

Université de Montréal

Caractérisation des remodelages arythmogènes affectant les myocytes cardiaques atriaux
dans des modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque droite

Par

Ewen Le Quilliec

Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales, option Sciences Cardiovasculaires

Novembre 2023

© Le Quilliec, 2023 (dépôt Papyrus)

Université de Montréal

Université de Montréal, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation des remodelages arythmogènes affectant les myocytes cardiaques atriaux
dans des modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque droite**

Présenté par

Ewen Le Quilliec

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Catherine Martel, PhD

Président-rapporteur

Dr. Roddy Hiram, PhD

Directeur de recherche

Dr. Guy Rousseau, PhD

Membre du jury

1 Résumé

RATIONNEL : La fibrillation auriculaire (FA) est la forme d'arythmie la plus commune rencontrée en clinique. De nombreux facteurs ou comorbidités comme l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, l'âge ou le diabète peuvent provoquer et/ou aggraver la FA. La maladie du cœur droit (MCD) fait également partie de ces facteurs de risque.

HYPOTHESE : L'inflammation induite par la MCD pourrait être un facteur d'initiation, de maintien et d'aggravation de la FA via la mise en place d'un substrat pro-arythmogène.

METHODES : Une ligature du tronc artériel pulmonaire (LTP) a été effectuée sur des rats Wistar pesant 225-275g pour provoquer une MCD marquée par une hypertrophie et une dilatation ventriculaire droite. Les animaux témoins, n'ont pas subi de ligature. Au 21^e jour après la chirurgie, des études électrophysiologiques et des échocardiographies ont été réalisés *in vivo*. De plus, nous avons effectué de la cartographie optique *ex vivo* sur cœur perfusé et des mesures de contractilité sur des cardiomyocytes (CM) isolés d'oreillette droite (OD), d'oreillette gauche (OG) et de ventricule droit (VD). La fibrose cardiaque et les niveaux de Connexine-43 (Cx-43) ont été quantifiés par analyses histologiques. L'expression des gènes et les niveaux des protéines associées ont été évalués par qPCR et immuno-buvarpage.

RESULTATS : Les échocardiographies ont révélé une hypertrophie et dilatation de l'oreillette droite. Les rats LTP ont montré significativement plus de susceptibilité à la FA que les témoins. L'activité contractile des CM atriaux était augmentée chez les LTP comparés aux témoins. Les coupes histologiques et les analyses par qPCR et d'immunobuvarpage ont démontré une augmentation significative de la fibrose et des marqueurs inflammatoires dans les CM, comme l'interleukine-6, l'interleukine 1 β ou encore l'inflammasome NLRP3, suggérant leur implication dans l'élaboration du profil inflammatoire arythmogène.

CONCLUSION : Cette étude nous a permis de caractériser le modèle LTP au niveau des CM atriaux et de mettre en évidence un remodelage physiologique, électrophysiologique et inflammatoire, ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité à la FA chez les animaux LTP.

Mots-clés : arythmie, fibrillation atriale, électrophysiologie, cardiomyocytes, inflammation, remodelage, hypertrophie.

2 Abstract

RATIONAL: Atrial fibrillation (AF) is the most common type of arrhythmia encountered clinically. Several risk factors such as heart failure, hypertension, age or diabetes can lead to or/worsen AF. Right heart disease (RHD) has also been described among AF risk factors. The mechanisms linking RHD, inflammation and AF are still rarely described in the literature. The main objective of the project is to characterize the proarrhythmogenic cardiomyocyte (CM) remodeling and CM inflammation profile in rat atria affected by RHD.

HYPOTHESIS: RHD-induced inflammation could be a factor for AF initiation, sustainability, and aggravation through development of pro-arrhythmogenic substrate.

METHODS: Pulmonary artery banding (PAB) is surgically performed on Wistar rats weighing 225-275g to induce RHD. Sham animals did not receive the PAB surgery. Cardiac echography and electrophysiological studies are performed *in vivo* on all animals before sacrifice, 21 days post-surgery. Optical mapping was performed *ex vivo* on Langendorff-perfused hearts. Freshly isolated right ventricular (RV), as well as right and left atrial (RA and LA) CM, underwent contractility recording *in vitro*. Histological analyses were performed to assess myocardial fibrosis and Connexin-43 levels. Genes and protein levels were obtained by qPCR and Western-blot analyses respectively.

RESULTS: Compared to sham, PAB rats developed severe right-sided myocardial hypertrophy accompanied by RA and RV dilation as assessed by echocardiography. PAB rats had a significantly increased AF susceptibility and AF episode duration. CM contractility was enhanced in PAB rats compared to sham. Histology and qPCR analyses revealed increased fibrosis and inflammation in RA.

CONCLUSION: This study allowed us to characterize the PAB model in atrial CM and has highlighted physiological, electrophysiological, and inflammatory remodeling, as well as increased AF susceptibility in PAB animals.

Keywords: Arrhythmia, atrial fibrillation, electrophysiology, cardiomyocytes, inflammation, remodeling, hypertrophy.

3 Table des matières

1	Résumé.....	3
2	Abstract	4
3	Table des matières	5
4	Liste des tableaux.....	7
5	Liste des figures.....	8
6	Liste des sigles et abréviations.....	11
7	Remerciements	14
1-	Introduction.....	15
1.1-	Fibrillation auriculaire	15
1.2-	Rôle des Cardiomyocytes dans la FA.....	19
1.3-	Rôle de l'inflammation dans l'arythmogénèse	23
1.4-	Hypothèse.....	25
1.4.1.	Objectifs spécifiques.....	25
2-	Matériels et Méthodes.....	26
2.1-	Modèle animal.....	26
2.2-	Échocardiographie.....	27
2.3-	Études électrophysiologiques	28
2.4-	Isolation cellulaire	30
2.5-	Mesures de contractilité	31
2.6-	Histologie.....	32
2.7-	Immunofluorescence.....	32
2.8-	Imagerie cellulaire.....	32

2.9-	Analyse Connexine-43.....	33
2.10-	Qpcr	33
2.11-	Cartographie optique	34
2.12-	Immuno-buvardage.....	35
2.13-	Analyses statistiques.....	37
3-	Résultats.....	38
3.1-	Analyse des remodelages cardiaques structuraux et électrophysiologiques <i>in vivo</i>	38
3.2-	Analyse de la conduction <i>ex vivo</i>	41
3.3-	Analyse histologique de l'oreillette droite.....	42
3.4-	Analyse de la contractilité des cardiomyocytes.....	44
3.5-	Expression génique et protéique dans les CM atriaux.....	45
4-	Discussion.....	48
4.1-	Remodelages fonctionnels arythmogènes impliquant les CM	48
4.2-	Rôle central des CM dans la fibrose arythmogène	50
4.3-	Rôle des CM dans le dérèglement électrophysiologique.....	51
4.4-	Limites	52
4.5-	Perspectives.....	53
5-	Conclusion	54
6-	Références bibliographiques.....	56
	Annexes.....	69

4 Liste des tableaux

Tableau 1	<i>Tableau des solutions d'immuno-buvar dage</i>	36
Tableau 2	<i>Tableau des protéines et gènes étudiés (PLN : Phospholamban ; TGF-β1 : Transforming Growth Factor- β1 ; IL-6 : interleukine-6 ; IL-1β : interleukine-1β ; NLRP3 : NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 ; RS : réticulum sarcoplasmique).....</i>	37

5 Liste des figures

Figure 1 <i>Facteurs de risque de la FA (adaptée à partir de Camm et al, 2017) ; OG : oreillette gauche, NT-proBNP : N-terminal pro-Brain Natriuretic Peptide (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art).</i>	16
Figure 2 <i>Schéma de la conduction normale et de la conduction lors d'un épisode de FA (adaptée à partir HRS Guide to Atrial Fibrillation ; schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)</i>	18
Figure 3 <i>Schéma du circuit de conduction cardiaque (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)</i>	19
Figure 4 <i>Schéma du potentiel d'action des CM « non-pacemaker » (schéma original réalisé par Ewen Le Quilliec)</i>	20
Figure 5 <i>Schéma du potentiel d'action des CM « pacemaker » (schéma original réalisé par Ewen Le Quilliec)</i>	21
Figure 6 <i>Schéma d'un sarcomère en phase de décontraction et de contraction (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec)</i>	21
Figure 7 <i>Schéma des échanges ioniques majeurs au niveau du cardiomyocyte (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)</i>	22
Figure 8 <i>Schéma représentant un cœur normal et un cœur présentant une dilatation cardiaque droite (adapté à partir de Nakamura&Sadoshima, 2018, réalisée par Ewen Le Quilliec)</i>	23
Figure 9 <i>Schéma de la ligature du tronc artériel pulmonaire (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)</i>	27
Figure 10 <i>Images d'échocardiographies représentatives issues d'un animal témoin (gauche) et d'un animal LTP (droite); LTP : ligature du tronc artériel pulmonaire.</i>	28
Figure 11 <i>Schéma du cathéter transoesophagien; Illustration du protocole de stimulation; Enregistrement représentatif du protocole de stimulation pour les études électrophysiologiques (FA : Fibrillation atriale, RS : rythme sinusal, Sec : seconde, Burst : stimulation; schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)</i>	29

Figure 12 Photographie de la paillasse d'isolation cellulaire; Système de Langendorff : 1 : cuves de solution, 2 : serpent, 3 : canule, 4 : bain-marie, 5 : station de sacrifice, 6 : station d'anesthésie.

31

Figure 13 Tracé représentatif du raccourcissement d'un cardiomyocyte isolé d'un animal témoin (bleu) superposé au tracé d'un animal LTP (rouge) (acquis par Ewen Le Quilliec lors d'une expérience de mesure de contractilité)31

Figure 14 Illustration de la méthode de traitement de l'image pour les mesures de connexine-43; images acquises par Ewen Le Quilliec dans le cadre d'une analyse de détection de Cx-43 avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health)33

Figure 15 Schéma résumé de la répartition des animaux et du nombre d'échantillons par expérience réalisée.37

Figure 16 **Modifications des intervalles**; prolongement de l'intervalle PR, QT et du QTc chez les animaux LTP; Témoins (bleu) n=16; LTP (rouge) n = 16.38

Figure 17 **Augmentation significative du nombre et de la durée des arythmies induites chez les animaux LTP**; pour l'analyse d'arythmies induites Sham n=10 et PAB n=16. FA = fibrillation atriale 39

Figure 18 **La LTP induit une MCD chez les animaux LTP**; Témoins (bleu) n=6 et LTP (rouge) n=6; DODs : dimension de l'oreillette droite en fin de systole); EPVD: épaisseur de la paroi du ventricule droit en fin de diastole).40

Figure 19 Modifications significatives des paramètres de conduction chez les animaux LTP; Témoins (bleu) n=6; LTP (rouge) n = 6; A: analyse de la vitesse de conduction (cm/s), B: durée du potentiel d'action (ms), C: durée de la période réfractaire effective (ms); PA: potentiel d'action; PRE: période réfractaire effective.....41

Figure 20 **Augmentation de l'aide de fibrose et de la dimension de l'oreillette droite ;** Témoins (bleu) n=6 et LTP (rouge) n=6. Résultats du pourcentage d'aire de fibrose de l'OD et dimension de l'OD en fin de systole (DODs). Photos (x20) de lames colorées au trichrome de Masson avec en rouge le tissu musculaire sain et en bleu le collagène.....42

Figure 21 **Remodelage au niveau de la Cx-43 et de la morphologie des CMs ;** Résultats de la taille moyenne des amas (cluster) de Connexine-43 et de l'aire totale occupée par la Connexine-

43 ; Résultats de la longueur, largeur et surface moyenne des CM ; Photos à partir des lames d'immunofluorescence : Connexine-43 (rouge), noyau (bleu), auto-fluorescence des CM (vert). .43

Figure 22 Fonction contractile de cardiomyocytes isolés. Augmentation non-significative de la moyenne du raccourcissement des CMs chez les animaux LTP au niveau de l'OD (LTP n=6; Témoins n=6) et VD (LTP n= 6; Sham n=6); n : CM isolé; OD: oreillette droite; VD: ventricule droit.

44

Figure 23 Modifications non-significatives de l'expression génique ; qPCR réalisée à partir de CM isolés; Témoins (bleu) n=4; LTP (rouge) n = 4. TGF- β 1: Transforming Growth Factor- β 1; IL-6: interleukine-6; IL-1 β : interleukine-1 β ; NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; PLN: phospholambane; Cx43: Connexine-43.45

Figure 24 Modification significative de l'expression protéique d'IL-6 et IL-1 β ; Témoins (bleu) n= 5 ; LTP (rouge) n = 5. Résultats exprimés en fonction du niveau total de chaque protéine ; Gel indiquant les bandes de migration pour chaque protéine.47

Figure 25 Schéma récapitulatif de l'étude. MCD : maladie du cœur droit ; PAP : pression artérielle pulmonaire ; Cx-43 : Connexine-43 ; VC : vitesse de conduction ; DPA : durée du potentiel d'action ; PRE : période réfractaire effective ; FA : fibrillation auriculaire (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art).55

6 Liste des sigles et abréviations

CM : cardiomyocytes

Cx-43 : connexine-43

DAMPs : damage-associated molecular pattern

DODs : dimension de l'oreillette droite en fin de systole

DPA : durée du potentiel d'action

ECG : électrocardiogramme

EPVD : épaisseur de la paroi du ventricule droit en fin de diastole.

FA : fibrillation auriculaire

FB : fibroblaste

IL-1 β : interleukine-1 β

IL-6 : interleukine-6

LAMPs : lifestyle-associated molecular pattern

LTP : ligature du tronc artériel pulmonaire

MCD : maladies du cœur droit

NAV : nœud auriculo-ventriculaire

NLRP3 : NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3

NS : nœud sinusal.

OD : oreillette droite

OG : oreillette gauche

PA : potentiel d'action

PAMPs : pathogen-associated molecular pattern

PAP : pression artérielle pulmonaire

PLN : phospholamban

PRE : période réfractaire effective

RS : rythme sinusal.

RyR : récepteur à la ryanodine

VC : vitesse de conduction

VD : ventricule droit

VG : ventricule gauche

DODs : dimension de l'oreillette droite en fin de systole

7 Remerciements

Merci à toi Roddy, pour ton mentorat pendant ces deux belles années sous ta supervision à l'ICM. Tu m'as apporté beaucoup grâce à ton soutien, tes conseils et tes connaissances. Je te serai toujours reconnaissant pour l'opportunité que tu m'as offerte. C'est un plaisir pour moi de me dire que j'ai fait partie de tes premiers étudiants.

Merci à toi Martin, d'avoir été avant tout dans les premiers à croire en moi mais également le parfait parrain pour ma maîtrise, et de m'avoir permis de découvrir à tes côtés le versant clinique de la cardiologie m'intéressait tant.

Merci à mes camarades et collègues, Charles-Alexandre et Rim, pour la bonne ambiance que l'on a su mettre en place et notre bonne collaboration sur nos projets respectifs.

Merci à l'ensemble du laboratoire Nattel, Yasmine, Patrice, Xiao Yan, Feng, Jiening, Chantal, Kalai, pour toutes leurs connaissances et leurs conseils tout au long de mon projet.

Merci également à l'ensemble du personnel de l'ICM d'avoir su créer un environnement privilégié pour faire des études.

1- Introduction

1.1- Fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire (FA) est la forme d'arythmie la plus commune rencontrée chez les patients dans le cadre clinique (Andrade et al. , 2014). Ce trouble du rythme cardiaque est caractérisé par une tachycardie auriculaire et ventriculaire, généralement supérieur à 100 battements par minute (bpm) et un rythme irrégulier (Bhatt & Fischer, 2015). Ce rythme ultra-rapide et irrégulier peut avoir plusieurs sources : stimulation augmentée par le nœud sinusale (NS) au niveau de l'oreillette droite, des circuits de réentrée physique dans le tissu auriculaire, ou encore des troubles de la conduction intercellulaire (Staerk et al., 2017). Il existe également différents types de fibrillation auriculaire définis en fonction de la durée des épisodes des arythmies. On distingue donc la FA paroxystique définie comme un épisode durant moins de 7 jours ; la FA persistante définie comme un épisode durant plus de 7 jours ; la FA permanente définie comme un épisode durant plus d'un an et ne pouvant être reconverti au rythme cardiaque sinusale normal (Margulescu & Mont, 2017). Il existe un grand nombre de facteurs de risque pouvant influencer ou aggraver la susceptibilité de développer et de maintenir la FA (J. Andrade et al., 2014; Heijman et al., 2021) (Figure 1). Ces causes ou facteurs peuvent être l'âge, l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle et pulmonaire, l'insuffisance cardiaque, les maladies coronariennes, l'apnée du sommeil ou encore les habitudes de vies (tabac, alcool, etc.) (Andrade et al. , 2014; Kornej et al., 2020). La FA s'accompagne de symptômes, qui se manifestent chez les patients, sous forme de palpitations, de fatigue importante, d'essoufflement ou d'étourdissements (Copley & Hill, 2016). Également, il est généralement admis qu'au bout d'un certain temps la FA en elle-même devient un facteur de risque et de maintien de la FA avec l'adage « Atrial fibrillation begets atrial fibrillation », soit littéralement « la fibrillation auriculaire engendre la fibrillation auriculaire » (Wijffels et al., 1995). En effet, une fois les différents circuits de réentrée et les différents substrats pro-arythmogènes mis en place, il devient de plus en plus compliqué au fil du temps de définitivement traiter la FA.

