysiological parameters, mean ± S.E.M.

*P< 0.05 , **P< 0.01 versus sham at same time-point

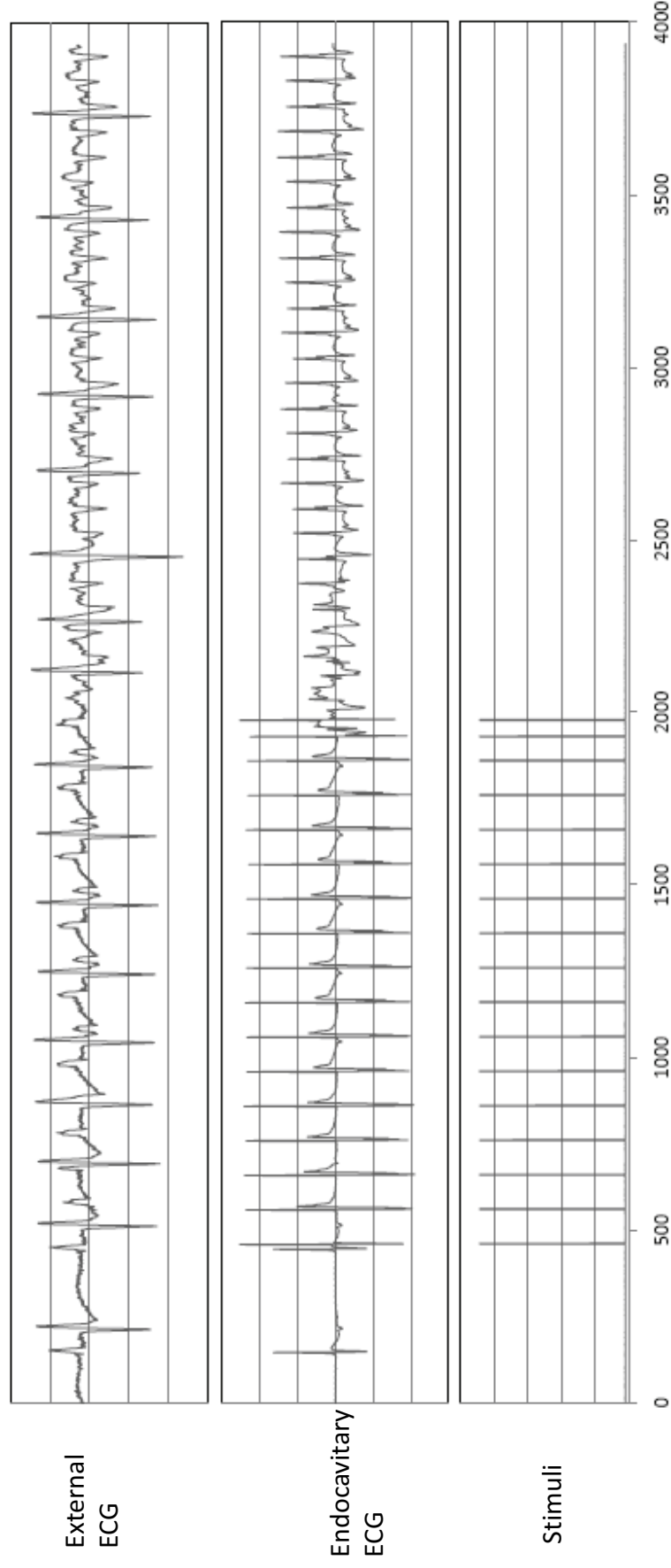


Figure 1. Atrial fibrillation recording in an 8 week post-MI rat induced by and S1-S2 protocol. Surface ECG, endocavitary ECG and stimuli artefacts were recorded simultaneously.

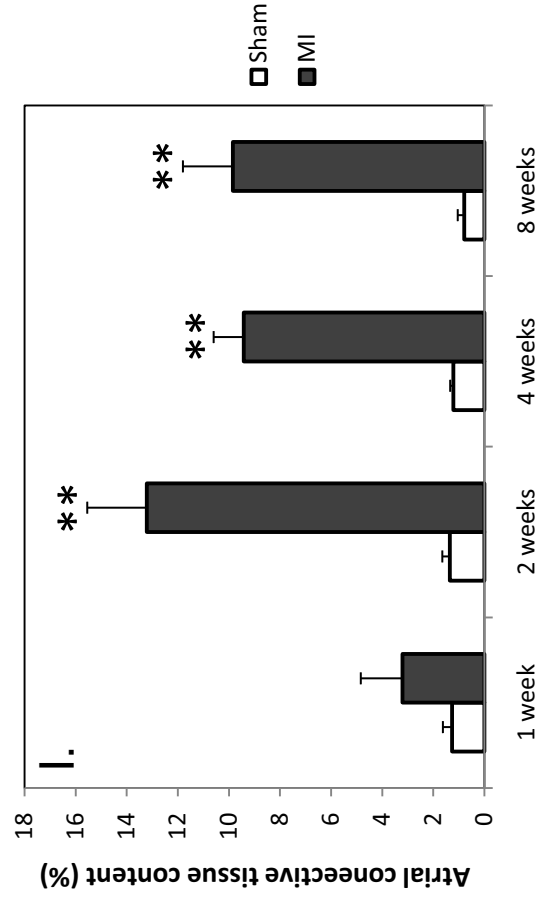
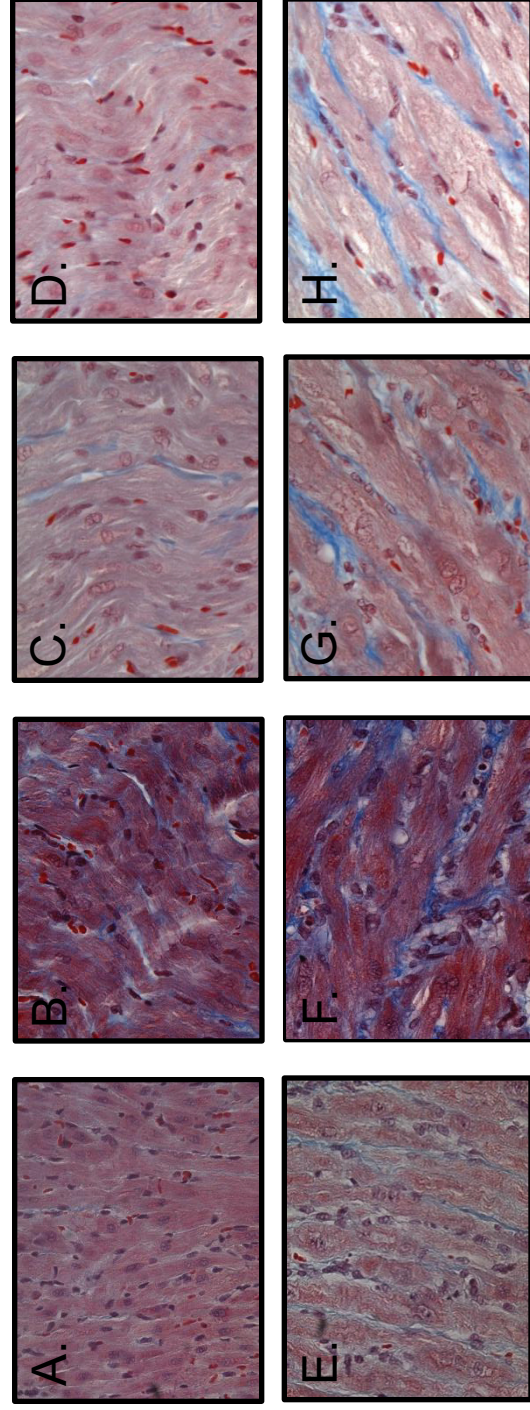


Figure 2. Histological analysis. (A-D) Examples of left atrial tissue sections from sham, and (E-H) MI rats. Sections are from rats 1 week (A,E), 2 weeks (B,F), 4 weeks (C,G) and 8 weeks (D,H) post-surgery. Connective tissue content quantification (I). Data are expressed as mean percentage area $\pm$ SEM. $**P < 0.01$ versus sham from same time-point.

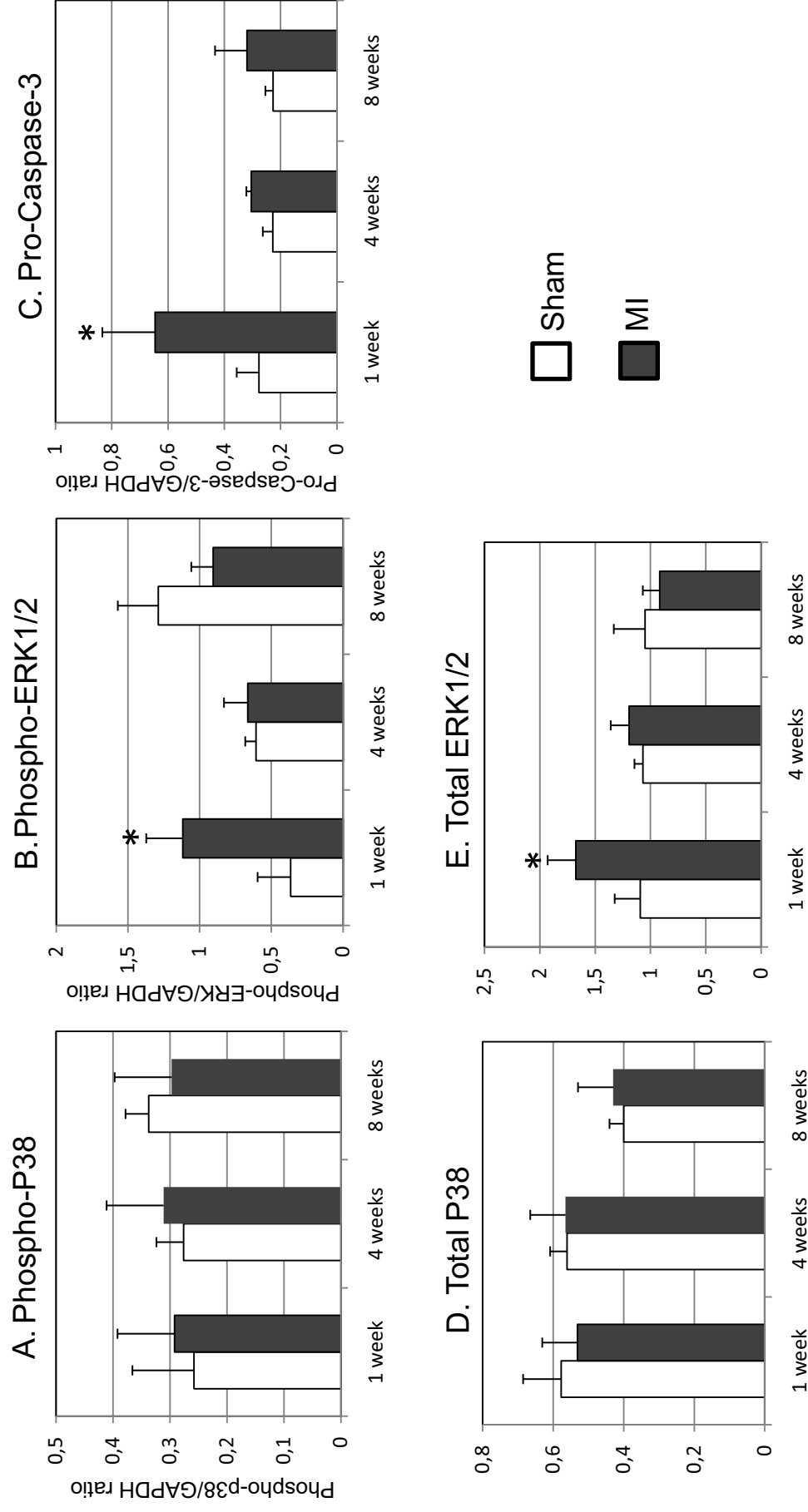


Figure 3. Expression level of proteins extracted from atria, expressed as mean $\pm$ SEM. Expression of phosphorylated-p38 (A), phosphorylated ERK1/2 (B), pro-caspase-3 (C), total p38 (D) and total ERK1/2 (E) normalised to GAPDH. (n=4) *P< 0.05 versus sham from same time-point.