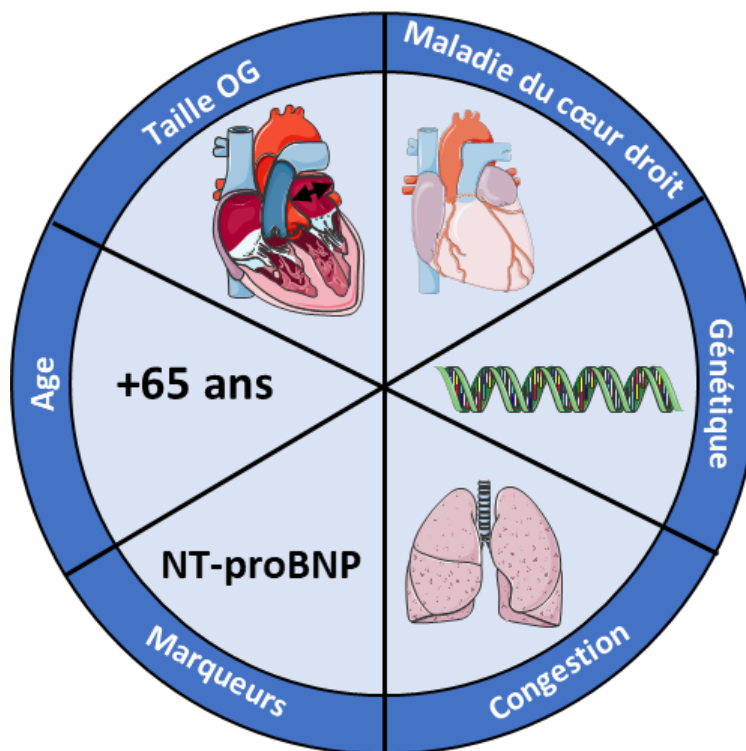


Figure 1 Facteurs de risque de la FA (adaptée à partir de Camm et al, 2017) ; OG : oreillette gauche, NT-proBNP : N-terminal pro-Brain Natriuretic Peptide (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art).

Bien que ce type d'arythmie ne représente pas un danger vital en lui-même, sans une prise en charge appropriée, la mauvaise circulation sanguine dans l'oreillette à cause de battements incomplets augmente les risques de coagulation et de création d'un caillot sanguin (Watson et al., 2009). Par la suite, ce caillot peut se déplacer et voyager, via la circulation sanguine, vers d'autres organes comme les poumons ou le cerveau (Lurie et al., 2021). Les caillots sanguins peuvent alors provoquer des embolies ou des accidents vasculaires cérébraux (Lip et al., 2023). Les patients atteints de FA sont alors traités avec des anticoagulants afin de prévenir le risque d'AVC (Cappato et al., 2014; Rietbrock et al., 2008). Les complications sévères associées à la FA et à la formation de caillots sanguins sont le risque d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde et de mort subite (Waldmann et al., 2020).

La FA ayant comme facteurs de risque ou facteurs d'aggravation d'autres pathologies cardiaques et/ou systémiques, les premières recommandations pour limiter les épisodes de FA sont une

modification des habitudes de vie pour limiter l'impact de ces autres pathologies. Dans le cas où ces changements ne suffisent pas, les traitements en première intention contre la FA consistent à essayer de faire revenir le rythme cardiaque au rythme sinusal (RS), considéré comme le rythme normal (Ioannidis et al., 2021) (Figure 2). Pour ce faire, des traitements médicamenteux (ex : Amiodarone, Sotalol, Flécaïnide, etc) peuvent être administrés pour tenter de contrôler la fréquence cardiaque (Le Heuzey et al., 2010; Murphy et al., 2007). Ces traitements permettent un contrôle du rythme cardiaque en ciblant les canaux ioniques impliqués dans la contraction des CM. Ces médicaments peuvent cibler et bloquer les canaux sodiques (classe Ia, Ib, Ic ; ex : Flécaïnide), les récepteurs bêta-adrénergiques (classe II, ex : Sotalol), en inhibant les canaux potassiques (classe III ; ex : Amiodarone), et les canaux calciques (classe IV, ex : Vérapamil). Une intervention chirurgicale nommée ablation par cathéter à radiofréquence consistant à cautériser le myocarde pour isoler les zones de foyer ectopiques provoquant les épisodes arythmiques peut être recommandée pour rétablir le rythme normal (Hong et al., 2020; Latchamsetty & Morady, 2016). De manière standard, la zone d'ablation privilégiée lors d'une intervention d'ablation par cathéter est le pourtour des veines pulmonaires au niveau de l'oreillette gauche (OG) (Fürnkranz et al., 2014). En effet, au niveau de cette zone de jonction, le tissu contractile et conducteur myocardique peut partiellement s'immiscer dans le tissu conjonctif non contractile et non conducteur des veines pulmonaires. Cette présence de tissu contractile à l'ouverture des veines pulmonaires devient donc une zone plus à risque de générer des troubles de la conduction comme des ectopies ou des circuits de réentrée (J. G. Andrade et al., 2013).

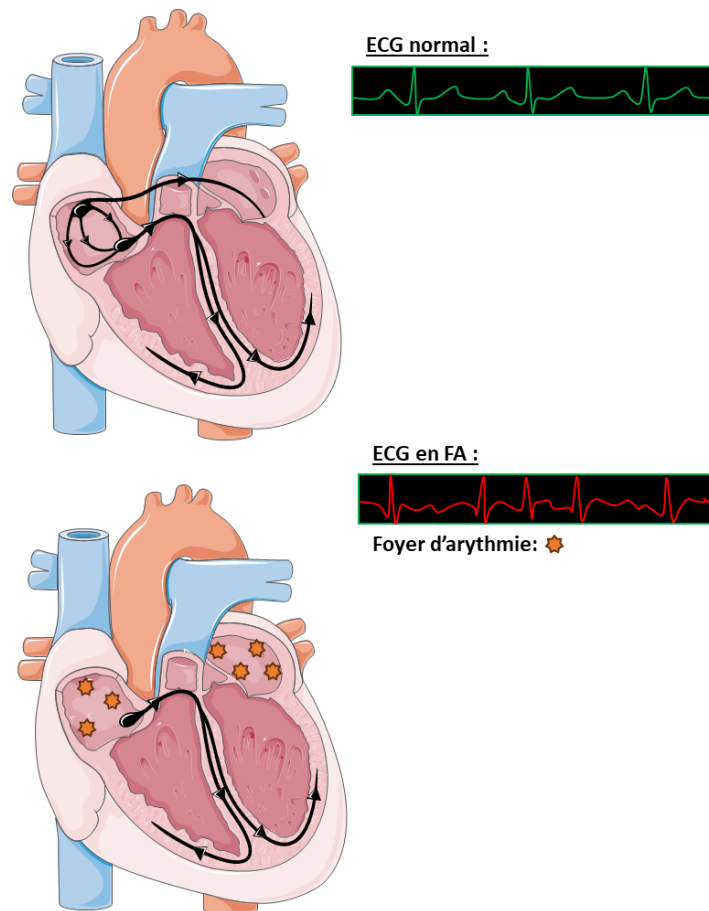


Figure 2 Schéma de la conduction normale et de la conduction lors d'un épisode de FA (adaptée à partir HRS Guide to Atrial Fibrillation ; schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)

Malgré une bonne gestion de la FA avec les traitements et interventions actuellement utilisés, de nouvelles cibles thérapeutiques sont explorées afin de mieux traiter la FA en amont et éviter mise en place de circuits de réentrée et de substrats pro-arythmogènes (Hiram et al., 2021). Les nouvelles cibles privilégiées pour ces nouveaux traitements sont par exemple : le remodelage des cardiomyocytes composant le tissu cardiaque, l'inflammation engendrée par ce remodelage tissulaire ou venant de facteurs systémiques, et la modification du profil inflammatoire atrial et/ou cardiaque (Cunha et al., 2022).

1.2- Rôle des Cardiomyocytes dans la FA

Les cardiomyocytes (CM) sont des cellules musculaires mononucléées ou binucléées contractiles qui confèrent au cœur sa capacité de pomper et de faire circuler le sang à travers l'ensemble du corps. Les CM sont divisés en types: le premier type de CM est capable de se contracter à la suite d'une stimulation électrique provenant de CM adjacents et de propager cette stimulation d'une cellule à l'autre pour permettre une conduction de proche en proche dans l'ensemble du myocarde; le second type de CM est capable de générer une stimulation électrique de manière automatique sans stimulation antérieure (CM « pacemaker ») (Woodcock & Matkovich, 2005). Les CM « pacemaker » sont principalement retrouvés au niveau du nœud sinusal qui génère de manière physiologique le rythme sinusal. On retrouve également des CM « pacemaker » au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (NAV) qui peut générer une stimulation contractile en cas de dysfonctionnement du NS (Baruscotti et al., 2005) (Figure 3).

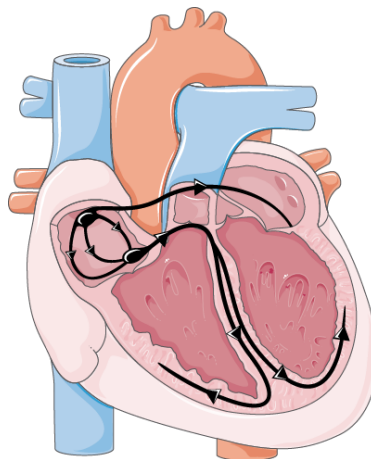


Figure 3 Schéma du circuit de conduction cardiaque (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)

Les CM sont capables de se contracter grâce à un enchaînement rapide et précis d'échange d'ions intracellulaires et extracellulaires, principalement les ions : sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), potassium (K^+); qui va générer une dépolarisation du potentiel membranaire ($\approx -80\text{mV}$ à $\approx +30\text{mV}$) et permettre une contraction et la conduction du potentiel d'action (PA) de proche en proche. Ce potentiel d'action comprend un total de 5 phases pour les PA des CM non- « pacemaker » (Figure 4):

- Phase 0 : phase de dépolarisation rapide partant de -80mV jusqu'à atteindre un potentiel membranaire positif compris entre +20mV et +30mV. Cette dépolarisation rapide est due à une ouverture rapide et au courant I_{Na} de Na^+ via le canal sodique SCN5A voltage dépendant.
- Phase 1 : Repolarisation précoce de la membrane dû à des courants potassiques lents ($I_{to,l}$) et rapides ($I_{to,f}$) via des canaux sodiques voltage dépendants (KCNA4, KCNA7, KCND2,...).
- Phase 2 : Phase de plateau du potentiel membranaire avec un équilibre entre l'activité des canaux potassiques et des canaux calciques voltages dépendants (CACNA1C, CACNA1G, ...).
- Phase 3 : Phase de repolarisation jusqu'au potentiel membranaire basal grâce au courant potassique correcteur I_{k1} .
- Phase 4 : phase de repos avec un potentiel membranaire stable aux alentours de -80mV.

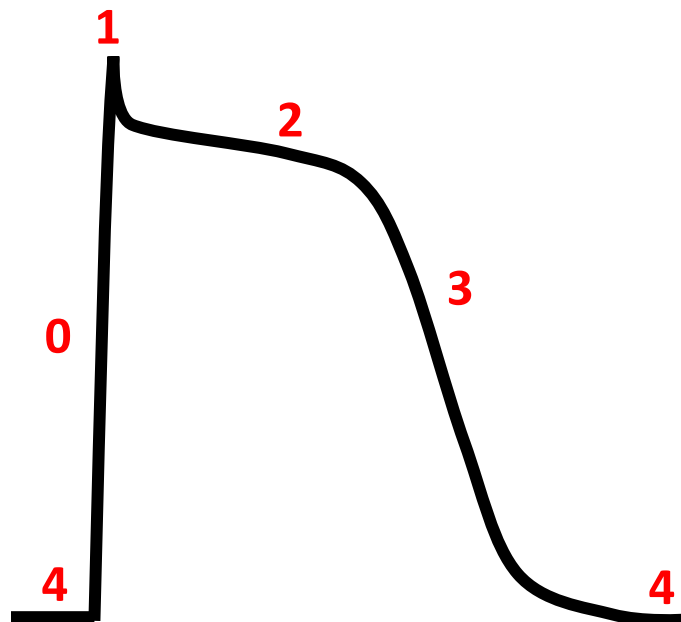


Figure 4 Schéma du potentiel d'action des CM « non-pacemaker » (schéma original réalisé par Ewen Le Quilliec)

A noter également que le PA des cellules « pacemaker » est différent de celui des cellules non-« pacemaker », avec l'absence des phases 1 et phase 2 et la présence d'un courant entrant passif de Na⁺ pour maintenir l'automatisme de la contraction (Figure 5).

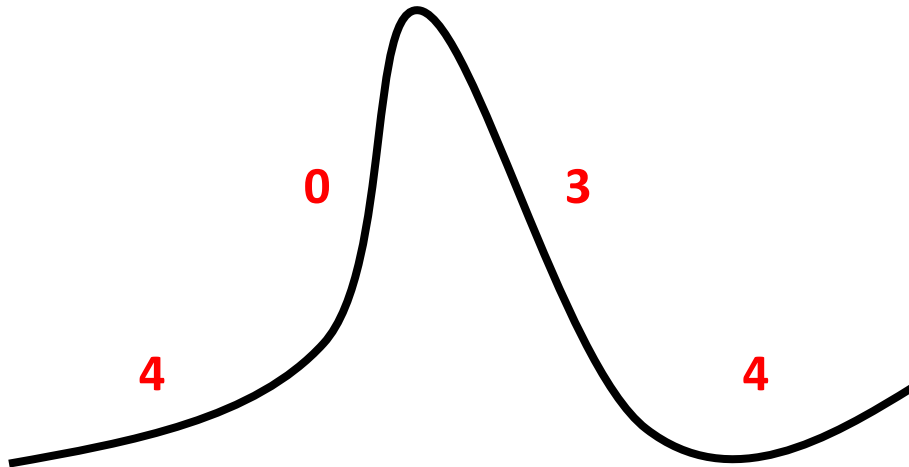


Figure 5 Schéma du potentiel d'action des CM « pacemaker » (schéma original réalisé par Ewen Le Quilliec)

Par la suite, l'ouverture des canaux sodiques extracellulaires et l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule vont provoquer une ouverture des canaux Récepteurs à la Ryanodine (RyR) qui vont à leur tour libérer le Ca²⁺ intracellulaire stocké dans le réticulum sarcoplasmique. Cette augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique va permettre à l'ion calcique de venir interagir avec l'unité contractile du CM : le sarcomère.