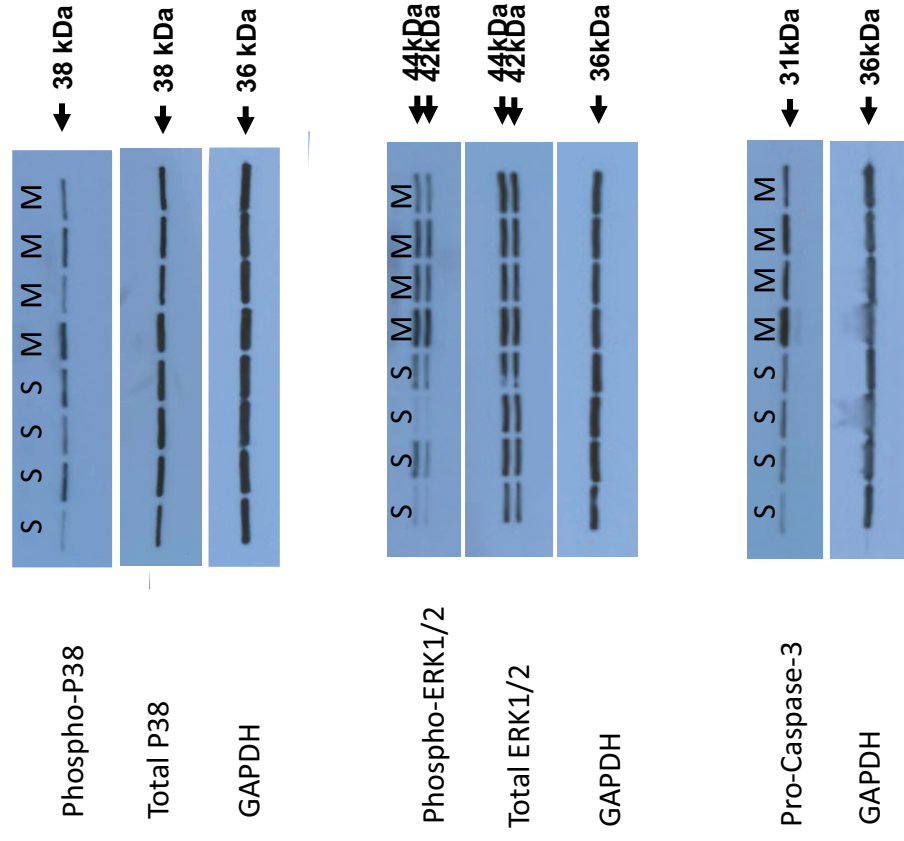


Figure 4. Examples of original gels from 1 week post-surgery rats. **S:**Sham, **M:** Ml.

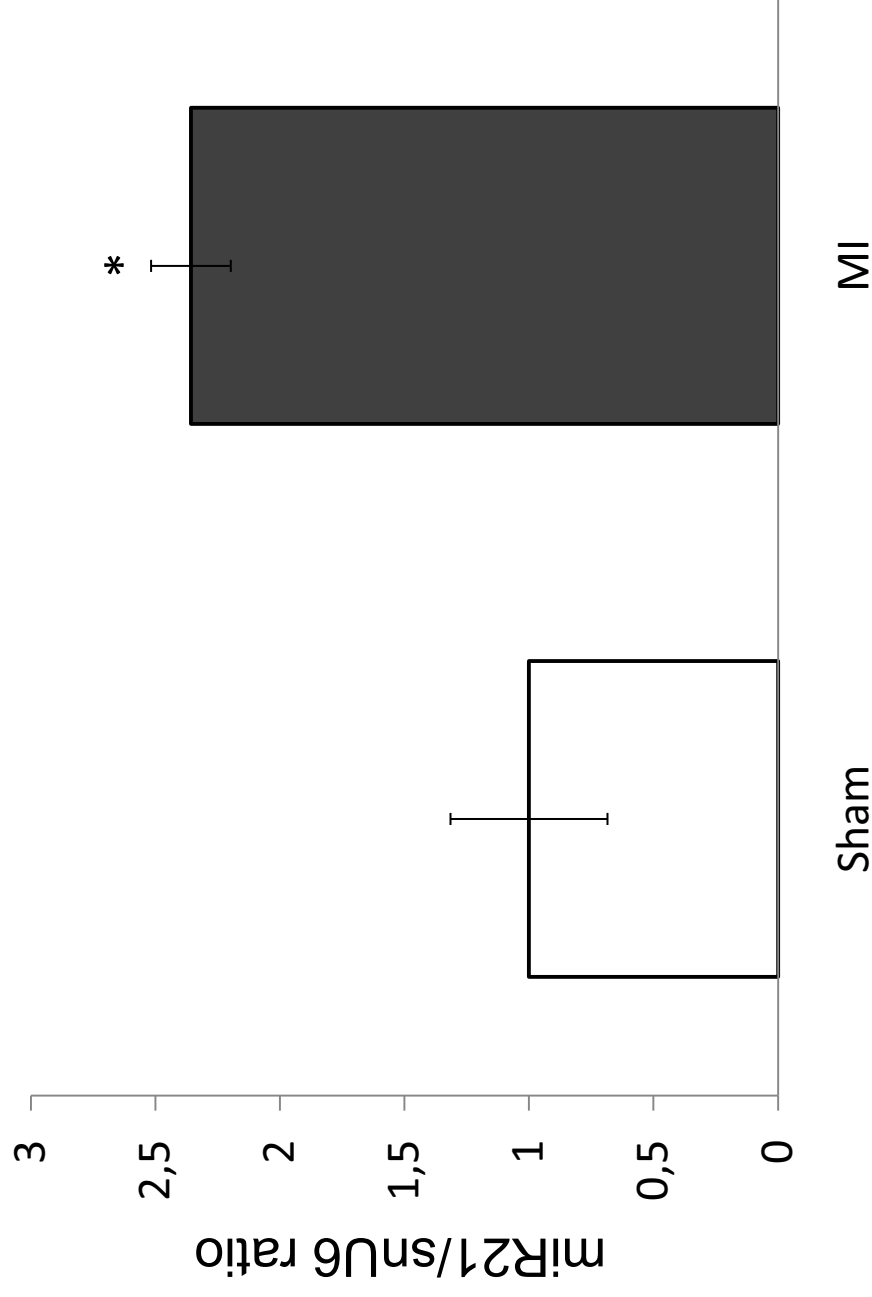


Figure 5. Expression of miR21 2 weeks-post MI, normalised to the reference gene snU6. Data from Real-Time PCR, expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=4) *P< 0.05 versus sham

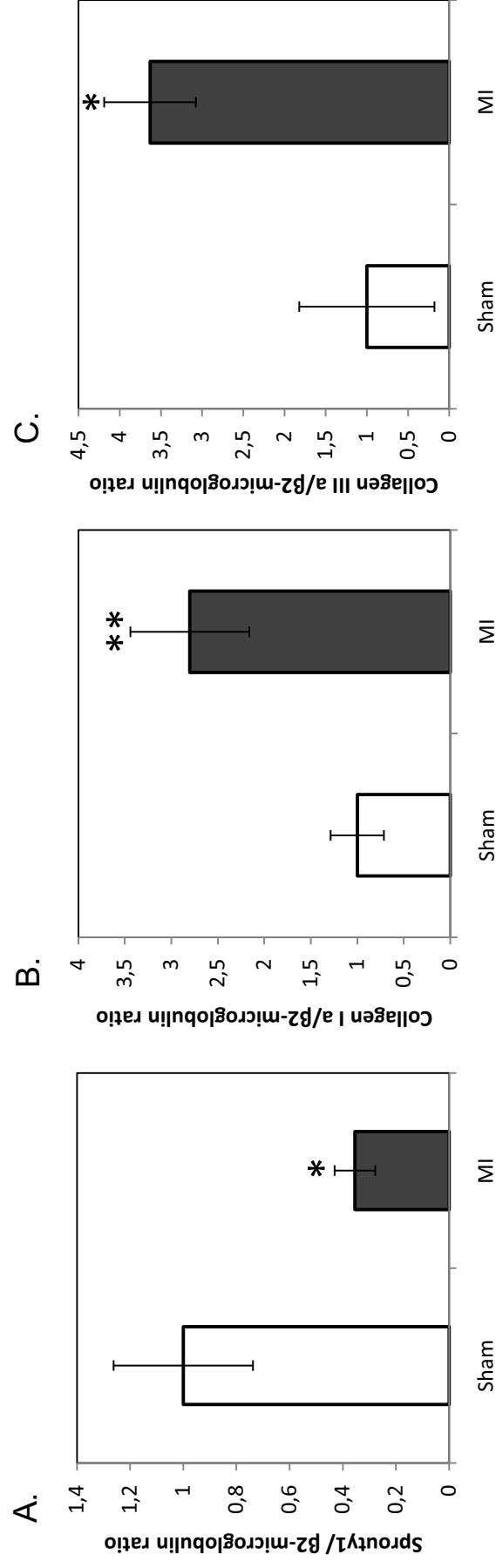


Figure 6. Expression of (A) *sprouty1*, (B) collagen Ia and (C) collagen IIIa at 2 weeks-post MI, normalised to the reference gene $\beta 2$ -microglobulin. Data from Real-Time PCR, expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=4) *P< 0.05 versus sham, **P< 0.01 versus sham

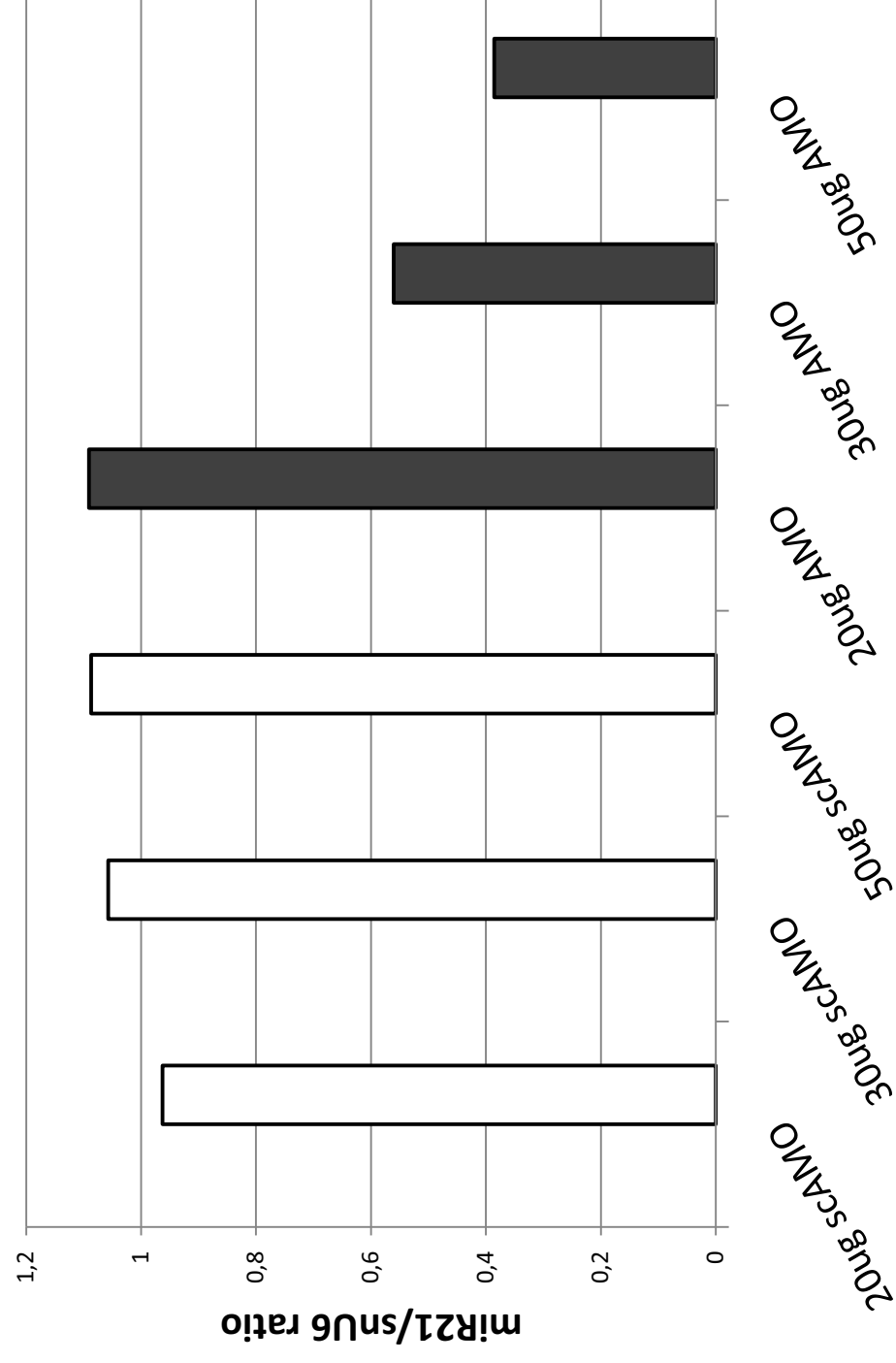


Figure 7. Preliminary expression data for miR21, in left atria from normal rats, 5 days after injection of knock-down miR21 probe (AMO) or scrambled-miR21 probe (scAMO) at 20 µg, 30 µg or 50 µg doses, normalised to the reference gene snU6.

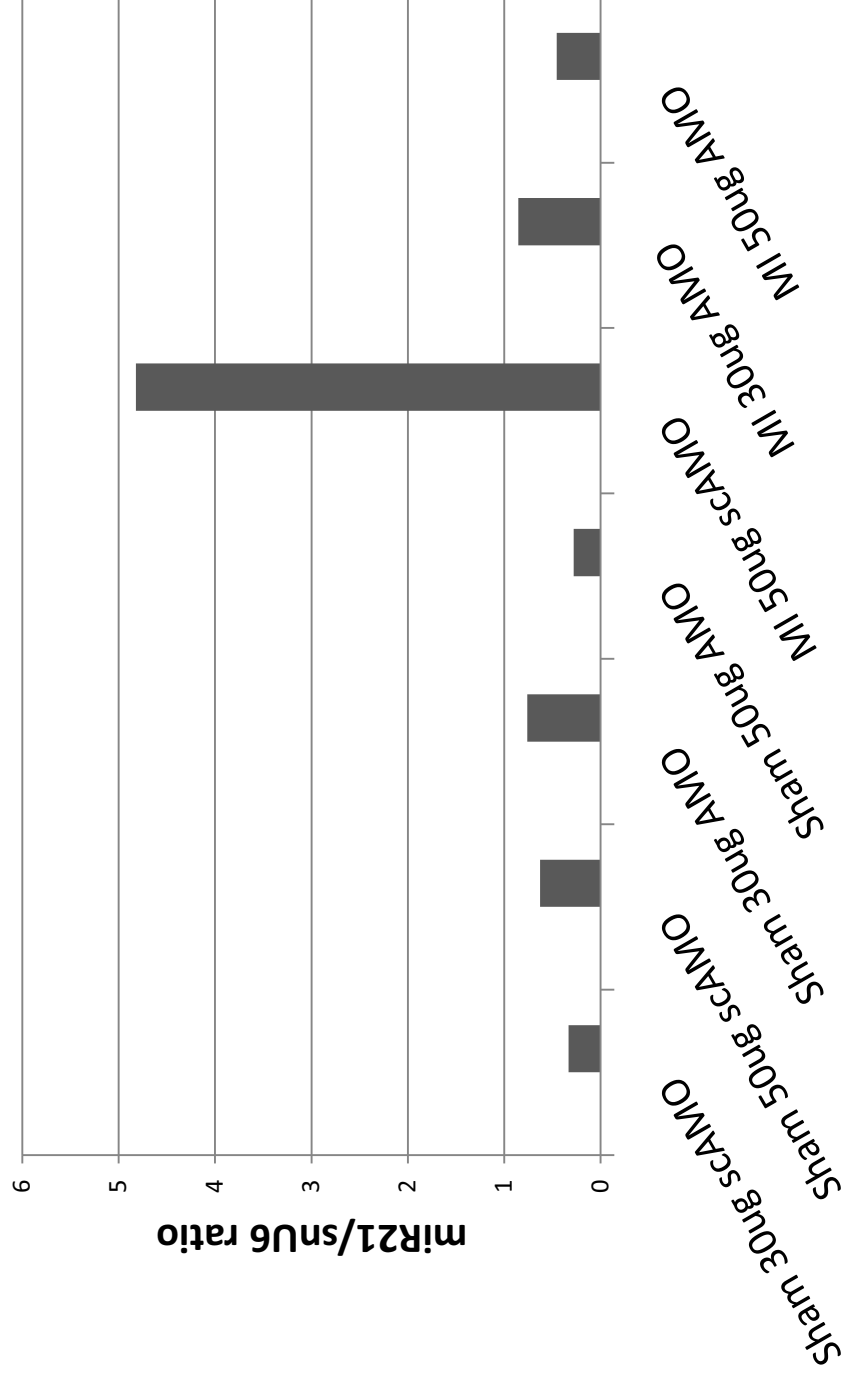


Figure 8. Preliminary expression data for miR21 in left atria, 2 weeks after injection of knock-down miR21 probe (KD-21) or scrambled-miR21 probe (sc), in Sham and MI rats, at 30 μ g or 50 μ g doses, normalised to the reference gene snU6. Note the substantial increase in miR21 expression with MI in the scAMO-injected rat and its dose-dependent attenuation by AMO.

Chapître 7. Discussion

Chapître 7. Discussion Générale

Cette thèse est basée sur les résultats de deux articles publiés, un article en correction et un article en préparation.

7.1 Sommaire des éléments nouveaux apportés par les travaux inclus dans cette thèse.

Dans le chapitre 2, nous avons présenté une étude portant sur le profil d'expression génique dans deux modèles canins de fibrillation auriculaire. Nos résultats mettent en évidence la différence marquée existante entre ces 2 types de remodelage auriculaire et démontrent une évolution temporelle de ces changements. Il s'agit de la première analyse génomique de 2 mécanismes distincts sous jacents à la fibrillation atriale. Ceci a permis de mettre en évidence les bases moléculaires de la physiopathologie associée à cette arythmie. L'analyse plus détaillée des gènes reliés à la synthèse de la matrice extracellulaire a mis en évidence le CTGF comme facteur pouvant jouer un rôle clé dans le processus de développement de la fibrose interstitielle. Nos travaux ont préparé le terrain pour d'autres chercheurs qui nous ont succédé. Récemment, une étude génomique a montré une augmentation de l'expression de CTGF dans l'oreillette gauche de patients souffrant de FA permanente comparativement aux patients en rythme sinusal (Adam et *al.*, 2010). Ils ont aussi montré par immunofluorescence que cette augmentation était davantage au niveau des cardiomyocytes que des fibroblastes, ce qui corrobore avec notre étude, effectuée sur des cardiomyocytes isolés. Une autre étude, effectuée sur des rats diabétiques, a aussi montré une association entre la fibrose interstitielle et la présence d'une quantité élevée de CTGF (Kato et *al.*, 2008). Il semble donc que le CTGF soit un élément important du remodelage auriculaire, agissant comme un médiateur de la fibrose interstitielle.

Dans le chapitre 3, nous avons présenté l'étude portant sur la différence entre le remodelage auriculaire et ventriculaire induits par l'insuffisance

cardiaque, au niveau de l'expression génomique. Nos résultats ont montré une différence marquée entre le remodelage auriculaire et le remodelage ventriculaire survenant au cours de l'insuffisance cardiaque. Nos résultats suggèrent que ce remodelage soit évolutif avec le développement de la pathologie sous-jacente. Ils suggèrent aussi une altération de certains gènes spécifiques aux chambres cardiaques. Finalement, l'analyse de différents groupes fonctionnels comportant plusieurs gènes dont le niveau d'expression était altérée par la pathologie, ont mis en évidence l'implication de voies de signalisation telles que l'apoptose, le système ubiquitine/protéasome, les MAP kinases, dans le processus de remodelage auriculaire. Au niveau ventriculaire, les voies de signalisation qui semblaient davantage impliquées étaient reliées au métabolisme. Ces études ont révélé la physiopathologie moléculaire sous-jacente aux différences structurelles et cellulaires que nous avons mise en évidence dans une étude précédente (Hanna et *al.*, 2004).

Dans le chapitre 4, nous avons présenté nos résultats relatifs aux changements obtenus par des approches protéomique et métabolomique, survenant au cours du remodelage auriculaire pro-arythmogénique induit par l'insuffisance cardiaque. Cette étude décrit de façon détaillée l'altération de l'expression protéique et la synthèse de métabolites au cours du remodelage auriculaire évolutif. Les changements observés mettent en évidence le stress oxydatif ainsi que les changements protéiques reliés à la structure et à la contractilité des cellules cardiaques comme des éléments importants du remodelage auriculaire. Il s'agit de la première étude compréhensive des changements dans les protéines atriales associées avec la fibrillation atriale et fait sortir l'importance des changements métaboliques dans la physiopathologie de la FA.

Dans le chapitre 5, nous avons présenté les résultats d'une étude en cours, non complétée, mais suffisamment avancée pour nous révéler l'implication de miR-21 dans le processus de remodelage auriculaire induite par

l'insuffisance cardiaque. Dans cette étude, nous avons décrit le processus évolutif de remodelage auriculaire subséquent à un infarctus du myocarde sévère chez le rat. Les changements électrophysiologiques, hémodynamiques, et histopathologiques évoluent avec l'altération des fonctions cardiaques, étudiées par échocardiographie trans-thoracique. L'augmentation de miR-21 ainsi que de l'expression de ERK1/2 phosphorylé qui est une cible importante de miR-21, observé dans ce modèle, pourraient être reliés à la prolifération et à la croissance des fibroblastes et devraient être considérés comme cible thérapeutique pour la prévention de la fibrose et conséquemment de la fibrillation auriculaire.

7.2 Signification des résultats et contribution aux connaissances scientifiques.

Nos études génomiques ont été effectuées sur des modèles bien caractérisés de fibrillation auriculaire. Contrairement aux études cliniques (Ohki et *al.*, 2005; Kim et *al.*, 2003), qui sont restrictives en termes de quantité de tissu disponible et en terme de maladie cardiaque, d'âge et de traitement médicamenteux variables, l'utilisation de modèles animaux nous a permis le contrôle de l'absence d'un traitement pharmacologique ou de pathologies sous-jacentes (ex. : diabète, hypertension, valvulopathies), lesquels pourraient altérer les résultats. En effet, une étude du transcriptome chez des patients souffrant de FA avec une pathologie sous-jacente comparés à des patients pairés, sans FA, mais avec la pathologie, a montré que près de 2/3 des changements observés étaient reliés à la pathologie sous-jacente plutôt qu'à la FA elle-même (Lamirault et *al.*, 2006). Cela nous a permis également de décrire les changements de façon évolutive, avec un contrôle précis des périodes de temps étudiées. Nos études, les premières effectuées avec une approche compréhensive dans un modèle animal de la FA, ont permis de mieux comprendre les analyses génomiques effectuées chez les patients atteints de la FA (Barth et *al.*, 2005; Kim et *al.*, 2003; Lai et *al.*, 2004).

Nos études ont été effectuées sur des cardiomyocytes isolés afin de comprendre spécifiquement l'effet de la tachycardie ou de l'insuffisance cardiaque sur ce type cellulaire et d'éviter de voiler cet effet par la présence potentielle de réponses opposées dans les autres types cellulaires (notamment les fibroblastes). Il s'agit de la première étude génomique dans la FA qui s'est limitée à une population cellulaire purifiée, ce qui a beaucoup augmenté la puissance de notre analyse.

L'utilisation de technologies à large spectre nous a permis d'étudier les changements coordonnés d'une série de gènes et de percevoir la réponse globale des cardiomyocytes dans le cadre du remodelage auriculaire et du remodelage ventriculaire induit par une TA ou par le développement d'insuffisance cardiaque. Cela nous a également permis une recherche non-biaisée de joueurs clés dans les mécanismes de remodelage auriculaire et ventriculaire.

Bien qu'une variation du niveau d'ARNm ne se reflète pas nécessairement toujours de façon directement proportionnelle ($\text{ARNm} \times 2 \neq \text{protéine} \times 2$), nous avons démontré que plusieurs des changements observés au niveau de l'expression de l'ARN étaient aussi présents au niveau de l'expression des protéines, avec une bonne ressemblance au niveau de la direction des changements (baisse ou hausse du niveau d'expression) et de la discrimination statistique (statistiquement différent ou non du groupe contrôle).

7.2.1 Mécanismes de remodelage auriculaire induits par tachycardie auriculaire.

Les études électrophysiologiques portant le remodelage auriculaire induit par tachycardie auriculaire (TA), dans les différents modèles animaux, sont principalement axées sur deux volets. D'une part, au point de vue *in vivo*, il a été clairement démontré dans les différents modèles, que la tachycardie auriculaire entraînait un changement des propriétés électrophysiologiques (diminution de la

vélocité de conduction, raccourcissement et hétérogénéité des ERPs, diminution de l'adaptation de la durée des périodes réfractaires au rythme et augmentation de l'inductibilité de la FA) (Wiffjels et *al.*, 1995; Fareh et *al.*, 1998; Anné et *al.*, 2007). D'autre part, les études sur tissus ou cellules isolées ont montré un raccourcissement de la durée du potentiel d'action, relié à une altération de différents courants ioniques dont I_{to} , I_{Na} et I_{Ca-L} (Gaspo et *al.*, 1997; Yue et *al.*, 1997). Outre le remodelage ionique, quelques études ont montré des changements structuraux ou ultra-structuraux induits par la TA. Cependant, la plupart de ces changements ont été relié à certains symptômes associés à la FA (ex. : hypocontractilité atriale, hypercoagulabilité), plutôt que considérés comme éléments pro-arythmiques du remodelage auriculaire (Ausma et *al.*, 2001).

Dans notre étude portant sur la génomique de deux modèles canins de fibrillation auriculaire, le nombre de gènes altérés par la TA s'est avéré restreint. L'absence de changements d'expression de gènes reliés à la matrice extracellulaire, dans le groupe soumis à une semaine de TA et le faible nombre de changements dans le groupe soumis à 24 heures de TA, est concordant avec la notion selon laquelle la tachycardie auriculaire n'influerait que faiblement sur les propriétés de la matrice extracellulaire et que le cœur s'adapte bien au stress induit par une tachycardie atriale, sans être obligé d'invoquer les changements majeurs sur le plan de l'expression génique.

L'absence d'un grand nombre de changements dans la classe fonctionnelle « *transport* » ne semble pas refléter les nombreux changements de courants ioniques observés, décrits plus haut, qui sont caractéristiques des différents modèles de TA. Ceci pourrait s'expliquer par une absence de changements des canaux ioniques impliqués au niveau transcriptionnel et/ou de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des ARN messagers codant pour ces canaux ioniques. Cette hypothèse serait cependant en opposition avec les résultats de certaines publications, qui suggèrent notamment une diminution des ARN messagers codant pour $Ca_v1.2$, $Kv4.3$ et la sous-unité α du courant Na^+

dans le modèle (Yue et *al.*, 1997; Yue et *al.*, 1999; Gaspo et *al.*, 1997). Il se pourrait aussi que le niveau d'expression de certains ARN messagers codant pour des canaux ioniques soit relativement faible. Ainsi, bien qu'un faible changement de la quantité d'ARN messenger codant pour ces canaux affecterait l'expression des protéines formant ces canaux ainsi que la densité de courants générés par ceux-ci, il serait difficile de détecter ce changement à l'aide de technologies à large spectre (micropuces d'ADN). En effet, ce type de technologie ne permet pas de distinguer une faible variation de la quantité d'ARN messenger du bruit de fond, lequel est relativement élevé. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer pourquoi les ARN messagers codant pour certains canaux ioniques n'étaient pas détectés par les micropuces d'ADN, les transcrits étant alors considérés absents (Résultats non présentés).