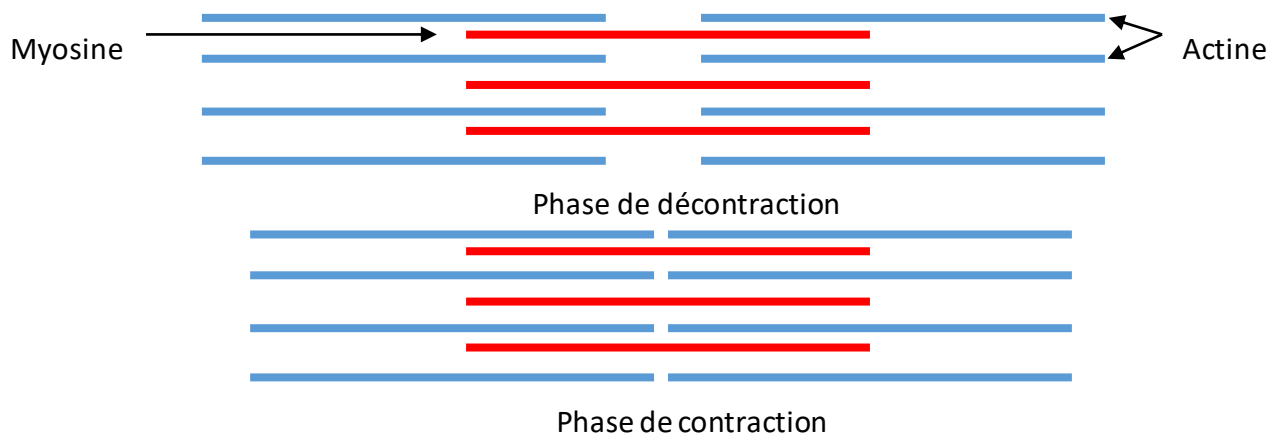


Figure 6 Schéma d'un sarcomère en phase de décontraction et de contraction (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec)

Cet élément à la base de la fonction contractile est composé de deux types de myofilaments : l'actine et la myosine. Ces myofilaments interagissent entre eux pour produire la contraction des fibres musculaires cardiaques. Pour se faire, le Ca^{2+} cytosolique va venir se fixer à la troponine du complexe troponine-tropomyosine présent sur le filament d'actine, et via le changement de conformation de ce complexe troponine-tropomyosine, va rendre le site de fixation actine-myosine disponible (Figure 6).

Pour terminer le cycle de la fonction contractile, le Ca^{2+} cytosolique en excès est restocké dans le réticulum sarcoplasmique via le canal SERCA Ca^{2+} -dépendant. En effet, c'est l'entrée initiale de Ca^{2+} extracellulaire qui active le canal SERCA en se liant à l'unité de phospholamban présente sur le canal SERCA. La fonction contractile est une machinerie finement autorégulée, surtout au niveau de la gestion des échanges calciques intracellulaires et extra cellulaires (Figure 7).

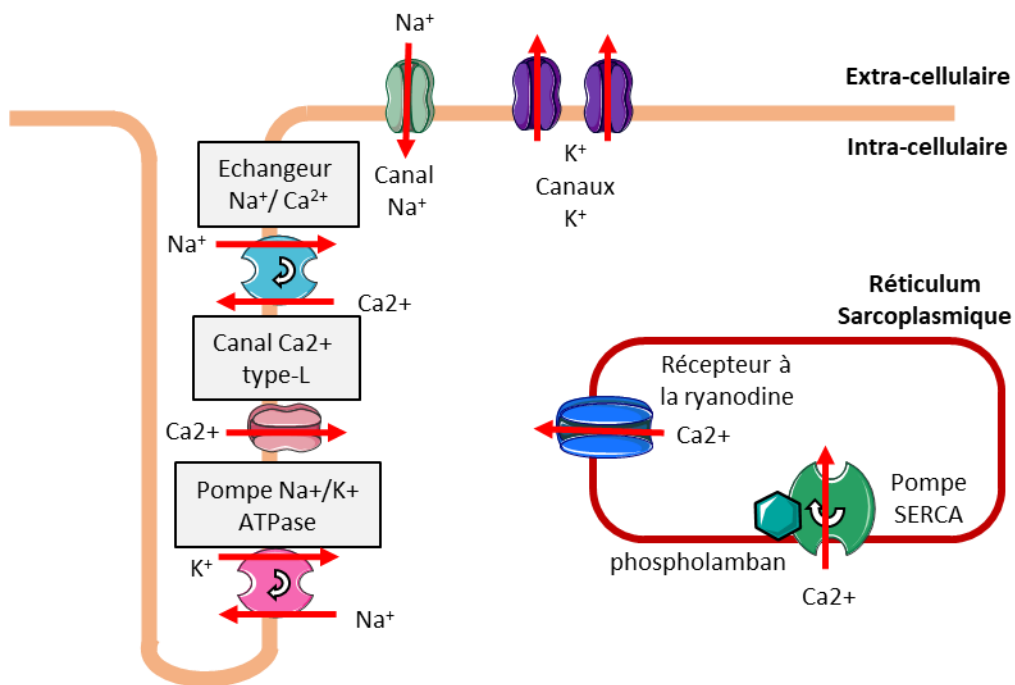


Figure 7 Schéma des échanges ioniques majeurs au niveau du cardiomyocyte (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)

Cependant, la structure et le fonctionnement des CM peuvent être modifiés et/ou perturbés par différentes pathologies. En effet, des pathologies comme l'insuffisance cardiaque droite ou la MCD peuvent provoquer notamment la dilatation des cavités droites du cœur (Hegemann et al.,

2021) (Figure 8). Pour compenser les effets de la pathologie et maintenir au mieux la fonction cardiaque, les CM vont augmenter le nombre de sarcomères, processus appelé sarcomogénèse (Medvedev et al., 2021). Également, le remodelage des CM à cause de l'hypertrophie ou d'autres facteurs peut venir perturber la conduction intercellulaire via les jonctions communicantes, appelés connexines (ex : connexine-43, connexine-45, etc) (Burstein et al., 2009). D'autres pathologies affectant directement les canaux ioniques (syndrome de Brugada, syndrome du long QT, etc.) peuvent aussi venir grandement perturber la fonction contractile des cardiomyocytes voir s'avérer mortelle (Aguilar et al., 2015; Algalarrondo & Nattel, 2016; Glasscock et al., 2015).

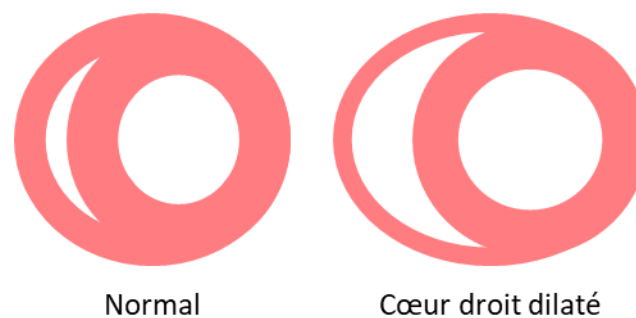


Figure 8 Schéma représentant un cœur normal et un cœur présentant une dilatation cardiaque droite (adapté à partir de Nakamura&Sadoshima, 2018, réalisée par Ewen Le Quilliec)

1.3- Rôle de l'inflammation dans l'arythmogénèse

Depuis plus de 20 ans il est reconnu que la fibrose joue un rôle majeur dans la FA (Frustaci et al., 1997), cependant, les mécanismes pour traiter et réduire cette fibrose sont bien moins connus. Néanmoins, nous savons qu'une inflammation chronique engendre la mise en place de cette fibrose (Kumagai et al., 2004). Il est donc maintenant intéressant de considérer l'inflammation comme un facteur de risque de la FA et de d'étudier la prévention de l'inflammation, et ainsi, de prévenir l'apparition de fibrose et des troubles arythmiques qui lui sont associés. Des études cliniques et expérimentales récentes ont permis d'identifier de nouvelles cibles impliquées dans la mise en place du statut inflammatoire et qui seraient associées à l'augmentation de l'incidence de la FA (Hiram et al., 2021). Parmi les facteurs pro-inflammatoires qui émergent comme jouant un rôle important dans la FA, l'inflammasome NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) a été décrit comme étant impliqué dans la mise en place du substrat arythmogène au

niveau des CM, des fibroblastes (FB) et des macrophages atriaux (Demidowich et al., 2016; Scott Jr et al., 2021; Yao et al., 2018). L'inflammasome NLRP3 est également directement impliqué dans la production d'IL-1 β , dans la mise en place l'inflammation locale cardiaque et de l'hypertrophie cardiaque associée (Higashikuni et al., 2023). Dans les dernières années, l'impact et les interactions au niveau du tissu cardiaque provoqués par l'inflammation résultant de maladies systémiques comme l'obésité ou le diabète a été considérablement décrit dans la mise en place de la FA (Chaar et al., 2022). Plus localement, l'inflammation cardiaque provoquée par d'autres maladies cardiaques comme les maladies du cœur droit (MCD), l'insuffisance cardiaque ou l'infarctus du myocarde a été décrite comme ayant un rôle important sur le développement et le maintien de la FA (Hiram et al., 2019). En plus du NLRP3, d'autres marqueurs de l'inflammation cardiaque comme l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-1 β (IL-1 β), et leurs précurseurs, constituent de nouvelles cibles privilégiées pour la compréhension de la physiopathologie de la FA (Abe et al., 2018). Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui orchestrent les anomalies du rythme cardiaque et qui affectent les différents types cellulaires cardiaques, notamment les FB et les CM jusqu'à provoquer la FA, demeurent mal compris (Heijman et al., 2020; Yao et al., 2018).

Afin de venir traiter cette inflammation au niveau cardiaque et systémique dans un contexte de FA, un certain nombre de traitements anti-inflammatoires ont été considérés. Un dénominateur commun au traitement de l'inflammation dans le contexte de la FA est l'inflammasome NLRP3 précédemment décrit. En effet, étant à l'origine de la production et de l'activation de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires, un traitement pouvant l'inhiber ou le contrôler serait novateur. Certains de ces traitements sont déjà connus et utilisés dans d'autres contextes que la FA, comme l'aspirine (Zhou et al., 2019) ou les glucocorticoïdes (Liu et al., 1999). Cependant, ces traitements présentent également des effets indésirables, qui limitent ou disqualifient leur utilisation. C'est pour cela que les études sur des nouveaux traitements inhibant l'activité de l'inflammasome NLRP3 continuent. Dernièrement, de nouvelles perspectives de traitements anti-inflammatoires apparaissent sous la forme des résolvines (Hiram et al., 2021) ou d'un traitement déjà utilisé pour la péricardites, la colchicine (Ahmed et al., 2023; Ge et al., 2022; Liang et al., 2019). Néanmoins, leur efficacité reste à être prouver. L'approfondissement des connaissances sur le rôle de

l'inflammation dans des contextes précis et spécifiques comme la FA, et des possibles traitements associés est encore nécessaire.

1.4- Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse que les CM issus de rats Wistar souffrant d'insuffisance cardiaque droite présentent une physiologie, une électrophysiologie et un profil inflammatoire typique qui influencerait la machinerie calcique intracellulaire favorisant la susceptibilité à la FA.

1.4.1. Objectifs spécifiques

A partir de CM fraîchement isolées de rats Wistar témoins ou LTP (ligature du tronc artériel pulmonaire) chez lesquels une insuffisance cardiaque droite aura été induite chirurgicalement, nous souhaitons :

Objectif 1 : étudier l'impact du remodelage morphologique, physiologique et électrophysiologique au niveau des CM atriaux, plus spécifiquement des CM atriaux droits.

- Sous-objectif 1 : étudier *in vivo* les modifications de pressions au niveau du tronc pulmonaire, et *in vivo* et *ex vivo* la dimension des cavités cardiaques.
- Sous-objectif 2 : étudier *in vivo* la susceptibilité à la FA entre les animaux témoins et LTP, et explorer au niveau tissulaire, cellulaire et intracellulaire les différences électrophysiologiques entre ces deux groupes. Étudier les modifications de la fonction contractile chez les cardiomyocytes isolés.

Objectif 2 : Étudier au niveau des CM atriaux la mise en place de la fibrose et d'un profil inflammatoire spécifique de l'insuffisance cardiaque droite :

- Sous-objectif 1 : caractériser la fibrose au niveau des CM atriaux droits entre animaux témoins et LTP
- Sous-objectif 2 : caractériser le profil inflammatoire et les différences de ce profil entre les animaux témoins et LTP.

2- Matériels et Méthodes

2.1- Modèle animal

Les expérimentations et le traitement des animaux ont été approuvés par le Comité d'Éthique Animale de l'Institut de Cardiologie de Montréal, ainsi que par le Comité Scientifique et ont été réalisés conformément aux directives du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et des Bonnes Pratiques de Recherche. Le numéro d'approbation est 2021-47-01.

Des rats Wistar adultes pesant 225-275g ont été obtenus des laboratoires Charles River (Montréal, Québec). Les animaux ont été répartis dans deux groupes : contrôle ou LTP (Figure 9). Les animaux du groupe LTP ont subi une chirurgie de ligature partielle du tronc pulmonaire, réduisant de 60% le diamètre du tronc pulmonaire et laissant un passage sanguin de 1mm de diamètre (Akazawa et al., 2020). Cette procédure consiste à tout d'abord faire une incision de la peau sur le flanc gauche de l'animal en dessous du membre antérieur gauche. Ensuite, le tissu musculaire a été disséqué et séparé à l'aide de ciseaux et d'une pince. Par la suite, une incision d'environ un centimètre a été réalisée entre la troisième et quatrième côte pour accéder à la cavité thoracique. Une fois l'aorte repérée et dégagée du reste du tissu adipeux, une aiguille 19G (diamètre de 1 mm) a été positionnée de manière parallèle à l'aorte. Un total de trois points de ligature ont été réalisés autour de l'aiguille pour créer une ligature partielle du tronc artériel pulmonaire. Une fois les points en place, l'aiguille a été retirée et l'animal a été suturé.

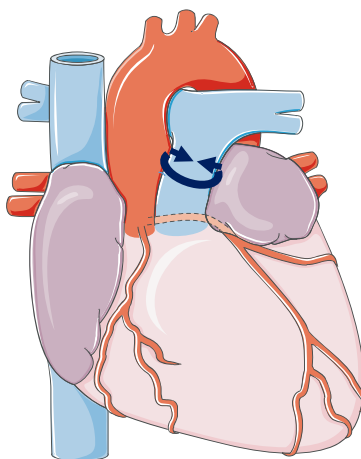


Figure 9 Schéma de la ligature du tronc artériel pulmonaire (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)

Les animaux contrôles ont subi la même intervention sans réaliser de points de ligature partielle autour de l'aorte. A J21 post-chirurgie, des échocardiographies ont été réalisées et ainsi que des études électrophysiologiques transoesophagiennes (EPS) *in vivo*. Pendant les expérimentations *in vivo*, les animaux ont été anesthésiés par inhalation de 3% isoflurane et 2L/min O₂. Pour les expérimentations *ex vivo*, les rats ont été euthanasiés par inhalation de 3% isoflurane et 2L/min O₂ suivi par l'excision du cœur. Par la suite, ont été réalisées la cartographie optique et l'isolation cellulaire sur cœur isolé et perfusé au système de Langendorff. Les FB et CM isolés ont soit été utilisés et cultivés *in vitro* directement après l'isolation ou ont soit été congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure pour la qPCR et l'immuno-buvarpage. Certains cœurs n'ont pas subi d'isolation cellulaire et le tissu cardiaque a alors été collecté et a été soit fixé dans la formaline (10%) ou préservé à -80°C.

2.2- Échocardiographie

Les échocardiographies ont été réalisées avec la sonde GE 10S (4,5-11,5MHz) du système GE Vivid 7 Dimension (GE Healthcare UltrasoundHorten, Norvège). Cela a permis d'obtenir des enregistrements pour les dimensions télésystolique (DOGs : dimension de l'oreillette gauche en fin de systole; DODs : dimension de l'oreillette droite en fin de systole) et télédiastolique (DOGd : dimension de l'oreillette gauche en fin de diastole; DODd : dimension de l'oreillette droite en fin de diastole) de l'oreillette droite et l'oreillette gauche, l'excursion systolique de l'anneau

tricuspide (ESAT), la régurgitation tricuspidiene, l'épaisseur des parois ventriculaire droites et gauches (EPVD, EPVG), les dimensions des ventricules (DVD, DVG), la fraction d'éjection des ventricules et la circulation dans l'artère pulmonaire (Figure 10).