Nos résultats ont montré que le nombre de gènes affectés par la tachycardie auriculaire décroissait avec l'augmentation de la durée du traitement. En effet, la tachycardie auriculaire induite pendant 24 heures a entraîné un changement d'expression de 242 gènes, alors que qu'une période de 1 semaine a entraîné le changement d'expression de 87 gènes. Finalement, l'expression d'aucun gène détecté par les micropuces d'ADN n'était affectée suite à une période de 6 semaines de TA. Cette régression du nombre de gènes montrant un changement d'expression avec la prolongation de la durée des épisodes de TA pourrait suggérer une adaptation au stress. Ce résultat est cohérent avec la notion que cette forme de remodelage représente une réponse adaptative au niveau cellulaire (Dispersyn et *al.*, 1999; Ausma et *al.*, 2000).

White et *al.* ont montré que suite à l'induction d'une fibrillation auriculaire ou d'une tachycardie auriculaire survenait une augmentation rapide du flot sanguin coronaire et de la consommation d'oxygène au niveau auriculaire (White et *al.*, 1982). Ausma et *al.* ont montré une diminution transitoire importante de phosphocréatine, une source de haute énergie, au cours de la première semaine de FA, suivit d'un retour à un niveau contrôle dans les semaines subséquentes

(Ausma et *al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que l'initiation d'un rythme auriculaire élevé entraîne un stress métabolique aigu, suivi d'une adaptation aux besoins à plus long terme. La forte demande métabolique initiale pourrait engendrer l'instauration d'un système d'économie d'énergie, incluant une baisse de la transcription et de la traduction, tel que décrit dans le phénomène d'hibernation (Barth et *al.*, 2005; Storey., 2003). Nos résultats montrent que l'effet maximal de la TA sur l'expression de gènes survenait après 24 heures et qu'il diminuait par la suite. De plus, la majorité des changements observés dans notre étude (94%) étaient des baisses d'expression, comparativement aux animaux contrôles. Ceci pourrait témoigner de la présence d'un mode d'économie d'énergie temporaire, jusqu'à ce que les cellules adaptent leurs fonctions métaboliques, leur permettant de retourner à une activité normale transcriptionnelle. Nos résultats supportent cette hypothèse, puisque le groupe fonctionnel le plus affecté par la tachycardie auriculaire est le groupe relié à la synthèse et à la dégradation de l'ADN et de l'ARN. De plus, la diminution d'expression de gènes tels que « activating transcription factor 3 delta Zip2 », « DNA-dependant RNA polymerase II », « Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter », « Nuclear RNA Helicase », des gènes directement impliqués dans la transcription et la traduction, semble aussi suggérer une répression transitoire de l'activité cellulaire transcriptionnelle et traductionnelle, potentiellement dans un but d'économie d'énergie.

7.2.2 Mécanismes de remodelage auriculaire induits par « tachycardiomyopathie ».

Comparativement au remodelage auriculaire induit par tachycardie auriculaire, l'évolution des changements impliqués dans le remodelage auriculaire induit par tachycardie ventriculaire (TV), mimiquant le syndrome clinique de « tachycardiomyopathie », suggère une variation complexe de gènes sur- et sous-exprimés après 24 heures et 2 semaines de tachy-stimulation. De

plus, la tachycardie ventriculaire semble affecter de façon prédominante l'expression des gènes des cardiomyocytes auriculaires (4785 gènes à 24 heure, 6284 gènes à 2 semaines) et de façon plus modérée l'expression des gènes au niveau ventriculaire (52 à 24 heures, 130 à 2 semaines; $Q < 5$).

Dans chacune des études de génomique, l'étude des classes fonctionnelles montre un grand nombre de gènes avec une altération du niveau d'expression, qui a permis de mettre en évidence des voies de signalisation cellulaire qui pourraient être impliquées dans le processus du remodelage auriculaire. Dans l'étude comparative des deux modèles canins de remodelage auriculaire, la voie de signalisation du CTGF est ressortie. Dans l'étude comparant le remodelage auriculaire et ventriculaire induits par tachycardie ventriculaire, nous avons ressorti quelques voies de signalisation, relatives à l'apoptose, à la cascade des MAP kinases, au système de dégradation des protéines par le système ubiquitine/proteasome et au métabolisme (glycolyse, beta-oxidation, cycle de Krebs, chaîne de transport des électrons).

7.2.2.1 Le CTGF et la fibrose interstitielle. Dans une étude antérieure, portant sur l'évolution temporelle des changements auriculaires survenant au cours du développement de l'insuffisance cardiaque, nous avons démontré une fibrose interstitielle auriculaire qui se développait après une semaine et qui était augmentée après 2 semaines de TV. La fibrose était absente chez les animaux qui n'était soumis qu'à 24 heures de TV (Cardin et *al.*, 2003). Les résultats de notre étude génomique suggèrent le changement d'expression d'un nombre importants de gènes reliés à la matrice extracellulaire, incluant notamment de nombreuses protéines de collagène, de la fibronectine, de la fibrilline et des enzymes impliqués dans la balance entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-2, TIMP-3). Ces changements surviendraient majoritairement après 2 semaines de TV, allant de paire avec l'augmentation de la fibrose interstitielle observée dans les études précédentes (Cardin et *al.*, 2003).

Dans une autre étude effectuée sur ce modèle, nous avons observé une augmentation de l'expression de TGF β , une cytokine pro-fibrotique, au niveau auriculaire (Hanna et *al.*, 2004). Nous avons également observé une augmentation de l'angiotensine tissulaire. Dans l'étude de génomique, la recherche de voies de signalisation modulées par la TV a fait ressortir la voie du CTGF. Le CTGF, est sur-exprimé notamment en présence d'angiotensine II et de TGF β (Iwanciw et *al.*, 2003). Le CTGF peut agir comme facteur pro-fibrotique en bloquant la boucle de rétro-inhibition de TGF β , prolongeant ainsi son effet (Wahab et *al.*, 2005). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans le développement de la fibrose interstitielle, un élément pro-arythmogénique important du remodelage auriculaire associé à l'insuffisance cardiaque. L'implication du CTGF et du TGF β a été démontré, dans le développement de la fibrose interstitielle survenant dans le remodelage auriculaire induit par l'insuffisance cardiaque ischémique chez la souris (Chuva de Sousa Lopes et *al.*, 2004). Notons que récemment, Panek et *al.* ont montré un rôle différent du CTGF exprimé par les cardiomyocytes, qui pourrait être plutôt impliqué dans l'hypertrophie (Panek et *al.*, 2009).

7.2.2.2 La voie de l'apoptose. Parmi les voies de signalisation étudiées, nous avons présenté la voie de signalisation de l'apoptose, que nous avons montré impliquée dans la phase précoce du remodelage auriculaire induit par la tachycardie ventriculaire lors d'une étude précédente (Cardin et *al.*, 2003). Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose sont étudiées dans l'analyse. Notons cependant que plusieurs gènes encodant pour des protéines de la famille bcl-2 (BID, BAK, BAD), quelques caspases (CASP7 et CASP9) ainsi que d'autres gènes de la voie extrinsèque (TRAFs, TRADD, FADD), n'étaient pas représentés sur les micropuces d'ADN. L'expression de gènes encodant pour plusieurs des caspases (CASP1, CASP3, CASP6, CASP8, CASP10), des membres de la famille bcl-2 (BAX, BCL2L2) et d'autres joueurs clés des voies de l'apoptose (cytochrome c, APAF-1) n'étaient pas affectés par la tachystimulation

ventriculaire. La caspase-4, majoritairement impliquée dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Liao et *al.*, 2008), ainsi que la calpaine-2, mais non la calpain-1, étaient augmentées après 24 heures et retourné au niveau contrôle après 2 semaines de tachycardie ventriculaire. Le gène codant pour BCL2L2, un membre anti-apoptotique de la famille des bcl-2, était augmenté après 2 semaines de tachycardie ventriculaire. Notre étude sur la caractérisation temporelle du remodelage auriculaire induit par TV avait précédemment montré une activation de la caspase-3, accompagnée d'un changement du ratio des niveaux des protéines Bax/Bcl-2, après 24 heures tachy-stimulation ventriculaire (Cardin et *al.*, 2003). Les valeurs d'activité de la caspase-3 ainsi que du ratio Bax/Bcl-2 étaient cependant redevenues similaires aux valeurs des animaux contrôles après une et deux semaines de TV, suggérant une activation précoce de l'apoptose, qui ne serait pas maintenue de façon chronique dans le processus de remodelage auriculaire induit par tachycardie ventriculaire. L'étude de génomique semble aussi montrer l'implication de l'apoptose dans la phase précoce de remodelage, mais non dans la phase tardive.

7.2.2.3 Le système ubiquitine/protéasome inclue deux étapes majeures, soit :1) l'attachement d'une chaîne polyubiquitine par un lien isopeptide à la protéine cible, in processus nommé ubiquitination et 2) la dégradation subséquente de la protéine ubiquitinée par le protéasome 26S (Glickman et *al.*, 2002). L'ubiquitination et la protéolyse par ce système sont ATP-dépendantes. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation de l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans l'ubiquitination et la protéolyse, après 24 heures de VTP. Par contre, chez les chiens 2 semaines VTP, nous avons observé un maintien du niveau élevé de plusieurs enzymes impliquées dans l'ubiquitination, mais une baisse d'expression d'enzymes impliquées dans la protéolyse. De façon similaire, Tsukamoto et *al.* (2006), ont constaté une accumulation de protéines ubiquitinées et une baisse de l'activité du protéasome, dans un modèle de souris avec insuffisance induite par surcharge de pression. L'inhibition du protéasome par MLN-273 était associé à une augmentation du stress oxydatif

dans les artères coronaires de cochons soumis à une diète riche en gras (Herrman et *al.*, 2007). L'accumulation de protéines polyubiquitinées, due à une baisse de l'activité protéolytique, a aussi été associée à une toxicité cellulaire dans certaines maladies neuro-dégénératives telles que le parkinson (Sun et *al.*, 2009).

7.2.2.4 La voie des MAP kinases. Nous avons également effectué une analyse de la voie de signalisation des MAP kinases, une voie comportant une cascade d'enzymes fortement impliqués dans la réponse à différents stress cellulaires. Nous avons constaté une augmentation de l'expression plusieurs enzymes impliquées dans les voies de signalisation de p38, de JNK et de ERK1/2. Nous avons notamment observé une augmentation de l'expression de MAPK1 (ERK2) après 2 semaines de VTP, résultat qui avait été obtenu également chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire chronique (Goette et *al.*, 2000).

7.2.2.5 Les fonctions métaboliques. Au niveau auriculaire, nous avons constaté une baisse d'expression de gènes impliqués dans chacun des cinq complexes de la chaîne de transport d'électrons, après 24 heures et 2 semaines de TV. Nous avons aussi observé une baisse d'expression de plusieurs gènes liés à la glycolyse, au niveau auriculaire, après 24 heures et 2 semaines de TV. Notamment, le niveau d'expression de la phosphofructokinase-M, une enzyme clé régulatrice dans la voie de la glycolyse, était significativement diminué après 24 heures et 2 semaines de TV. Nous avons de plus constaté une baisse d'expression de gènes liés au métabolisme des lipides. La diminution d'expression de CD36, une translocase des acides gras, prédominante au niveau cardiaque (Schaffer, 2002), ainsi que de la lipoprotéine lipase, qui hydrolyse les VLDLs (very-low-density lipoproteins) pour en libérer les acides gras et leur permettre une internalisation cellulaire, suggèrent une baisse de l'apport intracellulaire en lipides comme source d'énergie. Notons aussi la diminution de l'expression de PGC-1, un co-activateur de PPAR, impliqué dans la transcription de différents gènes liés au métabolisme des lipides, dont la

malonyl-CoA décarboxylase et de gènes de la chaîne de respiration cellulaire. Parallèlement, nos résultats montrent aussi une baisse d'expression de la malonyl-CoA décarboxylase, qui entraînerait une diminution de la dégradation de malonyl-CoA (Stanley et *al.*, 2005). Le malonyl-CoA interfère avec le transport des acides gras dans la mitochondrie en se liant à la CPT-I (carnitine palmitoyl transferase-I), un régulateur clé du transport transmembranaire des acides gras (Kerner et Hoppel, 2000). Le malonyl-CoA favorise par ailleurs la voie d'oxydation du glucose, par l'inhibition de l'oxydation des acides gras (Higgins et *al.*, 1980; Stanley et *al.*, 2005; Dyck et *al.*, 2001). Selon nos résultats, la tachycardie ventriculaire pourrait donc induire une baisse d'expression de gènes liés à la glycolyse et une activation de l'oxydation du glucose par l'augmentation de malonyl-CoA. Ces altérations des fonctions métaboliques, qui semblent à première vue paradoxales, ont été observées au niveau ventriculaire, dans une autre étude portant sur les changements métaboliques induits par la tachycardie auriculaire dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque. En effet, Lei et *al.* (2004), ont montré une baisse de 38% de l'oxydation des acides gras dans le groupe d'animaux avec insuffisance cardiaque, comparativement aux animaux normaux. Cette baisse de l'oxydation des lipides était accompagnée d'une hausse de l'oxydation du glucose de 148%. Cependant, le niveau d'expression des gènes reliés au métabolisme du glucose (glucose transporter-1, glucose transporter-4, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase) était diminué, ainsi que le niveau d'expression de la protéine GAPDH. D'autres études ont aussi montré une augmentation de l'apport en glucose en condition hypertrophique ou en insuffisance cardiaque modérée (Bishop et Altschuld, 1970; Allard et *al.*, 1994). La baisse de l'oxydation des acides gras, accompagnée d'une hausse de l'utilisation du glucose en condition hypertrophique est décrite comme un retour au phénotype fœtal (Ingwall et Weiss, 2004). Bien que ces études présentent des résultats obtenus au niveau ventriculaire, il est possible que le phénomène soit applicable au niveau auriculaire. Aucune étude n'a montré à ce jour l'impact de l'insuffisance cardiaque sur l'activation ou l'inhibition de l'ensemble des voies métaboliques au

niveau auriculaire. Notre étude pourrait contribuer à la compréhension de l'implication des voies métaboliques dans le remodelage auriculaire.