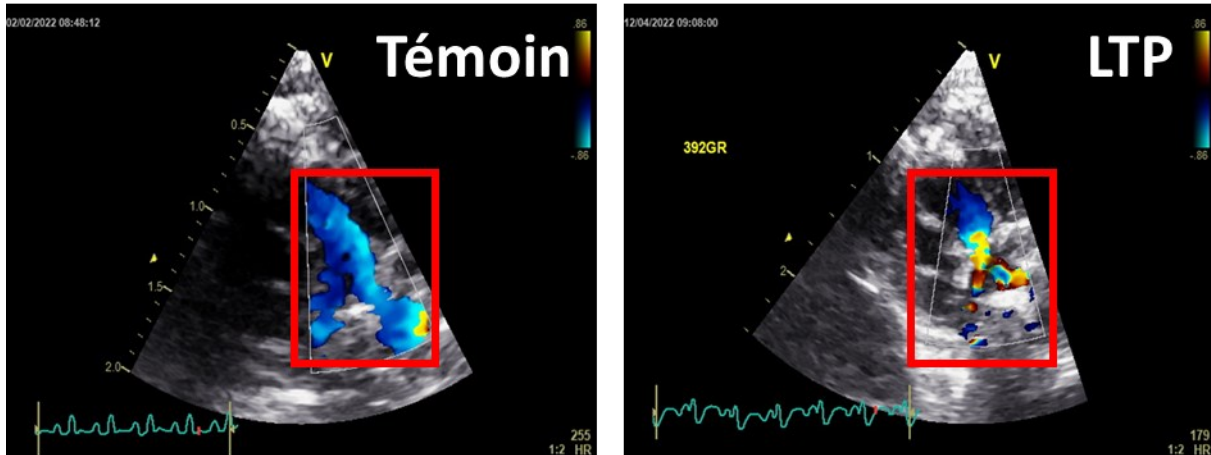


Figure 10 Images d'échocardiographies représentatives issues d'un animal témoin (gauche) et d'un animal LTP (droite); LTP : ligature du tronc artériel pulmonaire.

2.3- Études électrophysiologiques

Des études électrophysiologiques transoesophagiennes ont été réalisées avec un cathéter 4-Fr quadripolaire/2-mm distances interpolaires (St. Jude Medical). Une série comprenant 12 stimulations atriales de trois secondes chacune à 50Hz (4 fois les courants seuils) séparés par des intervalles de repos de deux secondes a été réalisée. Trois séries de stimulations ont été réalisées pour chaque rat et chaque série était séparée d'une minute de pause. La FA était définie par un rythme atrial irrégulier ultra-rapide (>600-800 bpm). Le flutter atrial était défini par un rythme atrial régulier et rapide marqué par des intervalles R-R réguliers entre lesquels il y avait soit aucun, soit une ou plusieurs pseudo-ondes P. Pour être considéré, l'épisode arythmique devait durer une seconde ou plus. Quand un épisode dépassait une durée de deux secondes, la stimulation suivante était suspendue pour ne pas interrompre l'épisode arythmique et permettre d'en apprécier la durée complète. L'enregistrement et l'analyse ont été effectués sur le logiciel Iox2 (version 2.8.0.13, EMKA technologies, France) (Figure 11).

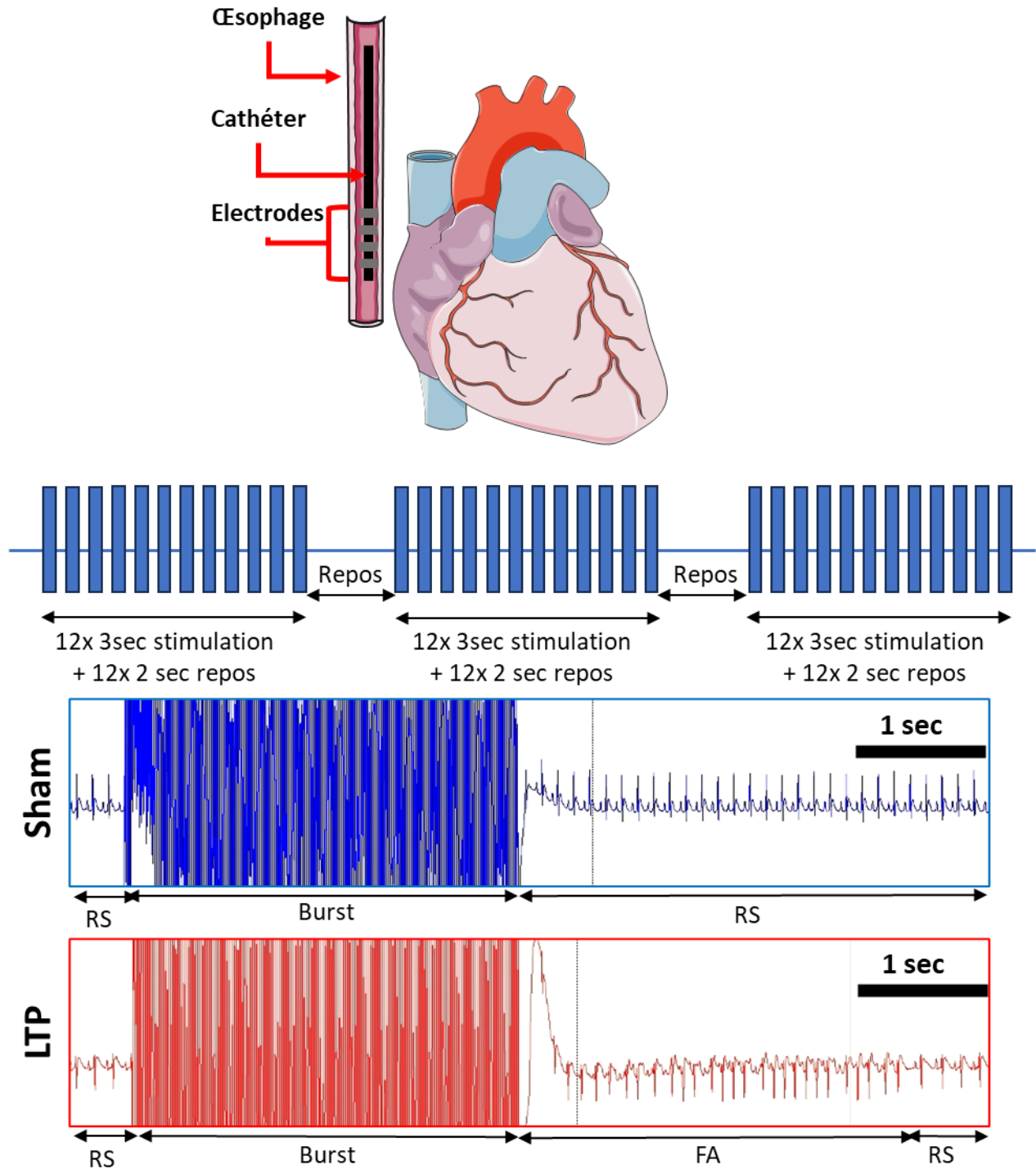


Figure 11 Schéma du cathéter transoesophagien; Illustration du protocole de stimulation; Enregistrement représentatif du protocole de stimulation pour les études électrophysiologiques (FA : Fibrillation atriale, RS : rythme sinusal, Sec : seconde, Burst : stimulation; schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art)

Figure 12 Photographie de la paillasse d'isolation cellulaire; Système de Langendorff : 1 : cuves de solution, 2 : serpentín, 3 : canule, 4 : bain-marie, 5 : station de sacrifice, 6 : station d'anesthésie.

2.5- Mesures de contractilité

Les cellules fraîchement isolées ont été exposées à un protocole de réentrée calcique progressive jusqu'à 200 Mm. Après la réentrée calcique, les cellules ont été placées dans l'installation 'Myocyte Calcium and Contractility' System (IonOptix, Westwood, MA, États-Unis). Pour évaluer la contractilité des cardiomyocytes (CM) isolés, les cellules ont été exposées à une stimulation électrique de 15-25 V à une fréquence de 1 Hz. Les mesures de contractilité (μm) et le pourcentage de contractilité (%) ont été enregistrés et analysés avec le logiciel IonWizard (IonOptix, Westwood, MA, États-Unis) (Figure 13).

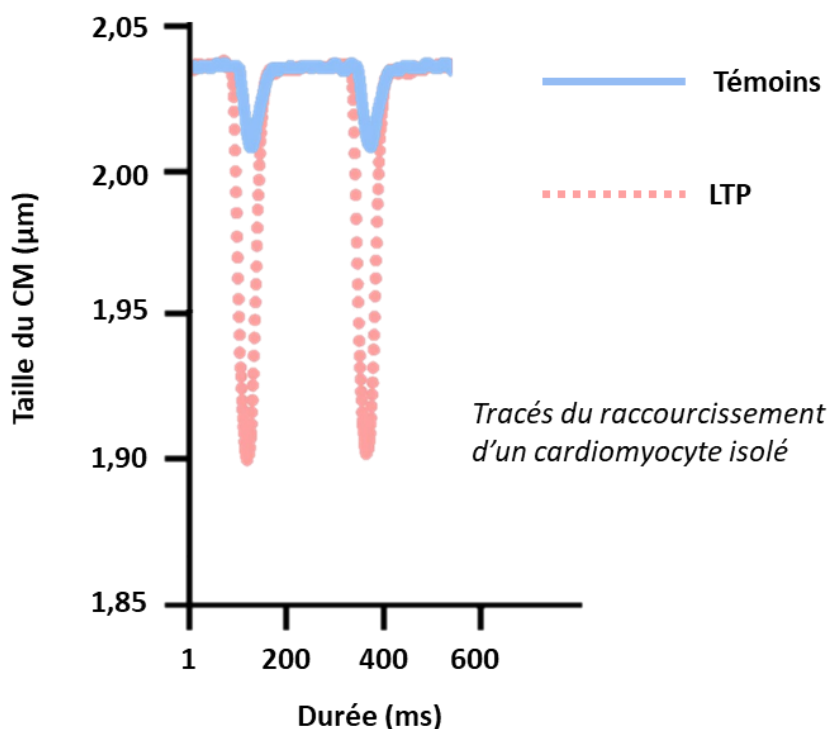


Figure 13 Tracé représentatif du raccourcissement d'un cardiomyocyte isolé d'un animal témoin (bleu) superposé au tracé d'un animal LTP (rouge) (acquis par Ewen Le Quilliec lors d'une expérience de mesure de contractilité)

2.6- Histologie

Les échantillons ventriculaires ont été disséqués en coupes transversales afin de pouvoir apprécier par morphométrie, l'hypertrophie développée au niveau de la paroi, dans la condition LTP comparée aux témoins. Les tissus atriaux précédemment prélevés et fixés dans la formaline ont été enrobés dans la paraffine, taillés à une épaisseur de 6 μm et colorés au trichrome de Masson. Les lames colorées ont été photographiées et analysées pour quantifier la superficie de la fibrose avec le logiciel Image Pro Premier 9.3 (MediaCybernetics, MD).

En parallèle, un protocole d'immunofluorescence pour la connexine-43 (Cx-43) a été réalisé à partir des mêmes échantillons tissulaires.

2.7- Immunofluorescence

Pour l'analyse par immunofluorescence, des lames blanches d'histologie de tissu atrial entier d'oreillette droite ont été réalisées pour chaque groupe d'animaux. Un marquage spécifique a été effectué avec l'anticorps polyclonal anti-Connexine-43/GJA1 (concentration IF : 1/100-1/500; Abcam : ab230537).

2.8- Imagerie cellulaire

Les images d'immunofluorescence de connexine-43 ont été captées avec un microscope confocal (Zeiss LSM 710) en utilisant le logiciel ZEN 2011 et un objectif à l'huile Plan – Aplanachromat 40x/1.3. Des lasers Diode 405 nm, Argon 488nm et Helium-Neon 543 nm ont été utilisés pour exciter les molécules fluorescentes DAPI, Alexa 488 et Alexa 555 respectivement. Les images en projection maximale ont été produites avec des empilements d'images en direction Z séparées de 0.3 μm et le logiciel Zen 2011.

Afin d'évaluer le remodelage des jonctions intercellulaire Cx-43 et ainsi que de mesurer les données morphométriques des CM atriaux, le technicien du laboratoire de microscopie confocal a manuellement repéré et enregistré les zones d'intérêt sur les lames de tissu marquées. Le logiciel utilisé permet d'enregistrer plusieurs types d'image : soit en fonction de la longueur d'onde ou soit couche par couche à travers le tissu étudié.

2.9- Analyse Connexine-43

Pour effectuer les analyses des niveaux de Cx-43 chez les animaux LTP et témoins, nous avons utilisé le logiciel de traitement d'image ImageJ. Tout d'abord, une l'échelle de mesure et un seuil ont été choisis pour uniquement conserver les éléments marqués par l'élément fluorescent. Une fois les éléments d'intérêt isolés, l'image est convertie en données binaires en noir et blanc. Ensuite, uniquement le contour des éléments isolés est conservé pour faire la mesure de l'aire qu'occupent les éléments isolés par rapport à la surface totale de l'image. De même, le logiciel ImageJ a aussi servi pour les mesures morphométriques des cardiomyocytes sur les mêmes lames d'immunofluorescence (Figure 14).

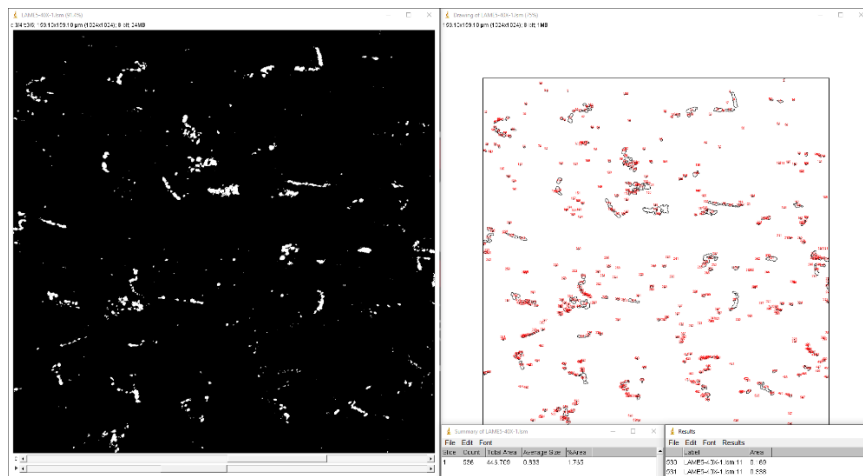


Figure 14 *Illustration de la méthode de traitement de l'image pour les mesures de connexine-43; images acquises par Ewen Le Quilliec dans le cadre d'une analyse de détection de Cx-43 avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health)*

2.10- Qpcr

Les échantillons proviennent de CM fraîchement isolés ou de tissus congelés dans de l'azote liquide. Ensuite, pour les échantillons cellulaires, les cellules sont décongelées remises en suspension avec un vortex, et pour les échantillons tissulaires le tissu est décongelé et broyé à l'aide d'un polytron. En utilisant la solution obtenue à l'étape précédente, les cellules sont lysées avec une solution de lyse RA1 du kit Nucleospin® RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Dueren, Allemagne). L'ARN est ensuite extrait en utilisant le même kit. Puis, on effectue une rétro-

transcription sur un échantillon de 250 ng d'ARN en utilisant le kit Applied Biosystems™ High-Capacity Cdna Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific, Watham, MA, États-Unis). A partir de ces tubes de rétro-transcription, on a dilué le contenu pour obtenir une concentration finale de 2 ng/μL d'ADNc. La Qpcr a été réalisée avec le StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Watham, MA, États-Unis). Nous avons utilisé des amorces pour le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF-β1), interleukine 6 (IL-6), interleukine 1 bêta (IL-1β), sous-unité alpha d'un canal sodique, voltage dépendant, de type V (SCN5A), sous-unité primaire d'un canal potassique voltage dépendant (KCNQ1), sous-unité alpha 1C d'un canal calcique, voltage dépendant, de type L (CACNA1C), connexine-43 (CX-43), NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3 (NLRP3), phospholambane (PLN), récepteur ryanodine (RYR2), réticulum sarcoplasmique Ca²⁺-ATPase (SERCA2A). Pour chacun des gènes étudiés, nous avons utilisé l'amorce Master Mix Sybr Green (ThermoFisher Scientific : 4309155).

2.11- Cartographie optique

La cartographie optique a été réalisée sur des cœurs excisés et ensuite l'artère coronaire droite a été canulée et perfusée avec une solution de Krebs (Mm : 120 NaCl, 4 KCl, 1.2 MgSO₄ 0.7, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 5.5 glucose, 1.25 CaCl₂, 95 % O₂/5 % CO₂) à un débit de 20 ml/min et à température de 37°C. Ensuite le cœur est perfusé avec une solution de di-4-ANEPPS la fonction électromécanique est arrêtée avec de la blebbistatine (15 μM) (Biotium, CA). Le tissu est alors stimulé avec un laser (Thorlabs, Newton, NJ) émettant à une longueur d'onde de 520 ± 45 nm. La lumière émise a été filtrée en utilisant un filtre pour di-4-ANEPPS à 700 ± 35 nm. La fluorescence a été enregistrée une caméra (CardioCCD, Redshirt Imaging) mise au point sur un carré de 1.5 × 1.5. Pour stimuler le tissu, une paire d'électrode bipolaire a été placée dans la partie supérieure de l'oreillette droite. Pour la stimulation basale, le stimulus était d'une durée de 2ms à un courant de 1,5 fois le courant seuil. Afin de mesurer la vitesse de conduction (CV : conduction velocity) et la durée du PA (APD : action potential duration) la stimulation a été programmé à différentes durées successives : 500, 400, 300 et 200 ms. La FA a été induite en utilisant une stimulation à 20Hz. Nous avons qualifié de FA induite tout rythme atrial rapide (>300 bpm) et irrégulier durant plus de 5s. Les épisodes d'arythmie (FA ou Flutter) induits durant plus de 20 minutes ont été

arrêtés en perfusant le cœur avec une solution froide de Krebs. Les données ont été enregistrées et traitées en utilisant le logiciel Matlab (The MathWorks).

2.12- Immuno-buvardage

Les analyses d'immuno-buvardage ont été réalisées sur des échantillons de CM isolés puis instantanément congelés avec de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Pour l'immuno-buvardage les cellules ont été rincées au PBS pour retirer milieu d'isolation. Ensuite 100 µL de tampon de lyse (150Mm NaCl, 50Mm Tris-HCl Ph7.5, 0.1% TritonX-100,10% glycerol, 0.1%SDS, 1 Mm phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) et 10µl de Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X (Thermo Scientific) dans 1Ml de tampon, 1% phosphatase inhibitor cocktail 3 (Thermo Scientific). Après centrifugation à 12 000G pendant 10 minutes, le surnageant est collecté et conservé à -20°C pour la suite. En amont, un test de quantité de protéines est réalisé avec le kit Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 450 Ml (Bio-Rad). Ensuite, pour la migration sur gel, les conditions de dénaturation étaient de 95°C pendant 5 minutes. Les protéines ont été séparées via électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Pour les molécules de faible poids moléculaire un gel de 4-20% a été utilisé, alors que pour les molécules à plus grand poids moléculaire un gel de 4-15% a été utilisé (Bio-Rad). Les paramètres de l'électrophorèse étaient de 120V pendant 70 minutes. Par la suite, le transfert a été réalisé sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à 70V pendant 70 minutes dans des bacs de transferts (Bio-Rad). La quantification des protéines totales a été réalisée en utilisant le No-Stain Protein Labeling Reagent (Invitrogen) et détectée sur le système d'imagerie ChemiDoc (Bio-Rad). Pour finir, le buvardage la membrane a été figé avec une solution de TTBS contenant 5% de BSA pendant 60 minutes à 20-25°C avec agitation constante. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire pendant 2h, et après rinçage abondant, avec l'anticorps secondaire pendant 1h, en finissant par dernier protocole de rinçage. Les membranes traitées ont été exposées au substrat chimiluminescent SuperSignal™ West pico PLUS (Thermo Scientific) et la chimiluminescence a été mesurée en utilisant le système d'imagerie ChemiDoc (Bio-Rad) et l'intensité des bandes a été mesurée avec le logiciel ImageLab (Bio-Rad).

Solution	Composition
10X TBS	24 g Tris, 88 g NaCl, dilué dans 900 ML d'eau distillée (ddH2O) à Ph 7,6
1X TTBS	10X TBS 100 ML, ddH2O 900 ML, Tween 20 1 ML, Ph entre 7,3 et 7,5
Tampon de charge 5X 10ML	Tris (0,5 M, Ph : 6,8) :2,5 ML ; glycerol : 2,6 ML ; SDS(10%) :4 ML ; DTT :0,5 g ; bleu de bromophénol :0,01 g
Tampon de migration 10X	Tris :30,3 g, glycine :144 g, ddH2O :1000 ML
Tampon de migration 1X	Tampon 10X :100 ML ;20% SDS :5 ML ; ddH2O : 890 ML
Tampon de transfert 1X	Tampon 10X :100 ML ; ethanol :200 ML ; ddH2O :700 ML

Tableau 1 *Tableau des solutions d'immuno-buvardage*

Gène	Protéine	Fonction
SCN5A	Canal NaV1.5	Courant Na ⁺ entrant
CACNA1C	Canal CaV1.2	Courant Ca ²⁺ entrant
KCNQ1	Canal KVLQT1	Courant correcteur K ⁺ sortant
RYR2	Canal RYR2	Libération de Ca ²⁺ depuis le RS dans le cytosol
SERCA2A	Pompe SERCA	Restockage de Ca ²⁺ dans le RS
PLN	Phospholamban	Inhibition de la pompe SERCA
TGFb1	TGF-β1	Prolifération, différenciation et croissance cellulaire
IL-6	IL-6	Réponse inflammatoire
IL-1β	IL-1β	Réponse inflammatoire
NLRP3	NLRP3-inflammasome	Réponse inflammatoire

Tableau 2 Tableau des protéines et gènes étudiés (PLN : Phospholamban ; TGF- β 1 : Transforming Growth Factor- β 1 ; IL-6 : interleukine-6 ; IL-1 β : interleukine-1 β ; NLRP3 : NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 ; RS : réticulum sarcoplasmique)

2.13- Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). Pour déterminer si la distribution suit une loi normale, des tests de Shapiro-Wilk ont été utilisés. Pour comparer des données qui ne suivaient pas une loi normale des tests non-paramétriques ont été utilisés. Les valeurs de vitesse de conduction (VC) et de durée de potentiel d'action à 80% (DPA80) ont été comparées en utilisant un test d'One-way ANOVA avec correction post-hoc de Bonferroni. Le test de Fisher a été utilisé pour les analyses catégoriques, comme la différence de vulnérabilité à la FA entre les groupes. Le test de de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la durée des épisodes de FA. Une valeur-p de $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Pour les autres analyses, un test de Mann-Whitney ou un t-test de Student en utilisant le plus pertinent en fonction des analyses effectuées. Sur les graphiques, l'erreur type de la moyenne (SEM) est représentée.

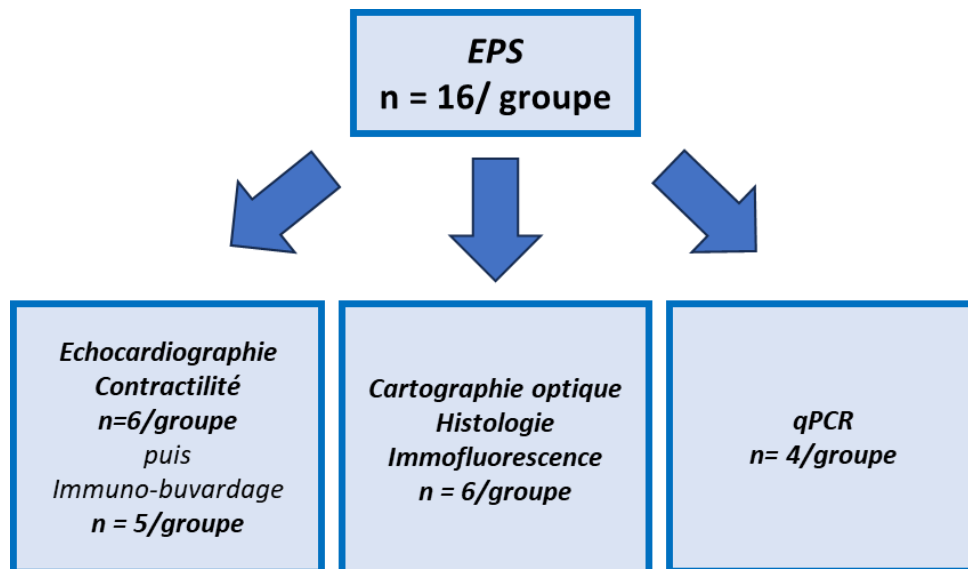


Figure 15 Schéma résumé de la répartition des animaux et du nombre d'échantillons par expérience réalisée.

3- Résultats

3.1- Analyse des remodelages cardiaques structuraux et électrophysiologiques *in vivo*

Pour nous permettre d'observer l'impact éventuel du remodelage provoqué par la procédure de LTP, nous avons en parallèle de ces résultats d'échocardiographie, nous avons également enregistré les données d'études électrophysiologiques *in vivo* chez les animaux témoins et LTP. Tout d'abords, après l'analyse des électrocardiogrammes (ECG) enregistrés chez les animaux témoins et LTP, nous avons observé une augmentation significative de 13% de l'intervalle PR, de 13% de l'intervalle QT chez les animaux LTP. Pour tenir compte du rythme cardiaque élevé physiologique des rats, nous avons calculé grâce à la formule de Fridericia ($QTc = QT / RR^{1/3}$) l'intervalle QT corrigé (QTc) et nous avons aussi observé une augmentation significative de 9% du QTc chez les animaux LTP (Fridericia, 2003). Pour les autres paramètres d'analyse des ECG tel que la durée de l'onde P, l'intervalle PR, la durée du complexe QRS et l'intervalle RR aucune différence significative n'a été observé (Figure 16).

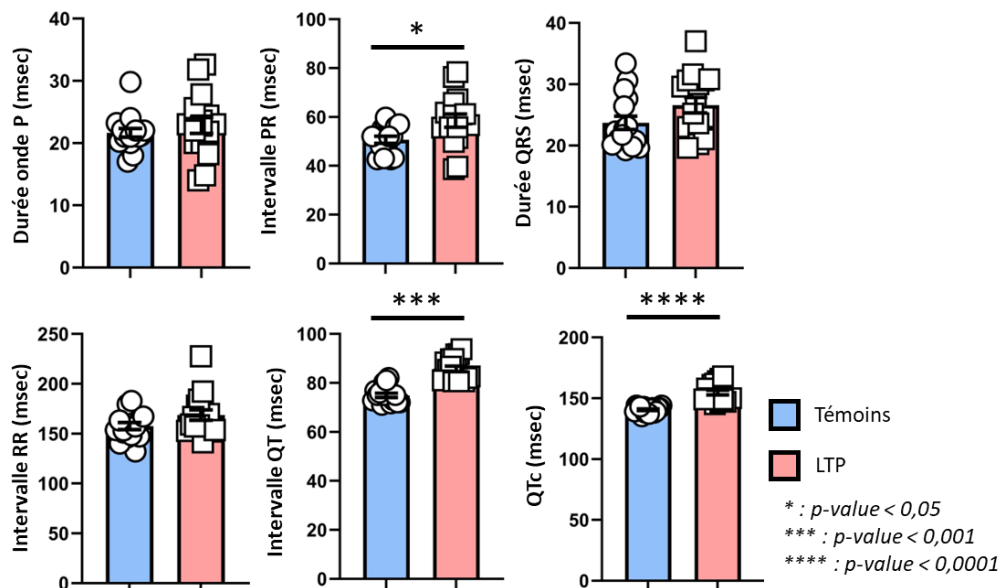


Figure 16 *Modifications des intervalles; prolongement de l'intervalle PR, QT et du QTc chez les animaux LTP; Témoins (bleu) n=16; LTP (rouge) n = 16.*

Notre étude se portant également sur l'impact d'un remodelage induit par les MCD dans un contexte de FA, lors des études électrophysiologiques, des protocoles de stimulation ont été réalisés pour évaluer la susceptibilité des animaux aux arythmies atriales dont la FA. Chez les animaux témoins (n= 16), aucun épisode d'arythmie induite (fibrillation atriale, flutter atrial ou combinaison des deux) par le protocole de stimulation n'a été observé. Chez les animaux LTP (n=16), des épisodes de FA ont été observés chez 6 de ces animaux, des épisodes de FA et de flutters atriaux ont été observés chez 2 de ces animaux, et aucun épisode d'arythmie n'a été observé chez les 8 derniers animaux. Les études électrophysiologiques ont également permis de mesurer la durée moyenne des épisodes d'arythmie induite. Chez les animaux LTP, ces épisodes duraient en moyenne entre 10 et 15 secondes. (Figure 17).

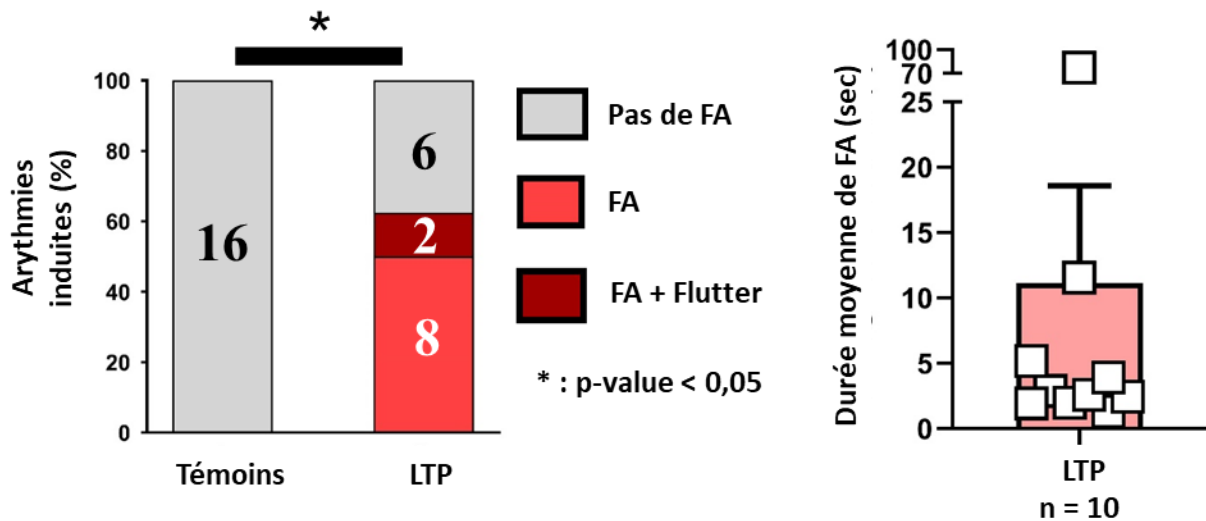


Figure 17 *Augmentation significative du nombre et de la durée des arythmies induites chez les animaux LTP; pour l'étude d'arythmies induites témoins n=10 et LTP n=16. FA = fibrillation atriale*

Les résultats d'échographie *in vivo* nous ont permis d'attester des modifications provoquées par la ligature du tronc artériel pulmonaire (LTP) au niveau cardiovasculaire et hémodynamique. Comparant les résultats entre les groupes témoins et LTP, nous avons pu observer chez les animaux LTP une augmentation significative de la vitesse maximale et du gradient moyen de pression au niveau du tronc artériel pulmonaire. Également, nous avons observé des modifications significatives de la morphologie des cavités cardiaques droites. En effet, chez les animaux LTP, il y a une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'épaisseur de la paroi du ventricule droit en fin de diastole, et une augmentation significative ($p < 0,01$) de la dimension de l'oreillette droite en fin de systole. Ces modifications hémodynamiques et morphologiques au niveau du tronc artériel pulmonaire et des cavités cardiaques droites suggèrent que le modèle LTP était un modèle satisfaisant et fiable pour étudier l'impact de la maladie cardiaque droite (Figure 18).