7.2.2.6 Le stress oxydatif. L'étude de protéomique et métabolomique dans le modèle d'insuffisance cardiaque a montré une baisse de l'expression de protéines (superoxyde dismutase et peroxiredoxine) impliquée dans l'oxydation-réduction, au niveau auriculaire, à 2 semaines de VTP. La respiration cellulaire engendre la synthèse de radicaux libres d'oxygène (ROS : H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2^-$, O en singulet), qui doivent être constamment éliminés par différents systèmes oxydants de la cellule (Valdivia et al., 2009). La présence de radicaux libres est dommageable pour les cellules, puisqu'elle entraîne notamment une oxydation et une peroxydation des lipides ainsi qu'un dommage au niveau de l'ADN simple-brin. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la conversion de $\bullet\text{O}_2^-$ en O_2 et H_2O_2 , des molécules moins réactives. Les peroxiredoxines sont une famille de protéines aussi impliquées dans l'élimination des peroxydes. La peroxiredoxine-3, dont l'expression était diminuée dans notre étude, est localisée dans la matrice mitochondriale (Cox et al., 2010). Plusieurs études génomiques ont montré une baisse de l'expression de gènes liés à la défense anti-oxydative cellulaire (Barth et al., 2005; Kim et al., 2003). La baisse de la défense anti-oxydante pourrait donc être impliquée dans le remodelage tissulaire. Adam et al. (2010) ont traité des souris transgéniques Rac1 (constitutivement active) avec la rosuvastatine et ont montré que l'effet anti-fibrotique du traitement pourrait être lié à l'inhibition de CTGF, un médiateur de $\text{TGF}\beta$ et de l'angiotensine II dans le développement de la fibrose interstitielle, via l'inhibition de la NADPH oxydase. Le traitement de chiens soumis à une tachycardie auriculaire avec simvastatine a montré une baisse du niveau de nitrotyrosine et de protéine c-réactive, des marqueurs de stress oxydatif, ainsi qu'une baisse de la fibrose interstitielle. Le traitement de fibroblastes en culture avec simvastatine montrait une réduction de la prolifération et de la différenciation cellulaire induite par le pré-traitement au $\text{TGF}\beta$ (Shiroshita-Takeshita et al., 2007). Notons aussi que notre génomique comparant le remodelage auriculaire et ventriculaire a mis en évidence

l'augmentation de Rac1 au niveau auriculaire à 24 heures et 2 semaines de VTP. L'augmentation de CTGF et du stress oxydatif dans notre modèle canin pourrait donc interagir pour promouvoir la fibrose intertitielle.

7.2.3 Mécanismes de remodelage ventriculaire induits par l'insuffisance cardiaque.

La classe fonctionnelle qui montrait le plus de changements d'expression de gènes, au niveau ventriculaire, était celle reliée au métabolisme. La phosphorylation oxydative a été démontrée altérée, au niveau ventriculaire, chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque ainsi que dans différents modèles animaux. Jarretta et *al.* (2000) ont effectué des mesures d'activités des complexes I à IV dans des échantillons obtenus par biopsies sur des patients insuffisants cardiaques. Ils ont observé une réduction de l'activité du complexe III, sans changement significatif de l'activité des autres complexes. Buchwald et *al.* (1990) ont comparé l'activité respiratoire mitochondrial de cœur de patients insuffisants suite à une transplantation à celle de cœurs sains. Ils ont observé une baisse de 21% du niveau de cytochrome c ainsi qu'une baisse de 24 et de 28% de l'activité des complexes III et IV, respectivement. Dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire, Marin-Garcia et *al.* (2001) ont observé une baisse marquée de l'activité des complexes III et V, sans changement significatif de l'activité des autres complexes. Dans le même modèle, Ide et *al.* (1999) ont montré une baisse majeure de l'activité du complexe I (-50%). Dans notre étude génomique, l'analyse de voies de signalisation a mis en évidence l'altération de la fonction respiratoire mitochondriale et les gènes réprimés étaient impliqués dans le complexe I et II après 24 heures et dans le complexe I uniquement après 2 semaines de tachycardie ventriculaire. Nous avons aussi constaté la baisse d'expression de l'aconitase-2, une enzyme régulatrice clé du cycle de Krebs.

7.2.4 La dédifférentiation cellulaire.

La comparaison génomique des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires nous a permis de constater qu'un plus grand nombre de gènes étaient différemment exprimés dans les cellules normales que lors du développement de l'insuffisance cardiaque. De plus, il est apparu que la majorité des gènes dont la différence d'expression oreillette-ventricule diminuait avec l'augmentation de la durée de la tachycardie ventriculaire, montraient une évolution de changement d'expression au niveau auriculaire, sans changement d'expression au niveau ventriculaire. Il semble que le profil d'expression génomique auriculaire évolue, au cours de la pathologie, vers un profil d'expression semblable à celui rencontré au niveau ventriculaire. L'étude de Barth et *al.* (2005), qui comparait l'expression des gènes dans l'oreillette de patients souffrant de fibrillation auriculaire permanente et de patients en rythme sinusal à l'expression des gènes au niveau ventriculaire dans des cœurs normaux. Il a montré que les gènes davantage exprimés dans les oreillettes normales que dans les ventricules normaux montraient généralement une baisse d'expression dans les oreillettes de patients souffrant de fibrillation auriculaire permanente. Au contraire, les gènes ayant un niveau d'expression plus faibles dans les oreillettes que dans les ventricules normaux (2974 transcrits, FDR<0.03) tendraient à être surexprimés dans les oreillettes de patients en fibrillation auriculaire permanente. La « ventricularisation » des oreillettes constituerait donc un phénomène commun existant entre le remodelage induit par tachycardie ventriculaire et celui induit par fibrillation auriculaire.

7.2.5 miR21 comme régulateur du remodelage auriculaire.

Dans notre étude sur le remodelage auriculaire induit par l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde, nous avons observé une augmentation parallèle de la fibrose interstitielle, de l'expression de ERK1/2 phosphorylés et de miR-21, accompagné d'une baisse de l'expression de sprouty-1. Les résultats de notre étude suggèrent l'implication potentielle de miR21 dans le remodelage

auriculaire par un mécanisme similaire à celui proposé par Thum et *al.* (2008). Le traitement initié, à l'aide d'une sonde anti-miR21 s'est avéré efficace pour réduire l'expression de miR-21, et augmenter l'expression de son gène cible, sprouty-1. Nos résultats préliminaires suggèrent aussi un effet bénéfique du traitement dans la prévention de la fibrillation auriculaire.

miR-21 a aussi été démontré impliqué dans l'hypertrophie cardiaque chez les souris sur-exprimant le récepteur β 2-adrénergique (Sayed et *al.*, 2007). De même, l'étude de Thum et *al.* (2008) sur les souris soumises à un cerclage aortique a montré un effet bénéfique de l'anti-miR21 non seulement dans la prévention de la fibrose interstitielle, mais aussi dans la réduction de l'hypertrophie cardiaque. Dans notre modèle, le pourcentage de tissu conjonctif était augmenté après 2 semaines post-infarctus et demeurait inchangé par la suite. Pourtant, la durée des fibrillations auriculaires tendaient à augmenter progressivement pour devenir significativement plus élevée que dans le groupe Sham à 8 semaines post-infarctus. Cette dissociation entre la fibrose interstitielle et la durée de la fibrillation auriculaire pourrait être liée à la taille des oreillettes. En effet, pour qu'il y ait formation de circuits de réentrées, il faut un minimum de tissu. La longueur de l'onde d'un circuit de réentrée (λ) détermine la taille minimale du tissu nécessaire à la formation de ce circuit. Elle est dépendante de la durée de la période réfractaire et de la vitesse de conduction. Ainsi la dilatation progressive de l'oreillette gauche dans notre modèle, jusqu'à 8 semaines post-infarctus, pourrait avoir joué un rôle déterminant dans la promotion de la fibrillation auriculaire. Si tel est le cas, il est possible que le traitement anti-miR21 administré à nos animaux ait un double effet bénéfique, en réduisant la fibrose interstitielle et la dilatation auriculaire, pour prévenir la fibrillation auriculaire.

7.2.6 La fibrose interstitielle comme cible thérapeutique.

Dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachycardie ventriculaire, la fibrose interstitielle a été associée à une hétérogénéité de conduction locale. Cette anomalie de conduction, combinée à la présence de masse tissulaire hétérogène favoriserait la formation de circuits de réentrée (Li et *al.*, 1999; Spach et *al.*, 1997). Dans une autre étude, une période de récupération (en rythme normal) était octroyée aux chiens d'abord soumis à 2 semaines de tachycardie ventriculaire. Cette période de récupération s'est avérée suffisante pour permettre un recouvrement de la fonction hémodynamique et électrique (canaux et pompes ioniques), sans toutefois montré d'atténuation de la fibrose interstitielle ou de la fibrillation auriculaire. Cette étude suggère donc une association entre le remodelage structural et la fibrillation auriculaire induite par l'insuffisance cardiaque (Burnstein et *al.*, 2008). Le traitement préventif de la FA semble directement lié à la prévention de la fibrose auriculaire, dans le contexte d'insuffisance cardiaque.

Plusieurs facteurs reliés à l'insuffisance cardiaque semble avoir un effet pro-fibrotique. L'angiotensine II, un peptide vasoactif impliqué dans la régulation hémodynamique, était augmentée de façon significative au niveau tissulaire dans notre modèle canin d'insuffisance cardiaque (Cardin et *al.*, 2003). Le traitement avec enalapril a permis de réduire la fibrose interstitielle, la durée de la fibrillation auriculaire et l'activité de ERK1/2. Le traitement de fibroblaste à l'angiotensine entraîne une synthèse et une sécrétion de collagène (Lijnen et *al.*, 2001). En clinique, le traitement de patients souffrant d'insuffisance cardiaque à l'aide d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine semble avoir un effet bénéfique dans la réduction du risque de fibrillation auriculaire (Pederson et *al.*, 1999).

TGF β s'est aussi avéré un agent pro-fibrotique. En effet, le traitement de fibroblastes avec TGF β induit une prolifération et une différenciation cellulaire (Lijnen et *al.*, 2000). La surexpression de TGF β chez la souris a montré une augmentation de la fibrose interstitielle et du risque de fibrillation auriculaire

(Verheule et al., 2004). L'administration de BMP-7 (bone morphogenic protein-7), un antagoniste de TGF β , à des souris soumise à un cerclage aortique, à entraîné une baisse significative de la fibrose interstitielle (Zeisberg et al., 2007). Le TGF β était également élevé dans notre modèle canin d'insuffisance cardiaque (Hannah et al., 2004).

La présence de stress oxydatif a été rapportée chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (Mihm et al., 2001). Les ROS pourraient réguler l'activation des MMPs par une voie MAP kinase-dépendante (Siwik et al., 2004). L'administration de probucol à des chiens soumis à une tachycardie ventriculaire s'est avéré efficace pour prévenir le stress oxydatif et pour réduire l'activité des MMPs. Nos études de génomique et de protéomique présentée ici suggèrent l'implication du stress oxydatif dans le remodelage auriculaire induit par la tachycardie auriculaire.

L'implication des HSPs (heat-shock proteins) a été suggérée dans notre étude de protéomique. En effet, une augmentation de HSP27, HSP60 et HSP70 surviendrait après 24heures de tachycardie ventriculaire, alors que les HSP90, GRP78 et α -B-crystallin seraient augmentés plus tardivement. L'activation des HSPs survient en réponse à de nombreux stress (Benjamin et McWilliam, 1998). L'activation de HSP27 serait notamment associé à une réponse cardioprotectrice au stress oxydatif (Liu et al., 2007). L'induction de HSP par la geranylgeranylacetone (GGA) semblerait efficace pour réduire la fibrillation auriculaire dans le modèle canin de tachycardie auriculaire (Brundel et al., 2006).

Chacun des facteurs précédemment décrits (angiotensine II, TGF β , stress oxydatif, HSPs) semblent impliqué dans le remodelage auriculaire induit par la tachycardie ventriculaire, et il semble que ces facteurs interagissent de façon étroite. Chacun de ces éléments peut être envisagé comme cible thérapeutique et devrait faire l'objet de davantage d'investigation. Nos études ont aussi montré le rôle potentiel de CTGF comme cible thérapeutique. Enfin, l'approche ciblant

miR21 semble prometteuse, puisque nos résultats préliminaires suggèrent une efficacité du traitement dans la diminution de la durée de la fibrillation auriculaire. Il nous faudra cependant attendre la fin des expériences pour confirmer l'avenir prometteur de cette cible thérapeutique.

7.3 Expériences futures proposées.

7.3.1 Étude du phénomène d'adaptation au stress dans le remodelage auriculaire induit par tachycardie auriculaire.