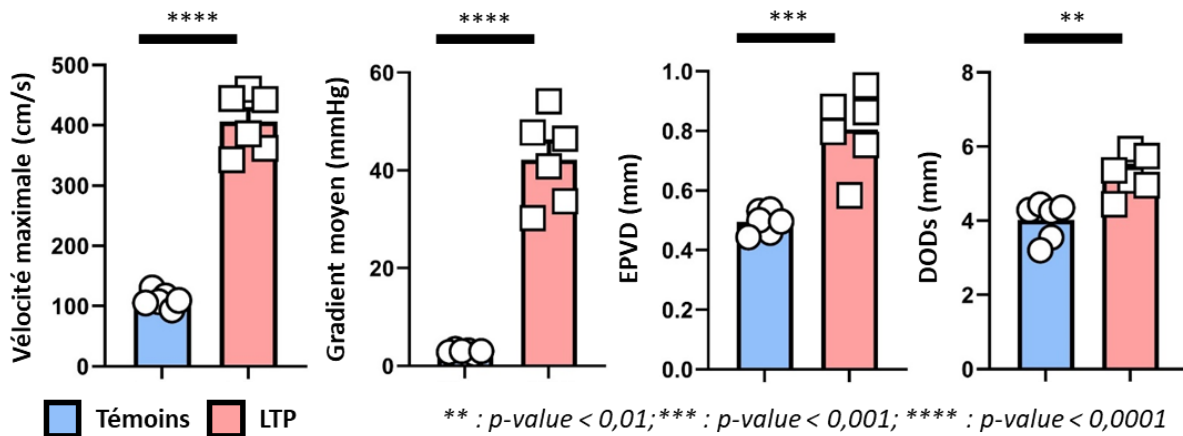


Figure 18 *La LTP induit une MCD chez les animaux LTP; Témoins (bleu) n=6 et LTP (rouge) n=6; DODs : dimension de l'oreillette droite en fin de systole; EPVD: épaisseur de la paroi du ventricule droit en fin de diastole).*

3.2- Analyse de la conduction *ex vivo*

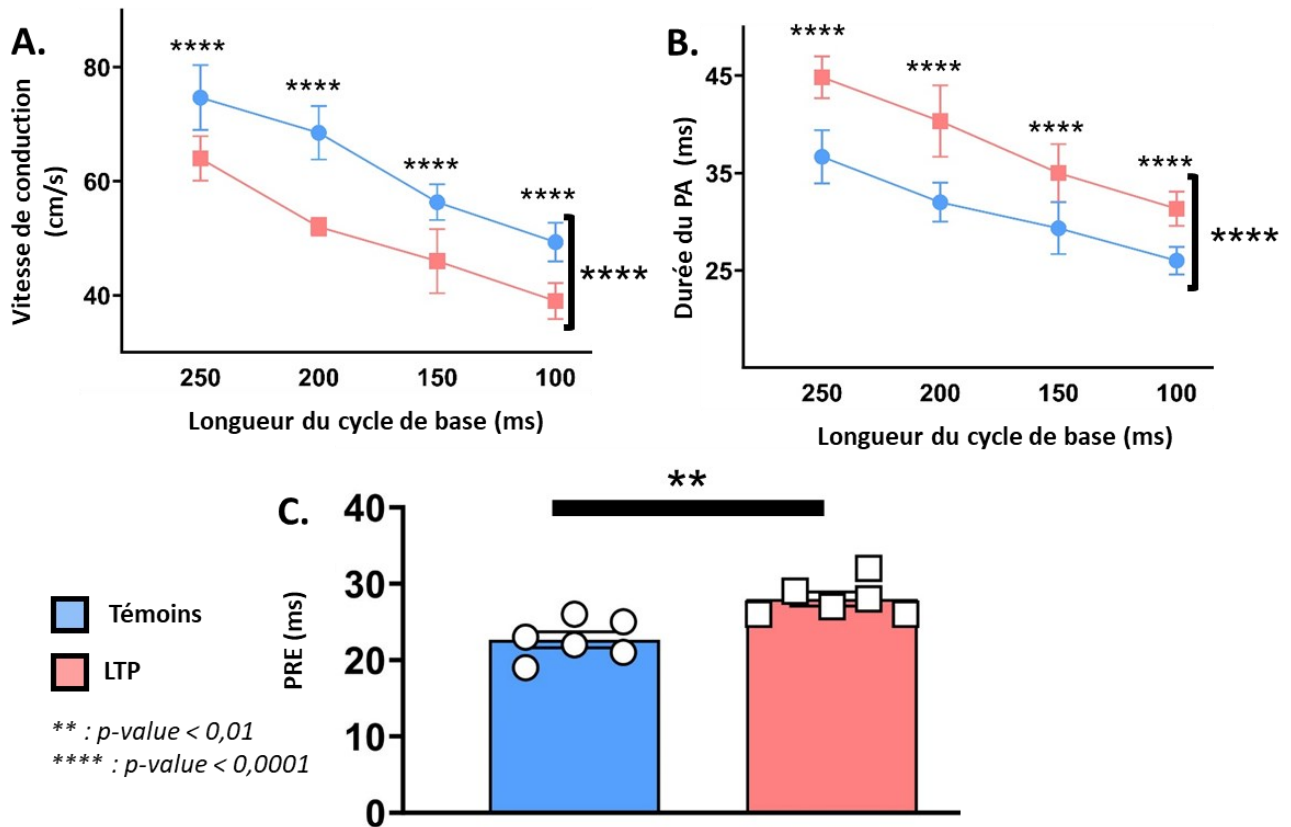


Figure 19 Modifications significatives des paramètres de conduction chez les animaux LTP; Témoins (bleu) n=6; LTP (rouge) n = 6; A: analyse de la vitesse de conduction (cm/s), B: durée du potentiel d'action (ms), C: durée de la période réfractaire effective (ms); PA: potentiel d'action; PRE: période réfractaire effective.

A partir de cœurs excisés perfusés nous avons réalisé des analyses de cartographie optique sur l'OD chez des animaux LTP et témoins. Ces analyses nous ont permis d'observer : une diminution significative ($p < 0,0001$) de la vitesse de conduction en fonction de la longueur de cycle de base chez les animaux LTP; une augmentation significative ($p < 0,0001$) de la durée du PA en fonction de la longueur de cycle de base chez les animaux LTP. Une différence significative entre chaque groupe aussi été observée entre les animaux LTP et témoins pour chaque longueur de cycle de base de manière isolée. Également une augmentation significative ($p < 0,01$) de la période réfractaire effective chez les animaux LTP par rapport aux animaux témoins (Figure 19).

3.3- Analyse histologique de l'oreillette droite

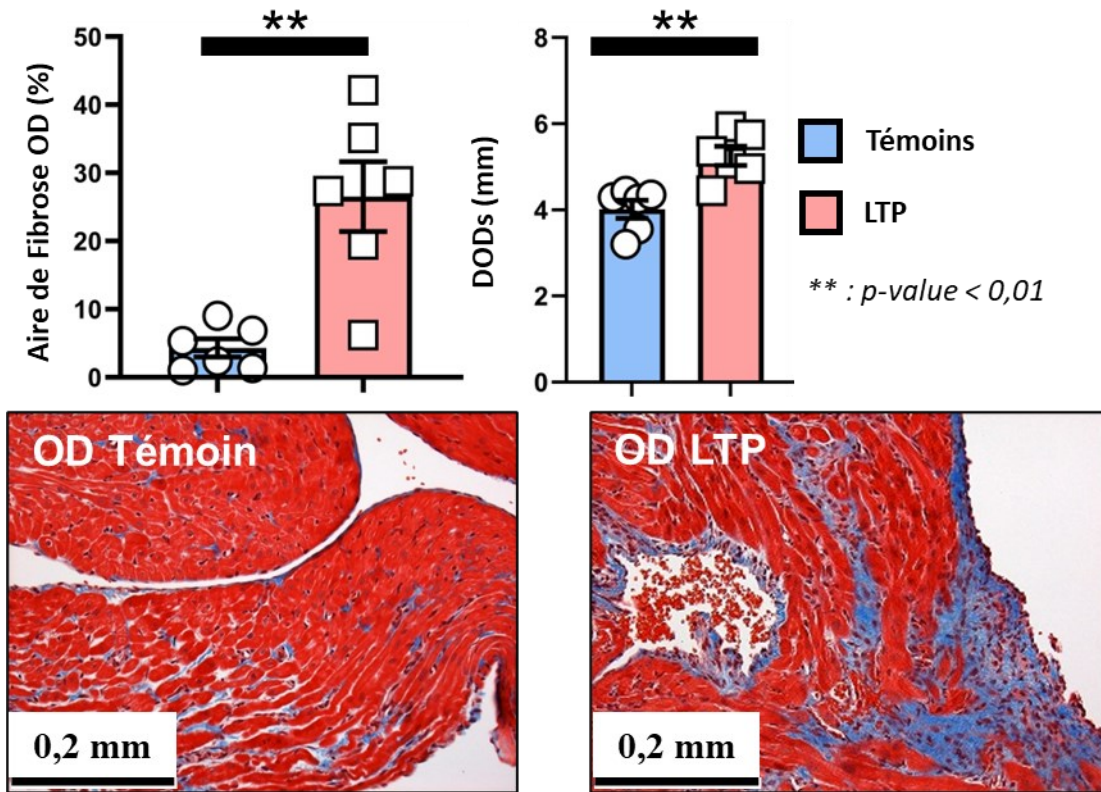


Figure 20 Augmentation de l'aide de fibrose et de la dimension de l'oreillette droite ; Témoins (bleu) $n=6$ et LTP (rouge) $n=6$. Résultats du pourcentage d'aire de fibrose de l'OD et dimension de l'OD en fin de systole (DODs). Photos ($\times 20$) de lames colorées au trichrome de Masson avec en rouge le tissu musculaire sain et en bleu le collagène.

Une fois les analyses *in vivo* réalisées, nous avons effectué des analyses au niveau tissulaire. À partir des lames d'histologie colorées au trichrome de Masson, des analyses sur l'aire de fibrose au niveau de l'oreillette droite ont été réalisées. Nous avons observé une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'aire de fibrose au niveau de l'oreillette droite chez les animaux LTP, par rapport aux animaux témoins. Ces lames nous ont aussi permis d'apprécier les dimensions de l'oreillette droite grâce à des coupes transversales du tissu. Nous avons donc pu observer une augmentation significative ($p < 0,01$) de la dimension de l'oreillette droite en fin de systole

(RADs) chez les animaux LTP comparés aux animaux témoins (Figure 20).

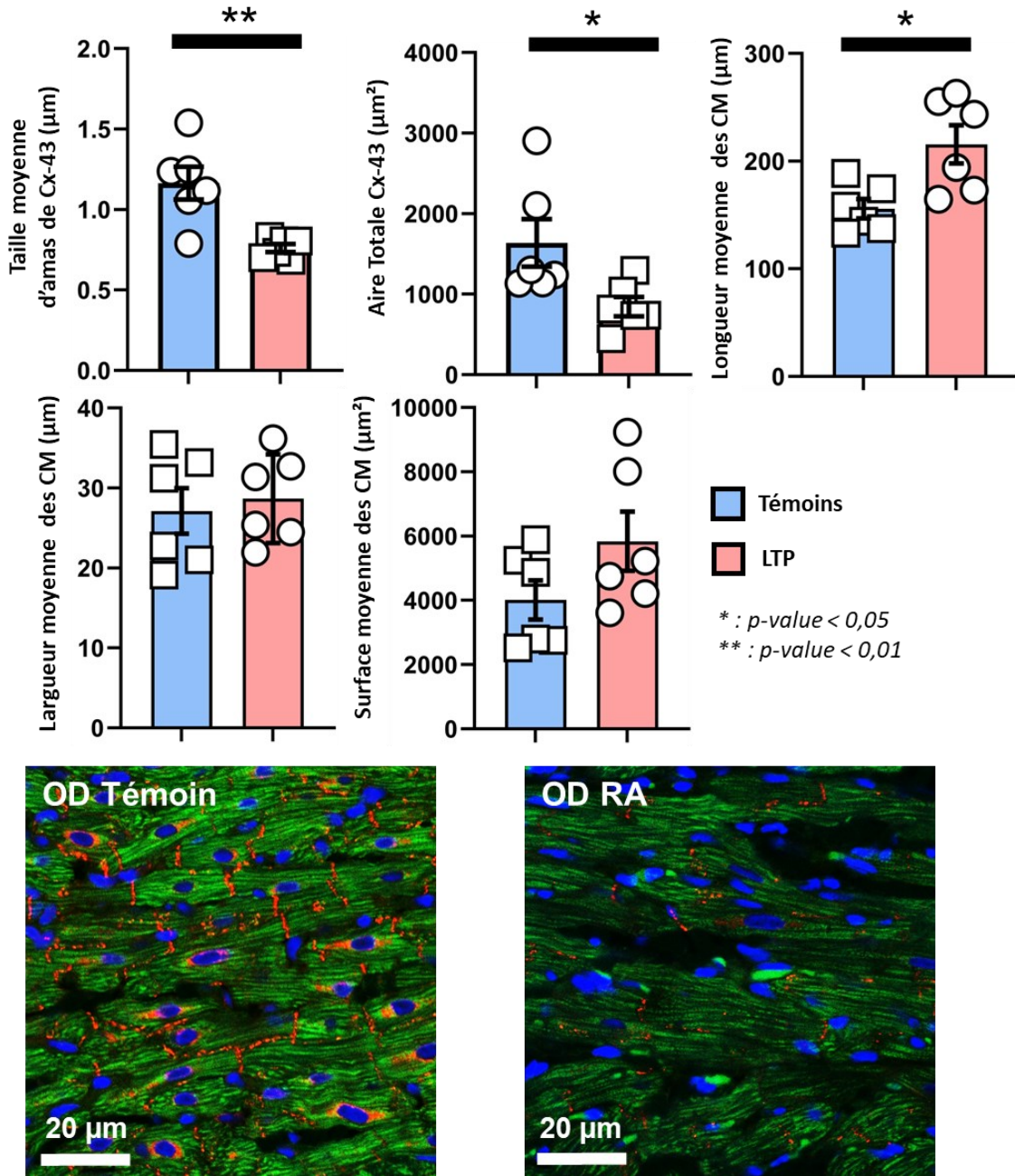


Figure 21 Remodelage au niveau de la Cx-43 et de la morphologie des CMs ; Résultats de la taille moyenne des amas (cluster) de Connexine-43 et de l'aire totale occupée par la Connexine-43 ; Résultats de la longueur, largeur et surface moyenne des CM ; Photos à partir des lames d'immunofluorescence : Connexine-43 (rouge), noyau (bleu), auto-fluorescence des CM (vert).

A partir des mêmes échantillons utilisés pour l'analyse de fibrose atriale, des lames d'immunofluorescence ont également été réalisées et nous ont permis d'étudier les modifications au niveau de la quantité et la localisation de Cx-43 dans le tissu de l'oreillette droite. Nous avons pu observer une diminution significative ($p < 0,01$) de la taille moyenne des amas de Cx-43 et également une diminution significative ($p < 0,05$) de l'aire totale de Cx-43 dans le tissu atrial. Les analyses morphométriques n'ont pas montré de différence significative entre les animaux témoins et LTP au niveau de la longueur, la largeur et la surface moyenne des CM. Cependant, une augmentation non significative de la longueur et la surface moyenne des CM a été observée (Figure 21).

3.4- Analyse de la contractilité des cardiomyocytes

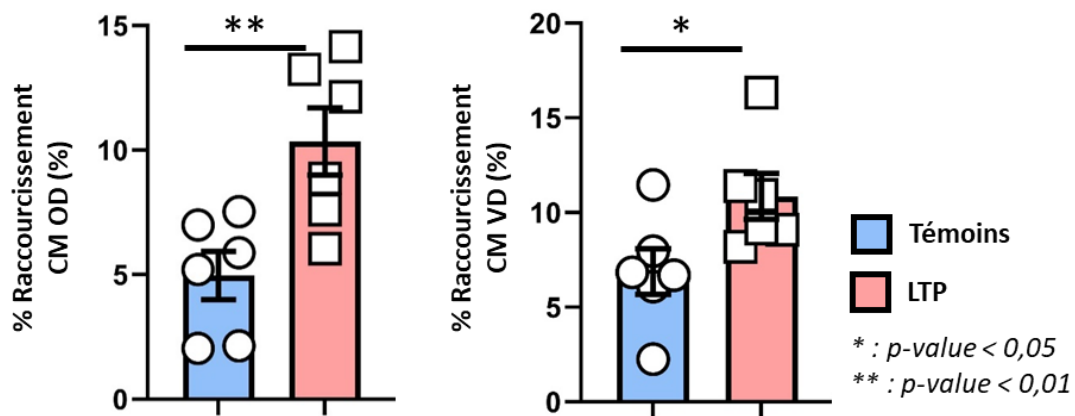


Figure 22 *Fonction contractile de cardiomyocytes isolés. Augmentation non-significative de la moyenne du raccourcissement des CMs chez les animaux LTP au niveau de l'OD (LTP n=6; Témoins n=6) et VD (LTP n= 6; Sham n=6); n : CM isolé; OD: oreillette droite; VD: ventricule droit.*

En continuant notre démarche d'aller de plus en plus dans le détail au niveau de nos analyses, après des études tissulaires, nous avons réalisé des études au niveau de la fonction des CM. Les mesures et les analyses qui ont été réalisées à partir de CM isolés de l'oreillette droite, de l'oreillette gauche et du ventricule droit sur le pourcentage de raccourcissement de ces CM isolés a révélé une augmentation significative du pourcentage de raccourcissement au niveau de l'OD chez les animaux LTP par rapport au animaux témoins. (Figure 22).