Le phénomène d'adaptation cellulaire au stress suggéré dans l'étude génomique du modèle de tachycardie auriculaire semble une avenue intéressante pour la compréhension des mécanismes de remodelage auriculaire. Une étude temporelle métabolomique dans le modèle de tachycardie auriculaire permettrait déterminer à quel moment la demande énergétique excessive reliée à l'hyperactivité atriale entraîne un déséquilibre des voies métaboliques. Cette étude pourrait être effectuée sur le modèle de stimulation électrique rapide sur des cellules en cultures, tel que décrit par Qi et al (2008). Nous pourrions utiliser des cardiomyocytes isolés provenant d'oreillettes de cœurs de chiens normaux et les mettre en culture. Nous soumettrions alors les cellules à des périodes variées de tachystimulation (ex. :1 heure, 2 heures, 4 heures, 8 heures, 16 heures et 24 heures). Nous recueillerions ensuite les cellules qui seront congelées pour étudier les changements métaboliques, tel que décrit dans notre étude de protéomique/métabolomique. Nous pourrions également utiliser les microarrays de SA BioScience, qui permettent de créer des micropuces d'ADN avec 24 à 384 gènes de notre choix, sélectionnés à partir de voies de signalisation cibles (<http://www.sabiosciences.com/custompcrplate.php>). Nous aurions donc la possibilité de concevoir des micropuces mesurant un large spectre de gènes liés au métabolisme. Nous pourrions ainsi étudier l'expression des gènes liés au métabolisme, au stress oxydatif et à l'apoptose sur les cardiomyocytes soumis aux différents temps de tachystimulation.

Pour mieux comprendre les mécanismes de régulation des gènes reliés au métabolisme et leur implication potentielle dans le phénomène d'adaptation, nous pourrions effectuer une recherche bioinformatique afin d'étudier la région promotrice des gènes affectés par la tachycardie et de vérifier s'il existe des facteurs de transcriptions connus impliqués dans la régulation de l'expression de ces gènes. Pour confirmer les résultats bioinformatiques, l'utilisation de la technique de « DNA electrophoretic mobility shift » permettra de confirmer l'interaction protéine-ADN (Lahiri et Ge, 2000).

L'étude concomitante de l'expression de gènes reliés à la transcription et à la traduction permettrait de déterminer si le désordre métabolique pourrait être à l'origine de la répression de ces gènes. La recherche de facteurs de transcriptions pouvant se lier aux régions promotrices de ces gènes pourrait nous donner des indications sur les voies de signalisation impliquées dans ce mécanisme adaptatif. Cette recherche pourra être effectuée telle que décrit ci-haut, pour les gènes liés au métabolisme.

Selon les facteurs de transcriptions qui auront été identifiés comme impliqués dans la régulation de nos gènes d'intérêt, nous pourrions effectuer davantage de recherches pour trouver la cascade de signalisation qui pourrait être impliquée. Notons que la voie de signalisation calmoduline-calcineurine-NFAT calcium dépendante pourrait être envisagée. En effet, l'étude effectuée par Qi et *al.* (2008), portant sur l'utilisation d'un modèle de stimulation électrique rapide sur des cardiomyocytes en culture, a montré une augmentation du courant transitoire calcique, suite à une stimulation électrique rapide de 8 heures, lequel était renversé sur une période de 24 heures. Cette diminution a été associée à une diminution de l'ARNm et de la protéine $Ca_v1.2$, du courant calcique I_{CaL} dans les cellules soumises à 24 heures de tachystimulation. Cette diminution d'expression aurait été induite par la voie de signalisation calmoduline-calcineurine-NFAT calcium-dépendante. L'augmentation rapide du courant

calcique transitoire serait donc responsable de l'activation de cette voie de signalisation, laquelle réprimerait l'expression du canal $Ca_v1.2$.

Dans notre étude, le plus grand nombre de changements d'ARN messenger survient 24 heures post tachycardie auriculaire et 94% de ces changements correspondent à une baisse du niveau d'expression. Un grand nombre ces changements sont renversés après une semaine de TA. Il serait intéressant de vérifier si l'expression de certains de ces ARN messagers pourrait aussi être régulée par la voie calmoduline-calcineurine-NFAT calcium-dépendante en effectuant par exemple une recherche de sites de liaison pour le facteur de transcription NFAT dans la région promotrice de ces gènes. Les gènes réprimés après 24 heures, mais retournés au niveau contrôle après une semaine de tachycardie devraient être considérés candidats à la régulation par cette voie de signalisation (ex. : MKL, nuclear RNA helicase, RNA-helicase related protein, DNA-dependant RNA polymerase II, adenylate-kinase, Elf4E, MYH4, CPT2).

7.3.2 Étude avancée de CTGF comme cible thérapeutique dans la prévention de la fibrose et la fibrillation auriculaire.

Selon nos résultats, le CTGF serait une cible prometteuse pour la prévention de la fibrose interstitielle associée à l'insuffisance cardiaque. Récemment, Duisters et *al.* (2009) ont montré la régulation de CTGF par miR30 et miR133. L'inhibition de l'expression miR133 est associée à une fibrose sévère et au développement d'insuffisance cardiaque (van Rooij et Olson, 2009). La surexpression de miR133a a montré une prévention de la fibrose interstitielle dans le modèle de cerclage aortique (Matkovich et *al.*, 2010). La surexpression de miR133 dans l'oreillette de chien soumis à une tachycardie ventriculaire pourrait permettre de réprimer l'expression du CTGF et de déterminer l'impacte de cette répression sur le remodelage auriculaire et l'incidence de la fibrillation auriculaire.

Pour ce faire, nous pourrions utiliser la technique de transfert de gène présentée par Kikuchi et *al.* (2005). Il faudrait initialement réaliser une construction à l'aide d'un adénovirus recombinant. L'insertion du gène codant pour miR133 devrait être effectuée à l'aide du système Cre-Lox. Le virus devra ensuite être reproduit et titré. Lors de son utilisation, le virus sera suspendu dans la saline froide (4°C). Nous préparerons alors une solution de trypsine et de saline froide auquel nous ajouterons progressivement 1g de copolymère polyoxyethylene/ polyoxypropylene F127. Juste avant l'utilisation, la suspension de virus sera ajoutée et la solution sera ensuite mise à 37°C pour quelques secondes pour devenir de la gelée.

Nous pourrions alors effectuer une chirurgie de nos chiens sous fluoroscopie pour implanter une électrode et un pacemaker qui serviront à l'induction de la tachycardie ventriculaire. Nous implanterons également 2 électrodes bipolaires dans l'apex de l'oreillette droite, pour faire des mesures électrophysiologiques (inductibilité de FA, durée des périodes réfractaires) répétées sur les animaux (Shinagawa et *al.*, 2002). Il faudrait par la suite effectuer une thoracotomie, dans l'espace intercostal 4-5, du côté gauche, pour accéder à l'oreillette gauche. La solution, sous forme de gelée, serait alors « peinte » à la surface de l'oreillette. Le mélange trypsin+ F127 permettra la pénétration de l'adénovirus dans le tissu auriculaire. Les animaux seraient alors refermés et auraient les soins post-opératoires appropriés. Après 2-3 jours de récupération, la tachystimulation pourra être initiée pour une période de 2 semaines. La fonction cardiaque, notamment la taille de l'oreillette gauche et sa fraction de raccourcissement, pourra être mesurée par échocardiographie à l'état de base (avant l'initiation de la tachystimulation), puis après 24 heures, 1 semaine et 2 semaines de VTP. Avant le sacrifice de l'animal, nous effectuerons des mesures de conduction cardiaque à l'aide du système Cardiomap (Li et *al.*, 1999). Nous pourrions ainsi déterminer s'il y a une hétérogénéité de conduction, liée à la fibrose interstitielle. Une partie de l'oreillette gauche sera ensuite

congelée pour l'analyse biochimique et une autre partie sera conservée dans une solution de formol pour l'histopathologie. L'analyse en histologie avec la coloration au trichrome de Masson nous permettra de déterminer si le traitement a permis une réduction significative de la fibrose interstitielle. L'analyse en Real-Time PCR nous permettra de déterminer si le traitement avec l'adénovirus a entraîné une augmentation significative de miR133 et si cette augmentation était associée à une baisse significative de CTGF. Nous mesurerons aussi l'expression de CTGF par Western blot, puisque le mécanisme régulateur des microARN est traductionnel.

Une autre approche serait l'injection des adénovirus qui exprime des séquences siRNA, pour supprimer directement l'expression de CTGF chez les chiens soumis à une tachystimulation ventriculaire. On utiliserait les adénovirus avec des séquences semblables mais modifiées pour être inactives (« scrambled ») comme contrôles. Cette approche donnerait une réponse plus claire sur le rôle spécifique de CTGF, mais à cause des questions de stabilité et persistance de la réponse dans le temps, je crois que les interventions basées sur miR133 sont plus prometteuses.

7.4 Conclusions

Nous avons investigué la base moléculaire du remodelage atrial qui joue un rôle central dans la fibrillation auriculaire. Nos résultats ont clarifié plusieurs aspects importants de la physiopathologie de cette condition importante, mais ont soulevé plusieurs questions qui restent à résoudre par la recherche future.

Références

Adam O, Lavall D, Theobald K, et al. (2002) Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 55(5):469-80.

Adam O, Lavall D, Theobald K, et al. (2010) Rac1-Induced Connective Tissue Growth Factor Regulates Connexin 43 and N-Cadherin Expression in Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 55(5):469-480.

Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, et al. (1994) Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol.* 267(2 Pt 2):H742-50.

Allessie MA, Bonke FIM, Schopman FJG. (1973) Circus Movement in Rabbit Atrial Muscle as a Mechanism of Tachycardia. *Circ. Res.* 33: 54-62.

Allessie MA, Bonke FI, Schopman FJG. (1977) Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The “leading circle” concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ. Res.* 41: 9–18.

Ambros V, Horvitz HR (1984). Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 226: 409-416.

Ambros V, Horvitz HR (1987). The lin-4 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes and development* 1: 398-414.

Ambros V. (2008) The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med.* 14(10):1036-40.

Anderson RH. (1972) Histologic and histochemical evidence concerning the presence of morphologically distinct cellular zone within the rabbit atrioventricular node. *Anatomical Record* 173: 7-24.

Anderson RH, Ho SY. (1998) The architecture of the sinus node, the atrioventricular conduction axis, and the internodal atrial myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9:1233-48.

Anné W, Willem R, Holemans P, et al. (2007) Self-terminating AF depends on electrical remodeling while persistent AF depends on additional structural changes in rapid atrially paced sheep models. *J Mol Cell Cardiol* 43: 148-158.

Aronson JK (2005) One hundred years of atrial fibrillation. *Br J Clin Pharmacol* 60 (4): 345–346.

Ausma J, Coumans WA, Duimel H, et al. (2000) Atrial high energy phosphate content and mitochondrial enzyme activity during chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 47:788 –796.

Ausma J, Litjens N, Lenders MH, et al. (2001) Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the the goat. *J Mol Cell Cardiol* 33: 2083-94.

Ausma J, Wijffels M, van Eys G, et al. (1997) Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes as a result of chronic atrial fibrillation. *Am J Pathol.* 151: 985-997.

Banerjee I, Fuseler JW, Price RL et al. (2007) Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: H1883-91.

Barbuti A., DiFrancesco D. (2008) Control of cardiac rate by « funny » channels in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1123: 213-223.

Bartel DP. (2004) MicroRNAs : Genomics , Biogenesis, Mechanism and function. *Cell* 116: 281–297.

Barth AS, Merk S, Arnoldi E, et al. (2005) Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res* 96:1022-9.

Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK. (2006) Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1015-26.

Benjamin IJ, McWilliam DR. (1998) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83:117-132.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 37(7):766-70.

Bers D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.

Billette J. (1987) Atrioventricular nodal activation during periodic premature stimulation of the atrium. *Am J Physiol.* 252: H163-77.

Bing OH, Ngo Hq, Humphries DE, et al. (1997) Localization of alpha (1) collagen mRNA in myocardium from spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 9: 2335-44.

Bishop SP, Altschuld RA. (1970) Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am J Physiol.* 218:153-9.

Bosch R.F., Zeng X, Grammer JB, et al. (1999) Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 44: 121-31.

Bouzevrhane F, Thibault G. (2002) Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc Res* 53: 304– 12.

Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB et al. (1994) Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 269: 1110–1119.

Brennecke J, Stark A, Russel RB, Cohen SM. (2005) Principles of microRNA–target recognition. *PLoS Biol.* 3: e85.

Brooks WW, Conrad CH. (2000) Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *J Mol Cell Cardiol.* 32: 187-95.

Brown R.D., Ambler S.K., Mitchell M.D., Long C.S. (2005). The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 657–687.

Brundel BJ, Shiroshita-Takeshita A, Qi XY, et al. (2006) Induction of heat shock response protects the heart against atrial fibrillation. *Circ Res* 99:1394–1402.

Bueno OF, Molkentin JD. (2002) Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res* 91;776-781.

Burstein B, Comtois P, Michael G, et al. (2009) Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res* 105: 1213-1222.

Burstein B, Nattel S. (2008) Atrial structural remodeling as an antiarrhythmic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 4-10.

Buchwald A, Till H, Unterberg C, et al. (1990) Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 11: 509-16.

Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, et al. (2003) Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovascular Research* 60; 315– 325.

Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*.136: 642-55.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 65: 6029-33.

Chen CL, Huang SK, Lin JL, et al. (2008) Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 45:742–53.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83–86.