3.5- Expression génique et protéique dans les CM atriaux

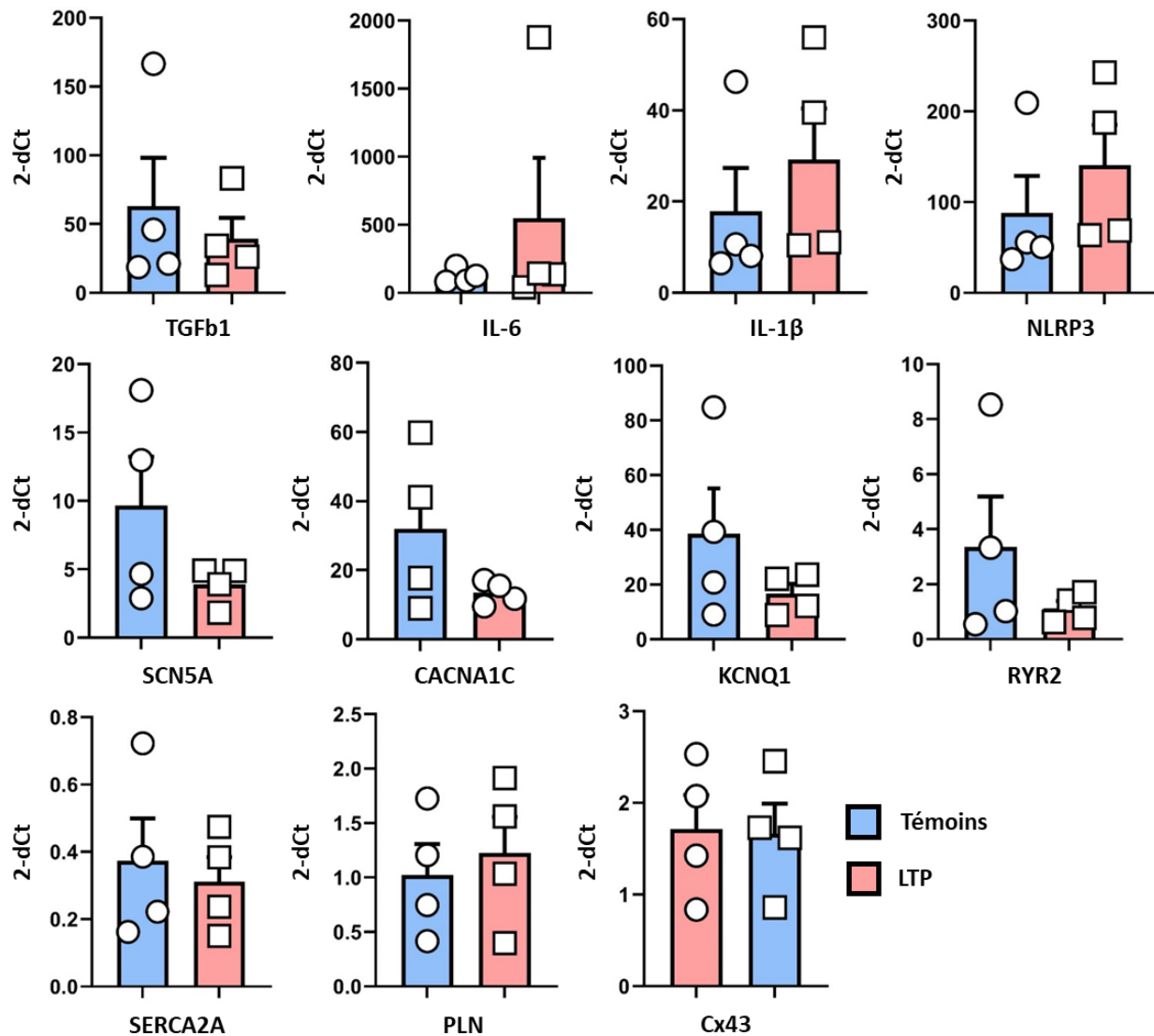


Figure 23 *Modifications non-significatives de l'expression génique* ; qPCR réalisée à partir de CM isolés; Témoins (bleu) n=4; LTP (rouge) n = 4. TGF-β1: Transforming Growth Factor-β1; IL-6: interleukine-6; IL-1β : interleukine-1β; NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; PLN: phospholambane; Cx43: Connexine-43.

À la suite des résultats obtenus au niveau cellulaire, à partir d'échantillons de CM atriaux droits isolés, nous avons réalisé des analyses de qPCR afin d'étudier l'expression génique de différents marqueurs d'intérêt de l'inflammation (TGF-β1, IL-6, IL-1β, NLRP3), des canaux ioniques (SCN5A, CACNA1C, KCNQ1), des canaux impliqués dans la gestion du calcium intra-cellulaire (SERCA2A,

PLN, RYR2) et des jonctions communicantes (Cx-43). Nous n'avons pas observé de modification significative au niveau de l'expression génique des marqueurs d'intérêt précédemment cités entre les animaux LTP et témoins. Cependant nous avons pu observer une augmentation non significative de la moyenne au niveau d'IL-6, IL-1 β , NLRP3 et PLN chez les animaux LTP. A contrario, nous avons observé une diminution non significative de moyenne d'expression génique pour SCN5A, CACNA1C, KCNQ1, RYR2, TGF- β 1 et SERCA2A chez les animaux LTP par rapport aux animaux témoins (Figure 23).

Pour compléter l'interprétation des résultats de qPCR obtenus, nous avons également réalisé des analyses d'immuno-buvardage, eux aussi à partir d'échantillons provenant de CM atriaux droits isolés. Cela nous a permis d'observer une augmentation significative ($p < 0,05$) pour l'expression protéique d'IL-6 et d'IL-1 β chez les animaux LTP en comparaison aux animaux témoins. Pour les autres marqueurs d'intérêt, nous avons observé une augmentation non-significative de la moyenne d'expression protéique pour CaV 1.2 210kDa, KCNQ1, SERCA2A et COL3A1. A l'inverse, nous avons observé une diminution non significative de la moyenne d'expression protéine pour NLRP3, CaV 1.2 250kDa, RYR2 et COL1A1 (Figure 24).

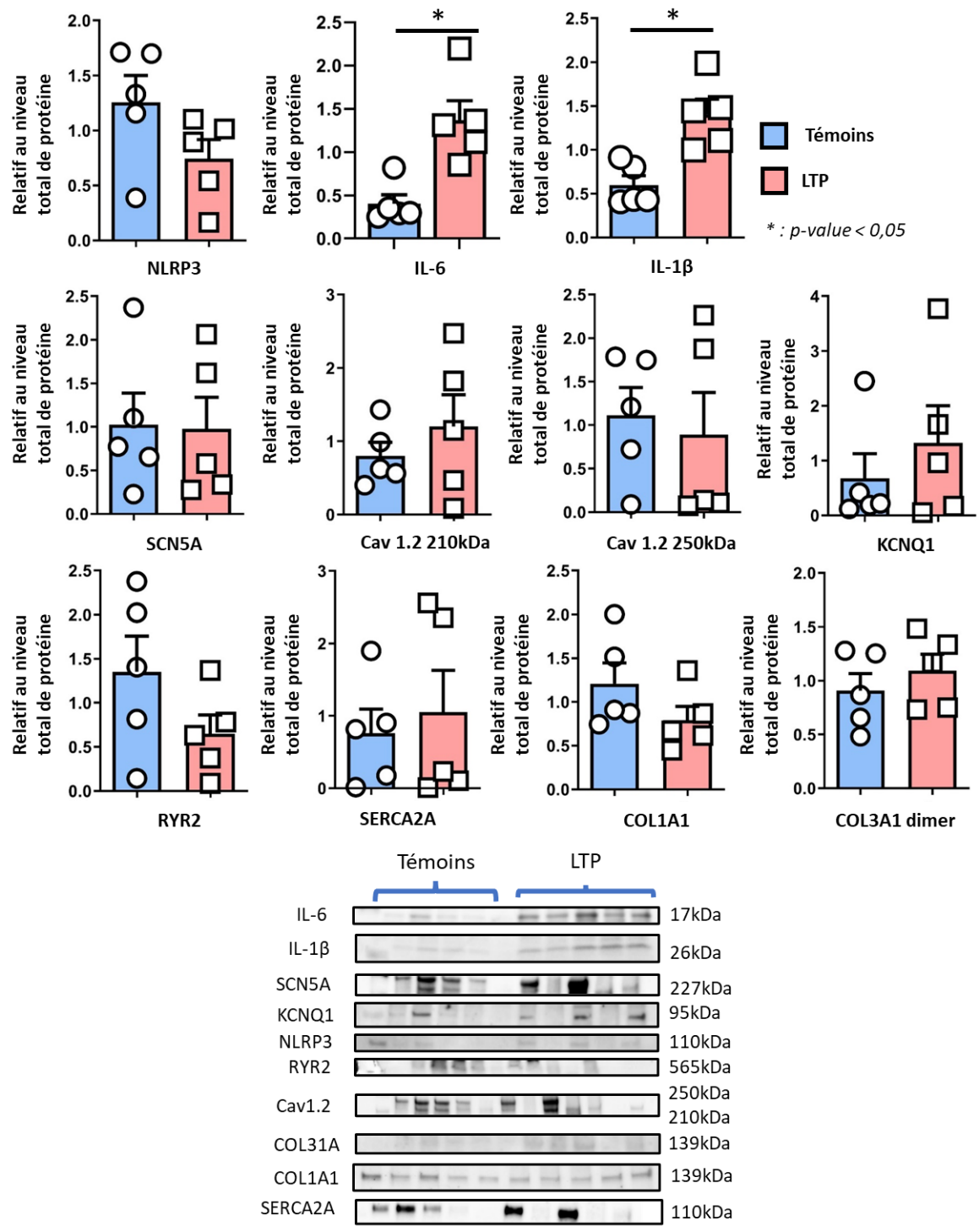


Figure 24 *Modification significative de l'expression protéique d'IL-6 et IL-1 β ; Témoins (bleu) n = 5 ; LTP (rouge) n = 5. Résultats exprimés en fonction du niveau total de chaque protéine ; Gel indiquant les bandes de migration pour chaque protéine.*

4- Discussion

Les différents résultats obtenus lors de la réalisation de ce projet se sont révélés intéressants pour nous permettre de mieux comprendre et de caractériser le modèle de ligature du tronc artériel pulmonaire pour étudier les impacts de la maladie du cœur droit dans le contexte de la FA. En effet, nous avons pu mettre en évidence des remodelages importants, aussi bien au niveau physiologique de l'OD et des CM, au niveau électrophysiologique et au niveau du profil inflammatoire des CM.

4.1- Remodelages fonctionnels arythmogènes impliquant les CM

Tout d'abord, les données d'échocardiographies nous ont permis de voir que la ligature du tronc artériel pulmonaire était correctement réalisée, et ce, de manière reproductible. Les valeurs de vitesse maximale et de gradient de pression moyen au niveau du tronc pulmonaire étaient comparables chez les animaux du groupe LTP. Cela nous a permis d'observer une augmentation significative chez les animaux LTP pour ces paramètres *in vivo*. De même, les valeurs obtenues sur la morphologie du ventricule droit et également de l'oreillette droite nous permettent d'apprécier les modifications engendrées sur les cavités cardiaques droites, avec une augmentation significative des dimensions de ces cavités. Ces modifications morphologiques suggèrent que la ligature du tronc artériel pulmonaire provoque une hypertrophie significative au niveau du tissu cardiaque, aussi bien au niveau atrial que ventriculaire (Figure 16). Des résultats similaires, faisant cette fois-ci le lien entre dilatation de la cavité atriale gauche et FA, ont été observés très tôt par Henry et al (Henry et al., 1976) directement chez des patients souffrant de plusieurs pathologies hypertrophiques. Afin de venir détailler l'impact de la chirurgie de ligature du tronc artériel pulmonaire de manière *in vivo*, nous nous sommes intéressés à l'aspect électrophysiologique à l'aide d'un protocole de stimulation *in vivo*. Ces études électrophysiologiques ont été réalisées en parallèle des échocardiographies. Tout d'abord nous avons effectué des analyses sur les structures en elle-même des ECG en mesurant manuellement les ondes et les intervalles les composant : onde P, onde QRS, intervalle RR n'a pas révélé de différence significative au niveau de l'onde P, onde de dépolarisation des oreillettes comme nous

pouvions l'espérer. Cependant, l'augmentation significative de la durée de l'intervalle PR nous montre que la ligature du tronc artériel pulmonaire chez les animaux LTP a provoqué un remodelage électrophysiologique chez les animaux LTP. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de la dimension de l'oreillette droite, ce qui allongerait la distance de propagation. Également, l'augmentation de l'intervalle QT et de la durée du QTc (formule de Fridericia), nous laisse penser que ce même remodelage tissulaire est venu modifier et prolonger la période de repolarisation des ventricules (Figure 17). Un impact similaire sur le prolongement du QT et QTc a déjà été observé chez des patients souffrant d'hypertrophie ventriculaire gauche par Haugaa et al (Haugaa et al., 2014).. Les analyses des protocoles de stimulation nous ont quant à eux révélé que les animaux LTP semblaient être devenus plus susceptibles de déclencher et de maintenir des épisodes plus ou moins courts d'arythmies atriales. De manière significative, lors des protocoles de stimulation, les animaux LTP ont déclenché plus d'épisodes de FA et d'épisode de FA se transformant en flutter atrial, en comparaison aux animaux témoins qui n'ont montré aucun signe d'arythmie atriale. La durée de ces épisodes de FA avait en moyenne une durée de 10 à 15 secondes, avec certains épisodes pouvant durer au-delà de 100 secondes (Figure 18). Ces résultats nous suggèrent qu'une ligature du tronc pulmonaire semble entraîner des répercussions pro-arythmogénique sur le tissu cardiaque droit. Des résultats similaires ont déjà été observé chez le rat par notre groupe de recherche avec une approche différent utilisant des injections de monocrotaline plutôt qu'une approche chirurgicale (Hiram et al., 2019).

En parallèle des études histologiques sur du tissu atrial entier, une partie importante du projet a été réalisé sur des CM isolés. Dans un premier temps, après avoir procédé à une isolation cellulaire sur le système de cœur perfusé de Langendorff, des CM fraîchement isolés ont été utilisé pour mesurer leur fonction contractile. Ces résultats sur le raccourcissement du CM, c'est-à-dire le raccourcissement des sarcomères entre deux lignes Z, a révélé une augmentation significative de la fonction contractile chez les animaux LTP par rapport aux animaux témoins aussi bien au niveau de l'oreillette droite que du ventricule droit. (Figure 23). Une telle augmentation du raccourcissement sur des CM isolés a déjà été observé en appliquant un étirement sur ces CM (J. Li et al., 2023). En prenant en compte cela, l'étirement provoqué par l'augmentation de la post-charge artérielle par la LTP semblerait provoquer cette augmentation du raccourcissement chez

les animaux LTP, avec le lien entre insuffisance cardiaque et FA déjà été démontré (Zhao et al., 2020). Plusieurs études, notamment chez le chien (Wakili et al., 2010; Yeh et al., 2008) ont mis en évidence une diminution du raccourcissement et une perte de la fonction contractile chez des chiens ayant subis des tachyarythmies induites.

4.2- Rôle central des CM dans la fibrose arythmogène

Pour la suite de notre projet, nous nous sommes tournés vers l'analyse du tissu atrial droit, en particulier de l'oreillette droite. Tout d'abord, les résultats d'histologie nous ont permis d'affiner notre caractérisation de l'impact du modèle de ligature du tronc artériel pulmonaire. En effet, la coloration au trichrome de Masson nous a permis de visualiser et de quantifier la présence de fibrose précisément au niveau de l'oreillette droite. Nous avons pu en conclure que de manière significative, il y avait une augmentation de l'aire de fibrose dans le tissu atrial droit des animaux LTP. En combinant ces résultats à ceux dimension de l'oreillette droite, eux aussi présentant une augmentation de la dimension de la cavité chez les animaux LTP, nous avons pu observer l'impact direct de la ligature sur l'oreillette droite. L'augmentation significative de 83% de l'aire de fibrose et de 24% de la taille de l'oreillette droite sont des modifications physiologiques qui pourraient être une première explication de la vulnérabilité à la FA que présente les animaux LTP. Nous avons aussi observé une augmentation significative de l'expression protéique d'IL-6 et IL-1 β chez les CM isolés des animaux LTP. Une augmentation similaire des niveaux d'IL-6 notamment a déjà été mise en évidence chez tes patients souffrant d'arythmie atriale (Marcus et al., 2008). Bien que cette augmentation chez ces patients soit au niveau plasmatique, cela ouvre une piste d'investigation intéressante à explorer prochainement au niveau des CM atriaux. En prenant compte du lien entre le remodelage des CM, l'inflammation et la fibrose déjà mentionné et du remodelage précédemment observé sur les CM et les résultats sur la fibrose atriale présentés, une possible explication pour l'apparition d'un substrat arythmogène au niveau des CM pourrait provenir d'interactions paracrines provenant des CM sur la fibrogénèse et l'apparition d'arythmies atriales (L. Moreira et al., 2022; L. M. Moreira et al., 2020). Cependant, une étude complémentaire pour caractériser cette éventuelle communication paracrine est nécessaire.