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 38: 228-233.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, et al. (2001) MAP kinases. *Chem Rev.* 101: 2449-76.

Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. (2007) MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol.* 170:1831-1840.

Cho JR , Park S, Choi BW, et al. (2010) Delayed enhancement magnetic resonance imaging is a significant prognostic factor in patients with non-ischemic cardiomyopathy. *Circ J* 74: 476-83.

Chuva de Sousa Lopes SM, Feijen A, Korving J, et al. (2004) Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction. *Dev Dyn* 231:542-50.

Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH. (1994) Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269: 32848–32857.

Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, et al. (1995) Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 147: 325–338.

Cossu G, Bianco P. (2003) Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev* 13: 537-542.

Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* 425:313-25.

Davy JM. (2005) Dronedaron demonstrates additional rate control on top of standard pharmacotherapies in the treatment of atrial fibrillation. *Circulation* 112(Suppl 17): II577.

Doshi R N, Wu TJ, Yashima M, et al. (1999) Relation between ligament of Marshall and adrenergic atrial tachyarrhythmia. *Circulation* 100, 876–883.

Downward J. (1996) Control of ras activation. *Cancer Surv.* 27:87-100.

Drosten M, Dhawahir A, Sum EY, et al. (2010) Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J.* 29(6):1091-104.

Dudley SC Jr, Hoch NE, McCann LA, et al. (2005) Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 112:1266–73.

Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. (2009) miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor. Implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res.* 104:170 –178.

Dyck JRB, Cheng J-F, Stanley WC, et al. (2004) Malonyl-CoA decarboxylase inhibition protect the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. *Circ Res.* 94:e78-e84.

Dispersyn GD et al. (1999) Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res.* 43: 947-57.

Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, et al. (1989) Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 21: 103-113.

Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, et al. (1991) Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts: regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 69:483–90.

Einthoven W. (1906) Le télécardiogramme. *Arch. Int. Physiol.* 4: 132–164.

El-Agroudy AE, Hassan NA, Foda MA, et al. (2003) Effect of angiotensin II receptor blocker on plasma levels of TGF-beta 1 and interstitial fibrosis in hypertensive kidney transplant patients. *Am J Nephrol.* 23: 300– 306.

Espira L, Czubryt MP. (2009) Emerging concepts in cardiac matrix biology. *Can J Physiol Pharmacol.* 87: 996-1008.

Fareh S, Villemaire C, Nattel S. (1998) Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* 98: 2202-2209.

Farshi R, Kistner D, Sarma JS, et al. (1999) Ventricular rate control in chronic atrial fibrillation during daily activity and programmed exercise: a crossover open-label study of five drug regimens. *J Am Coll Cardiol* 33: 304 –310.

Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, et al. (1997) Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 96:1180– 1184.

Fuster V et al. (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients With Atrialthe Heart Rhythm Society Developed in Collaboration With

the European Heart Rhythm Association and 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart. *Circulation*. 114: e257-354.

Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*. 28: 5369-5380.

Gao X, He X, Luo B, et al. (2009) Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta 1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol*. 606: 115-20.

Garrey W.E. (1914) The nature of fibrillary contraction of the heart. Its relation to tissue mass and form. *Am J Physiol*. 33: 397-408.

Garrey, W. E. (1924) Auricular fibrillation. *Physiol. Rev*. 4: 215–250.

Gaspo R, Bosh RF, Bou-Abboud E, Nattel S. (1997) Tachycardia-induced changes in Na^+ current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 81: 1045-52.

Gilbert SF. (2006) Developmental biology. Eighth edition. *Sinauer Associates, Inc*. 817pp.

Glickman M H, Ciechanover A. (2002) The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the sake of construction. *Phys. Rev*. 82: 373-428.

Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. (1996) Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* 94: 2968-74.

Goette A, Staack T, Röcken C, et al. (2000) Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 35: 1669-77.

Gros D, Jarry-Guichard T, Ten Velde I, et al. (1994). Restricted Distribution of Connexin40, a Gap Junctional Protein, in Mammalian Heart. *Circ. Res.* 74: 839-851.

Guarda E, Katwa LC, Myers PR, et al. (1993) Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 27: 2130–34.

Guy GR, Wong ESM, Yusoff P, et al. (2003) Sprouty: How does the branch manager work? *Journal of Cell Science* 116: 3061-3068.

Guyton AC, Hall JE (1996) *Textbook of Medical Physiology.* Ninth Edition. Saunders. 1148pp.

Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, et al. (1998) Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signalling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92: 253–263.

Hagens VE, Ranchor AV, Van SE, et al. (2004) Effect of rate or rhythm control on quality of life in persistent atrial fibrillation. Results from the rate control versus electrical cardioversion (RACE) study. *J Am Coll Cardiol* 43: 241–7.

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, et al. (1998) Spontaneous initiation of atrial ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 339: 659-66.

Hamdani N., Kooij V., van Dijk S., et al. (2008) Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 77: 649-58.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999) A novel species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing. *Science* 286: 950–952.

Hammond C. (1996) *Cellular and Molecular Neurobiology*. Academic Press. 453pp.

Hanafusa H, Torii S, et al. (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol.* 4: 850-8.

Hancox JC, Mitcheson JS (1997) Ion channel and exchange currents in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Can J Cardiol* 13: 1175-1182.

Hanna N, Cardin S, Leung T.-K., Nattel S. (2004) Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovascular Research* 63: 236– 244.

Harris IS, Black BI. (2010) Development of the endocardium. *Pediatr Cardiol.* 31(3):391-9

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, et al. (2004) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 75: 434-42.

Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, et al. (2005) Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 45: 1832-1839.

Heimer R, Bashey RI, Kyle J, Jiminez SA. (1995) TGF-beta modulates the

synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture. *J Mol Cell Cardiol* 27: 2191–8.

Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, et al. (1976) Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation* 53: 273-279.

Herrmann J, Saguner AM, Versari D, et al. (2007) Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circ Res* 101: 865–874.

Hervé J-C, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, et al. (2008) Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. *Pathologie Biologie* 56: 334-341.

Higgins AJ, Morville M, Burges RA, et al. (1980) Oxfenicine diverts rat muscle metabolism from fatty acid to carbohydrate oxidation and protects the ischaemic rat heart. *Life Sci* 27: 963–970.

Hohnloser SH, Crijns HJ, van Eickels M, et al. (2009) Effect of dronedarone on cardiovascular events in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 360: 668-78.

Hohnloser SH, Dorian P, Straub M, et al. (2004) Safety and efficacy of intravenously administered tedisamil for rapid cardioversion of recent-onset atrial fibrillation or atrial flutter. *J Am Coll Cardiol* 44: 99-104

Hurst's (1998) *The Heart*. Ninth Edition McGraw-Hill 2407pp.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. (1999) Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85: 357–363.

Ihn H. (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol.* 14: 681-685.

Impagnatiello MA, Weitzer S, Gannon G, et al. (2001) Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol.* 152: 1087-98.

Ingwall JS (2009) Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res.* 81: 412-9.

Ingwall JS, Weiss RG. (2004) Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res.* 95: 135-45.

Iwanciw D, Rehm M, Porst M, Goppelt-Struebe M. (2003) Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 1782-7.

Jarreta D, Orus J, Barrientos A, et al. (2000) Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 45: 860–865.

Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. (2007) MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 100: 1579-88.

Johnson GL, Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-2.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP. (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14: 787-99.

Jugdutt BI. (2003) Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 3: 1–30.

Katz A.M. (2006) *Physiology of the heart*. Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 620pp.

Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, et al. (2008) AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 19: 415-20.

Kerner J, Hoppel C. (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1486: 1-17.

Kikuchi K, McDonald AD, Sasano T, Donahue K. (2005) Targeted Modification of Atrial Electrophysiology by Homogeneous Transmural Atrial Gene Transfer. *Circulation*. 111: 264-270.

Kim YH, Lim DS, Lee JH, et al. (2003) Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med*. 35: 336-49.

Knobloch K, Brendel J, Rosenstein B, et al. (2004) Atrial-selective antiarrhythmic actions of novel I_{Kur} vs. I_{Kr} , I_{Ks} , and I_{KACh} class Ic drugs and beta blockers in pigs. *Med Sci Monit* 10: BR221.

Krikler D.M. (2000) Sir Thomas Lewis and arrhythmias. *ACC Curr J Rev* July/August : 23-25.

Kumagai K, Khrestian C, Waldo AL. (1997) Simultaneous multisite mapping studies during induced atrial fibrillation in the sterile pericarditis model. Insights into the mechanism of its maintenance. *Circulation*. 95: 511-521.

Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, et al. (2000) Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 46: 463–475.

Kyriakis JM, Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 81: 807-69.

Kurt M, Wang J, Torre-Amione G, et al. (2009) Left atrial function in diastolic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2: 10-15.

Lahiri DK, Ge Y. (2000) Electrophoretic mobility shift assay for the detection of specific DNA-protein complex in nuclear extracts from the cultured cells and frozen autopsy human brain tissue. *Brain Res Brain Res Protoc*. 5: 257-65.

Lai LP, Lin JL, Lin CS, et al. (2004) Functional genomic study on atrial fibrillation using cDNA microarray and two-dimensional protein electrophoresis techniques and identification of the myosin regulatory light chain isoform reprogramming in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 15: 214-23.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. (2002) Identification of tissue specific microRNAs from mouse. *Current Biology* 12: 735–739.

Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier et al. (2006) Gene expression profile changes associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. *J Mol Cell Cardiol*. 40: 173–184.

Lapointe N, Blais C Jr, Adam A, et al. (2002) Comparison of the effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vasopeptidase inhibitor after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol.* 39: 1692-8.

Leaman D, Chen PY, Fak J, et al. (2005) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell* 121: 1097-108.

Leask A, Abraham DJ. (2003) The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol.* 81: 355-63.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.

Lee Y, Kim M, Han J, et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23: 4051–4060.

Lei B, Lionetti V, Young ME, et al. (2004) Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 36: 567-76.

LeWinter MM. (2005) Functional Consequences of Sarcomeric Protein Abnormalities in Failing Myocardium. *Heart Failure Reviews* 10: 249–257.

Lewis T, Drury AN, Iliescu CC. (1921) A demonstration of circus movement in clinical fibrillation of the auricles. *Heart* 8:361e9.

Lewis BP, Burge CB, Bartel, DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.

Li D, Shinagawa K, Pang Li, et al. (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing–induced congestive heart failure. *Circulation* 104; 2608-2614.

Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. (1999) Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 100: 87-95.

Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, et al. (2000) Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 101: 2631-8.

Li G, Li RK, Mickle DA, et al. (1998) Elevated insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta 1 and their receptors in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: a possible mechanism. *Circulation* 98 (Suppl. 19): II-144–9.

Li M, Jones-Rhoades MW, Lau NC, et al. (2005) Regulatory mutations of miR-48, a *C. elegans* let-7 family microRNA, cause developmental timing defects. *Dev Cell*. 9: 415-422.

Li XM, Ma YT, Yang YN, et al. (2009) Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 36: 1054-61.

Li QJ, Chau J, Ebert PJ et al. (2007) miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129: 147-61.

Liao P, Wang SQ, Wang S, et al. (2002) p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ Res* 90: 190–196.

Liao PC, Tan SK, Lieu CH, Jung HK. (2008) Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 104: 1509–1523.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. (2000) Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab.* 71: 418–435.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. (2001) Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2: 117-22.

Liu N, Williams AH, Kim Y, et al. (2007) An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20844-9.

Löfberg L, Jacobson I, Carlsson L. (2006) Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel antiarrhythmic agent AZD7009: a comparison with azimilide and AVE0118 in the acutely dilated right atrium of the rabbit in vitro. *Europace* 8: 549.

Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. (2007) Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 110: 1330-1333.

Ma M, Watanabe K, Wahed MI, et al. (2001) Inhibition of progression of heart failure and expression of TGF-beta 1 mRNA in rats with heart failure by the ACE inhibitor quinapril. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 38(Suppl. 1): S51–54.

MacKenzie J. (1905) New methods of studying affections of the heart. V. The inception of the rhythm of the heart by the ventricle. *Br Med J.* 1: 812–815.

Mac William JA (1887). Electric stimulation of the mammalian heart. *J Int Med Congr.* 3: 253-255.

Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, and Moe GW. (2001) Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res.* 52: 103–110.

Mary-Rabine L, Albert A, Pham TD, et al. (1983) The relationship of human atrial cellular electrophysiology to clinical function and ultrastructure. *Circ Res.* 52: 188-99.

MacWilliam JA. (1887) Fibrillar contraction of the heart. *J Physiol.* 8: 296-310.

Marieb EN. (1998) *Anatomie et physiologie humaines.* Deuxième Édition. ERPI. 1194pp.

Massagué J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.

Masumoto K, Makino N, Sugano M, Fushiki S. (2001) Effects of losartan on the collagen degradative enzymes in hypertrophic and congestive types of cardiomyopathic hamsters. *Mol Cell Biochem.* 224: 19-27

Matkovich SJ, Wang W, Tu Y, et al. (2010) MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res.* 106: 166-75.

Mayer AG. (1906) Rythmical pulsation in scyphomedusae. *Washington DC: Carnegie Institut of Washington.* 47: 1-62.

McMichael J. (1982) History of atrial fibrillation 1628-1819 Harvey-deSenac-Laënnec. *Br Heart J* 48; 193-197.

McKay MM, Morrison DK. (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113–3121.

Meng F, Henson R, Lang M, et al. (2006) Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology.* 130: 2113-2129.

Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, et al. (2001) Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation.* 104:174–180.

Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, et al. (2005) Spirinolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J.* 26: 2193-2199.

Mines GR. (1914) On circulating excitations in heart muscle and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Trans R Soc Can* 8: 43–52.

Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. (1964) A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J.* 67: 200–220.

Monticelli S, Ansel K.M, Xiao C, et al. (2005) MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 6: R71.

Moorjani N, Ahmad M, Catarino P, et al. (2006) Activation of apoptotic caspase cascade during the transition to pressure overload-induced heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 48: 1451-8.

Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. (1995) Chronic rapid characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 91; 1588–1595.

Moss EG, Lee RC, Ambros V. (1997) The cold shock domain protein Lin-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88: 637–646.

Mulder P, Richard V, Derumeaux G, et al. (1997) Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling *Circulation* 96: 1976-82.

Munk AA, Adjemian RA, Zhao J et al. (1996) Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol.* 493: 801-818.

Muñoz-Chápuli R, Pérez-Pomares JM. (2010) Cardiogenesis: an embryological perspective. *J Cardiovasc Transl Res* 3: 37-48.

Naccarelli GV, Dorian P, Hohnloser SH, et al. (1996) Prospective comparison of flecainide versus quinidine for the treatment of paroxysmal atrial fibrillation/flutter. The Flecainide Multicenter Atrial Fibrillation Study Group. *Am J Cardiol* 77: 53A–59A.

Nattel S. (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 415; 219-226.

Nattel S, Maguy A, Le Bouter S. (2007) Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev.* 87: 425-456.

Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. (2005) Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis.* 48: 9-28.

Narula J, Haider N, Virmani R, et al. (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335: 1182-9.

Ohtani K., Yutani C., Nagata S et al. (1995) High Prevalence of Atrial Fibrosis in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *JACC* 25: 1162-1169.

Ohki R., Yamamoto K., Ueno S. (2005) Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. *International Journal of Cardiology.* 102: 233-238.

Olivetti G, Abbi R, Kaistura J, et al. (1997) Apoptosis in the failing heart. *N Eng J Med* 336: 1131-1141.

Opie LH. (2004) *Heart Physiology. From Cell to Circulation.* Fourth Edition. . Lippincott Williams & Wilkins. 648pp.

Ozaki K, Miyazaki S, Tanimura S, Kohno M. (2005) Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms. *J Cell Sci.* 118(Pt 24): 5861-71.

Panfilov AV, Pertsov AM. (1982) Mechanism of spiral waves initiation in active media, connected with critical curvature phenomenon. *Biofizika.* 27:886-9.

Panek AN, Posch MG, Alenina N, et al. (2009) Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One*. 4: e6743.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. (2000) Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86–89.

Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, et al. (1999) Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 99: 2750–6.

Pedersen OD, Bagger H, Keller N, et al. (2001) Efficacy of dofetilide in the treatment of atrial fibrillation-flutter in patients with reduced left ventricular function: a Danish investigations of arrhythmia and mortality on dofetilide (DIAMOND) substudy. *Circulation* 104: 292–296.

Pedersen OD, Bagger H, Kober L, et al. (1999) Trandolapril reduces the incidence of atrial fibrillation after acute myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction. *Circulation*. 100: 376–380.

Piper C, Schultheiss HP, Akdemir D, et al. (2003) Remodeling of the cardiac extracellular matrix differs between volume- and pressure-overloaded ventricles and is specific for each heart valve lesion. *J Heart Valve Dis*. 12: 592-600.

Pogwizd SM, Bers DM. (2004) Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 14: 61-6.

Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. (1999) Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res*. 85: 1009-1019.

Porter K., Turner N.A. (2009) Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology and Therapeutics* 123: 255-278.

Power JM, Beacom GA, Alferness CA. (1998) Susceptibility to atrial fibrillation: a study in an ovine model of pacing-induced early heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9: 423–435.

Qi XY, Yeh YH, Xiao L, et al. (2008) Cellular signaling underlying atrial tachycardia remodeling of L-type calcium current. *Circ Res.* 103: 845-854.

Raman M, Chen W and Cobb MH. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26: 3100–3112.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. (2000) The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901–906.

Rensma PL, Allesie MA, Lammers WJ, et al. (1988) Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res.* 62: 395-410.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, et al. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-20.

Ritter O, Luther HP, Haase H, et al. (1999) Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Mol Med* 77: 677–685.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4167– 4171.

Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, et al. (2002) Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology* 143: 4828-36.

Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316: 608–611.

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, et al. (2002) Alterations of β -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1253– 62.

Roy D, Beatch G, Steill I, et al. (2003) RSD1235 rapidly and effectively terminates atrial fibrillation [abstract]. *Eur Heart J* 24: 720.

Roy D, Talajic M, Dorian P, et al. (2000) Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med* 342: 913–20.

Roy S, Khanna S, Syed-Rehan A., et al. (2009) MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 82: 21–29.

Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. (2007) MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 100: 416-24.

Sayed D., Rane S., Lypowy J., et al. (2008) MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell*. 19: 3272-3282.

Schaffer JE. (2002) Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282: E239–E246.

Schotten U, Greiser M, Benke D, et al. (2002) Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res*. 53: 192-201.

Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. (2002) Differential Distribution of Cardiac Ion Channel Expression as Basis for Regional Specialization in Electrical Function. *Circ Res*. 90: 939-950.

Schunkert H, Riegger GAJ (2000) *Apoptosis in cardiac biology*. Kluwer academic publishers. 353pp.

Siess M, Seifart HI. (1980) Anoxic energy production and contractile activity in mammalian cardiac muscle. *Adv Myocardiol*. 2: 295-310.

Shi Y, Ducharme A, Li D, et al. (2001) Remodeling of atrial dimensions and emptying function in canine models of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 52: 217–225.

Shinagawa K, Shi YF, Tardif JC, et al. (2002) Dynamic nature of atrial fibrillation substrate during development and reversal of heart failure in dogs. *Circulation* 105: 2672-8.

Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Burstein B, et al. (2007) Effects of simvastatin on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 74: 75-84.

Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Lavoie J, Nattel S. (2006) Prednisone prevents atrial fibrillation promotion by atrial tachycardia remodeling in dogs. *Cardiovasc Res.* 69: 865-875.

Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, Nattel S. (2004) Effects of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs. *Circulation.* 110: 2313-2319.

Shoda M, Kajimoto K, Matsuda N, et al. (1997) A novel mechanism of human atrial fibrillation : single macro-reentry with intra-atrial conduction block. *Pace* 20: 1065.

Skasa M, Jungling E, Picht E, et al. (2001) L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 96: 151–9.

Silver MA, Pick R, Brilla CG, et al. (1990) Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res.* 24: 741–747.

Silverman ME. (1994) From rebellious palpitations to the discovery of auricular fibrillation: contributions of Mackenzie, Lewis and Einthoven. *Am J Cardiol.* 73: 384–389.

Singh B. (2009) Atrial fibrillation: from ion channels to bedside treatment options. *J Electrocardiol* 42: 660-70.

Singh BN, Connolly SJ, Crijns HJ, et al. (2007) Dronedarone for maintenance of sinus rhythm in atrial fibrillation or flutter. *N Engl J Med.* 357: 987-99.

Singh S, Zoble RG, Yellen L, et al. (2000) Efficacy and safety of oral dofetilide in converting to and maintaining sinus rhythm in patients with chronic atrial fibrillation or atrial flutter: the symptomatic atrial fibrillation investigative research on dofetilide (SAFIRE-D) study. *Circulation* 102: 2385–2390.

Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, et al. (2000) Enhanced Ca^{2+} release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 102: 2137-2144.

Siwik DA, Colucci WS. (2004) Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev.* 9: 43–51.

Spach MS, Boineau JP. (1997) Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol.* 20: 397–413.

Stanley WC, Morgan EE, Huang H, et al. (2005) Malonyl-CoA decarboxylase inhibition suppresses fatty acid oxidation and reduces lactate production during demand-induced ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289: H2304-9.

Storey KB. (2003) Mammalian hibernation. Transcriptional and translational controls. *Adv Exp Med Biol.* 543:21-38.

Sun H, Gaspo R, Leblanc N, Nattel S. (1998) Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation* 98; 719–727.

Sun F, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy AG. (2009) Mitochondrial accumulation of polyubiquitinated proteins and differential regulation of apoptosis by polyubiquitination sites Lys-48 and -63 *J Cell Mol Med.* 13: 1632-43.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ and Baltimore D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 12481-12486.

Tanaka K, Zlochiver S, Vickstrom KL, et al. (2007) Spatial distribution of fibrosis governs fibrillation wave dynamics in the posterior left atrium during heart failure. *Circ Res.* 101: 839-47.

Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. (2007) Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 42: 1137-1141.

Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456: 980-4.

The AFFIRM Investigators. (2002) A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *New Engl J Med* 347: 1825–1833.

Touboul P, Brugada J, Capucci A, et al. (2003) Dronedarone for prevention of atrial fibrillation: a dose-ranging study. *Eur Heart J* 24: 1481-7

Tsai CF et al. (2000) Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the superior vena cava: electrophysiological characteristics and results of radiofrequency ablation. *Circulation* 102: 67–74.

Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, et al. (2006) Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice, *Biochem Biophys Res Commun* 340: 1125–1133.

Vahebi S, Ota A, Li M, Warren et al. p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res* 100: 408–415.

Valdivia A, Pérez-Álvarez S, Aroca-Aguilar JD, et al. (2009) *Superoxide dismutases: a physiopharmacological update.* *J Physiol Biochem* 65: 195-208.

van der Rest M, Garrone R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5: 2814-23.

van der Welden HMW, Ausma J, Rook MB, et al. (2000) Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* 46: 476-486.

van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, et al. (2004) Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circ Res* 95: e85-95.

van Rooij E, Olson EN. (2009) Searching for miR-acles in cardiac fibrosis. *Circ Res* 104: 138-40.

van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316: 575-9.

van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. (2009) A family of microRNAs encoded by myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17: 662-73.

van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 13027-32.

Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, et al. (1997) Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 80: 772-81.

Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, et al. (1999) Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 85: 428-36.

Van Wijk LM, den Heijer P, Crijns HJ, et al. (1989) Flecainide versus quinidine in the prevention of paroxysms of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: 32– 36.

Verheule S, Sato T, Everett T, et al. (2004) Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 94: 1458–1465.

Vermes E, Tardif JC, Bourassa MG, et al. (2003) Enalapril decreases the incidence of atrial fibrillation in patients with left ventricular dysfunction: insight from the Studies Of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) trials. *Circulation* 107: 2926-31.

Vest JA, Wehrens XH, Reiken SR, Lehnart et al. (2005) Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation*. 111:2025–2032.

Wahab NA, Weston BS, Mason RM. (2005) Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res* 307: 305–314.

Wang L, Gout I, Proud CG. (2001) Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 276: 32670–32677.

Wang TJ, Parise H, Levy D et al. (2004) Obesity and the Risk of New-Onset Atrial Fibrillation. *JAMA* 292: 2471-2477.

Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B. (2008) miRNAs at the heart of the matter. *J Mol Med* 86: 771-783.

Weber KT, Sun Y, Katwa LC et al. (1997) Tissue repair and angiotensin II generated at sites of healing. *Basic Res Cardiol.* 92: 75-78.

Weerasooriya R, Davis M, Powell A, et al. (2003) The Australian Intervention Randomized Control of Rate in Atrial Fibrillation Trial (AIRCRAFT). *J Am Coll Cardiol* 41: 1697–1702.

Wessels A, Pérez-Pomares JM. (2004) The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276: 43-57.

Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. (2010) Cell death in the pathogenesis of heart disease: Mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 72: 18-44.

White CW, Kerber RE, Weiss HR, Marcus ML. (1982) The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships. *Circ Res* 51: 205-215.

Wightman B, Ha L, Ruvkun G. (1993) Postranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C.elegans*. *Cell* 75: 855-862.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92: 1954-1968.

Williams AE. (2008) Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 65: 545-562.

Winfree AT. (1972) Spiral waves of chemical activity. *Science* 175:634e6.

Winfree AT. (1991) Varieties of spiral wave behavior: An experimentalist's approach to the theory of excitable media. *Chaos* 1: 303-334.

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. (1987) Atrial fibrillation: a major contributor to stroke in the elderly. The Framingham Study. *Arch Intern Med* 147: 1561– 4.

Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. (2001) The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 52: 226–35.

Yamazaki T, Tobe K, Hoh E. (1993) Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268: 12069–12076.

Yang WJ, Yang DD, Na S, et al. (2005) Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 280: 9330-9335.

Yeh Y-H, Wakili R, Qi XY, Chartier D, et al. (2008) Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 1: 93-102.

Yokoseki O, Yazaki Y, Suzuki J, et al. (2000) Association of matrix metalloproteinase expression and left ventricular function in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 64: 352-7.

Yong M, Fullerton M, Dilley R, et al. (1994) Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 93: 2578-83.

Yu F, Chou CW, Chen CC. (2009) TNF-alpha suppressed TGF-beta-induced CTGF expression by switching the binding preference of p300 from Smad4 to p65. *Cell Signal.* 21: 867-72.

Yue L, Feng J, Gaspo R, et al. (1997) Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.* 81: 512–525.

Yue L, Melnyk P, Gaspo R, et al. (1999) Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res.* 84: 776-84.

Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith et al. (2000) Extracellular signal regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 275: 37895–37901.

Zeisberg M, Yang C, Martino M, et al. (2007) Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 282: 23337-47.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436: 214-220.

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. (2007) MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 282: 14328-14336.