4.3- Rôle des CM dans le dérèglement électrophysiologique

Pour étudier plus spécifiquement cet impact au niveau de la conduction nous avons réalisé des lames blanches d'immunofluorescence en marquant la Cx-43 présente dans le tissu atrial droit. La diminution significative de la taille des amas de Cx-43 et de l'aire totale de Cx-43 chez les animaux LTP offre un nouveau facteur favorisant le développement et de d'aggravation de la FA chez ces animaux LTP. En effet, une diminution de la présence de Cx-43 dans le tissu atrial, plus précisément au niveau des jonctions-communicantes, essentielles pour la bonne conduction du courant électrique de proche en proche dans le tissu, pourrait aider à expliquer cette sensibilité à la FA. D'une manière similaire, une diminution des niveaux de Cx-43 ont déjà été observé chez des rats souffrants d'apnée du sommeil (Iwasaki et al., 2014). Des modifications au niveau de Cx-43 dans le tissu atrial a déjà été observé chez des patients souffrants d'arythmies atriale, mais cependant, c'est une augmentation de l'expression de Cx-43 (Sánchez et al., 2020). Une relation entre le remodelage des CM et le remodelage des jonctions-communicantes, notamment via des modifications de l'expression de Cx-43 dans le tissu semble exister, cependant, cette relation est très dépendantes de la pathologie et du modèle chez lesquels elle est étudiée (Kato et al., 2012). Si la conduction entre cellules se retrouve perturbée, cela peut venir favoriser l'apparition de circuit de réentrée. Également, une régulation venant de la Cx-43 sur les courants calciques a déjà été décrite de par sa colocalisation avec les canaux ioniques impliqués (Burstein et al., 2007; Peng et al., 2022). Cela pourrait être une piste pour venir expliquer les modifications que nous avons observé sur l'expression génique et protéique des canaux calciques (Figure 23). De plus, en prenant également en compte les résultats sur la fibrose et la dimension de l'oreillette, nous avons observé plusieurs facteurs pouvant individuellement et conjointement partir à la mise en place et au maintien d'un substrat pro-arythmogène important. A partir des mêmes lames blanches, nous avons aussi effectué des mesures morphométriques des CM chez les animaux témoins et LTP. Une augmentation significative de la longueur moyenne des CM a été observée chez les animaux LTP. Ce genre de changement sur la morphologie des CM, plus précisément de la longueur pourrait être expliqué par l'hypertrophie engendrée par la ligature du tronc artériel pulmonaire. Cela pourrait aussi être un des facteurs pouvant être impliqués dans la diminution significative de Connexine-43 dans le tissu atrial. En effet une hypertrophie des CM pourrait, en

parallèle des autres facteurs présentés précédemment, provoquer un changement de disposition de la Connexine-43 au niveau des jonctions communicantes. L'augmentation de la fonction inotrope chez ces animaux pourrait être une conséquence de la dilatation provoquée par le modèle LTP, mais également pourrait être le résultat d'une modification de l'activité des canaux ioniques impliqués dans la fonction contractile. En effet, une altération de l'expression génique et protéique pourrait être à l'origine de ces altérations de contractilité, notamment au niveau des canaux impliqués dans la gestion du calcium intra-cellulaire, élément fondamental de l'inotropie (Figures 23-24). Les modifications sur les niveaux d'expression, notamment du canal RyR2 et de la pompe SERCA, que nous avons observés ont également été retrouvés chez des chiens souffrants d'insuffisance cardiaque (Yeh et al., 2008). De même, chez la souris cette fois, un lien entre une activité anormale du RyR2 et la mise en place d'un substrat pro-FA a été démontré (N. Li et al., 2014). Toutes ces modifications physiologiques ou électrophysiologiques aboutissent à des modifications que nous avons pu observer sur les paramètres de conduction à travers la OD. Et par la suite, ces modifications de la conduction comme une augmentation du PA, une réduction de la vitesse de conduction et une augmentation de la PRE peuvent favoriser l'apparition de FA et la gestion du PA devient une cible privilégiée de gestion de la pathologie (Aguilar et al., 2017; Frontera et al., 2022; McCauley et al., 2020; Sun et al., 2018).

4.4- Limites

La maîtrise de l'isolation cellulaire s'est avérée être un défi tout du long de l'étude, surtout pour obtenir des cellules de l'OD. Pour consolider notre interprétation de ces résultats, il faudrait augmenter le nombre d'échantillons pour rendre notre analyse plus robuste. Également sur les cellules contractiles isolées, il faudrait ajouter l'étude des transitoires calciques dans notre analyse pour mieux comprendre le lien entre les niveaux de contractilité et le rôle du calcium dans le mécanisme arythmogène observé. Des essais en utilisant la plateforme IonOptix et avec la microscopie confocale ont été réalisés en fin d'étude, sans fournir de résultats exploitables. De même, pour compléter notre caractérisation du remodelage du profil inflammatoire, il nous faudrait étendre nos analyses à tous les médiateurs de l'inflammation locale et systémique, mais également à tous les éléments composants l'inflammasome NLRP3 comme par exemple ASC, pro-

Caspase-1 et Caspase-1. Dans ce sens, des analyses transcriptomiques par 'single-nuclei RNA sequencing' seraient envisageables.

4.5- Perspectives

Afin d'approfondir notre étude de l'implication du CM dans la mise en place d'un substrat pro-arythmogène, une analyse du remodelage éventuel des tubules-T des CM pourrait être réalisée (Howe et al., 2021). De même, il serait judicieux d'étudier l'impact de la MCD sur les remodelages affectant les CM atriaux sur les animaux femelles pour pouvoir apprécier d'éventuelles différences sexe-dépendantes. En effet, les femmes sont moins à risque de développer de la FA avec plusieurs pistes pour expliquer cela : cavités cardiaques plus petites ou des modulations des paramètres de conduction comme le PA ou de l'intervalle PR par exemple (Ko et al., 2016). Également, pour avoir une vision plus précise du fonctionnement des jonctions-communicantes atriales, nous pourrions compléter nos données obtenues sur la Cx-43 avec une analyse similaire, sur la Cx-40 (Dupont et al., 2001). Pour finir, une suite directe de notre étude pourrait être de retirer la ligature chez les animaux LTP afin de voir si le remodelage observé est réversible ou non. À court terme, nous prévoyons d'effectuer des analyses transcriptomiques pour mieux identifier les gènes dérégulés dans les CM issus de rats MCD comparés aux témoins, afin de ne pas limiter nos observations aux gènes sélectionnés (présentés dans ce mémoire) pour leur association avec la FA, mais pour éventuellement découvrir d'autres marqueurs qui seraient sur- ou sous-régulés dans notre modèle. Pour compléter les études d'immunofluorescence de la Cx-43, nous prévoyons également de réaliser des projections orthogonales dans le but de mieux apprécier la répartition de la Cx-43 au travers du tissu. Finalement, nous allons nous intéresser dans de futurs projets aux interactions engendrées par le remodelage des CMs en étudiant les cytokines circulantes possiblement produites par les CM et leur impact sur le recrutement d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les monocytes ou les macrophages par exemple (Wang et al., 2018; Wei et al., 2022), ainsi qu'à l'impact et le rôle de nouvelles thérapies anti-inflammatoires sur les CM.

5- Conclusion

Cette étude nous a permis de mieux caractériser les remodelages physiologiques, électrophysiologiques et du profil inflammatoire subis par les CM atriaux dans un contexte de maladie cœur droit, et de leur impact sur la mise en place et le maintien d'un substrat pro-FA. Nous avons pu mettre en évidence l'importance du profil inflammatoire cardiomyocytaire dans ce substrat, qui pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique, par exemple en ciblant l'inflammasome NLRP3, pour aider à la gestion de la FA chez certains patients en proposant une médecine plus personnalisée. Néanmoins, la FA reste avant tout une pathologie multifactorielle complexe sur laquelle il reste un nombre important de perspectives de recherche.

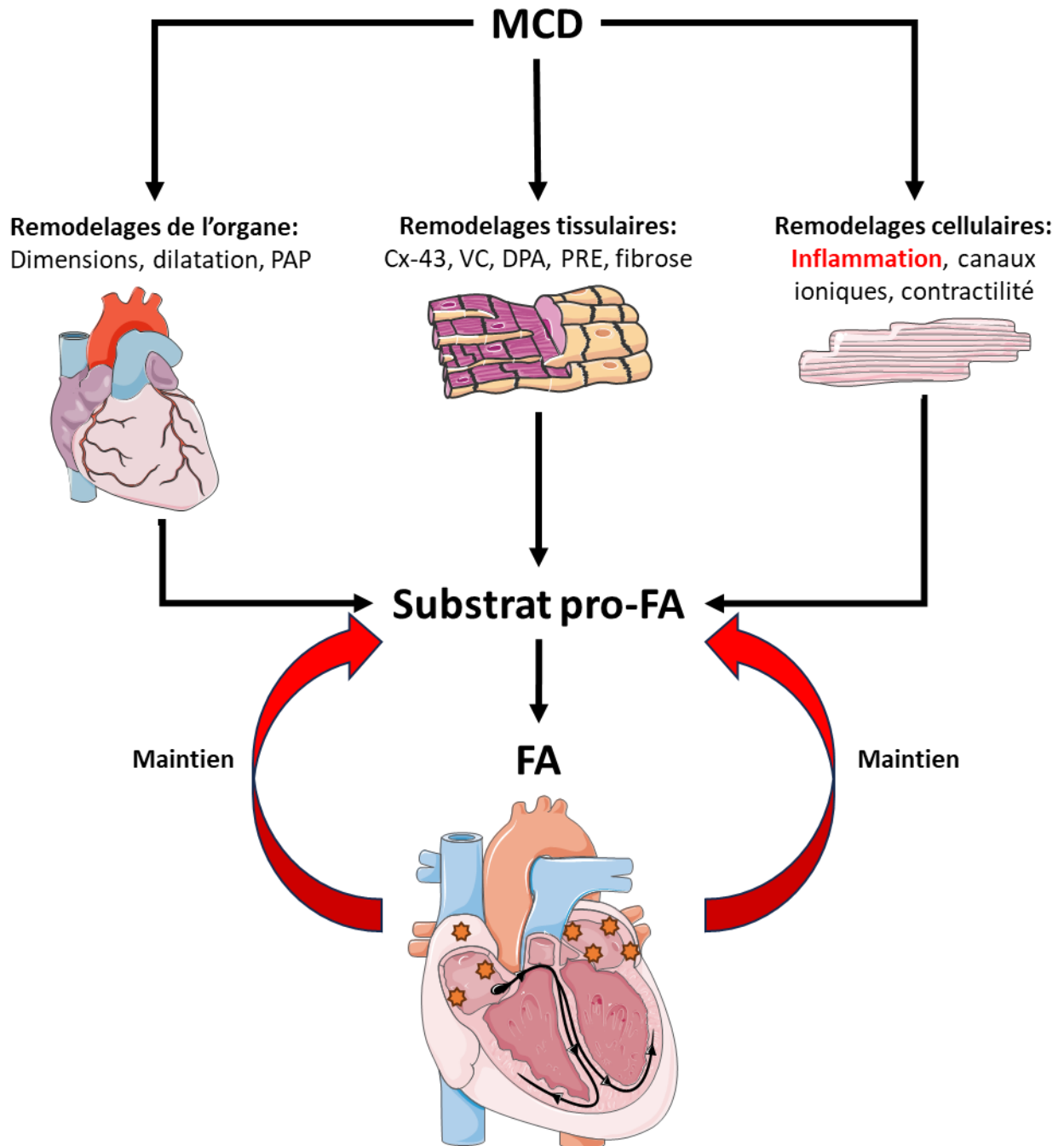


Figure 25 Schéma récapitulatif de l'étude. MCD : maladie du cœur droit ; PAP : pression artérielle pulmonaire ; Cx-43 : Connexine-43 ; VC : vitesse de conduction ; DPA : durée du potentiel d'action ; PRE : période réfractaire effective ; FA : fibrillation auriculaire (schéma réalisé par Ewen Le Quilliec à partir de Servier Medical Art).

6- Références bibliographiques

- Abe, I., Teshima, Y., Kondo, H., Kaku, H., Kira, S., Ikebe, Y., Saito, S., Fukui, A., Shinohara, T., Yufu, K., Nakagawa, M., Hijjiya, N., Moriyama, M., Shimada, T., Miyamoto, S., & Takahashi, N. (2018). Association of fibrotic remodeling and cytokines/chemokines content in epicardial adipose tissue with atrial myocardial fibrosis in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, *15*(11), 1717-1727. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.06.025>
- Aguilar, M., Feng, J., Vigmond, E., Comtois, P., & Nattel, S. (2017). Rate-Dependent Role of IK_{ur} in Human Atrial Repolarization and Atrial Fibrillation Maintenance. *Biophysical Journal*, *112*(9), 1997-2010. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.022>
- Aguilar, M., Xiong, F., Qi, X. Y., Comtois, P., & Nattel, S. (2015). Potassium Channel Blockade Enhances Atrial Fibrillation–Selective Antiarrhythmic Effects of Optimized State-Dependent Sodium Channel Blockade. *Circulation*, *132*(23), 2203-2211. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018016>
- Ahmed, A. S., Miller, J., Foreman, J., Golden, K., Shah, A., Field, J., Gilge, J., Clark, B., Joshi, S., Nair, G., Olson, J., Padanilam, B. J., Prystowsky, E., & Patel, P. J. (2023). Prophylactic Colchicine After Radiofrequency Ablation of Atrial Fibrillation. *JACC: Clinical Electrophysiology*, S2405500X23000920. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2023.02.003>
- Akazawa, Y., Okumura, K., Ishii, R., Slorach, C., Hui, W., Ide, H., Honjo, O., Sun, M., Kabir, G., Connelly, K., & Friedberg, M. K. (2020). Pulmonary artery banding is a relevant model to study the right ventricular remodeling and dysfunction that occurs in pulmonary arterial

- hypertension. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 129(2), 238-246.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00148.2020>
- Algalarrondo, V., & Nattel, S. (2016). Potassium Channel Remodeling in Heart Disease. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 8(2), 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2016.01.006>
- Andrade, J. G., Khairy, P., Nattel, S., Vanella, A., Rivard, L., Guerra, P. G., Dubuc, M., Dyrda, K., Thibault, B., Talajic, M., Mondesert, B., Roy, D., & Macle, L. (2013). Corticosteroid use during pulmonary vein isolation is associated with a higher prevalence of dormant pulmonary vein conduction. *Heart Rhythm*, 10(10), 1569-1575.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.07.037>
- Andrade, J., Khairy, P., Dobrev, D., & Nattel, S. (2014). The Clinical Profile and Pathophysiology of Atrial Fibrillation: Relationships Among Clinical Features, Epidemiology, and Mechanisms. *Circulation Research*, 114(9), 1453-1468.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303211>
- Baruscotti, M., Bucchi, A., & DiFrancesco, D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(1), 59-79.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.005>
- Bhatt, H. V., & Fischer, G. W. (2015). Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Therapeutic Options. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 29(5), 1333-1340.
<https://doi.org/10.1053/j.jvca.2015.05.058>
- Burstein, B., Comtois, P., Michael, G., Nishida, K., Villeneuve, L., Yeh, Y.-H., & Nattel, S. (2009). Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circulation Research*, 105(12), 1213-1222.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183400>

- Burstein, B., Qi, X., Yeh, Y., Calderone, A., & Nattel, S. (2007). Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: A novel consideration in atrial remodeling☆. *Cardiovascular Research*, 76(3), 442-452. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.07.013>
- Camm, C. F. (2017). *Atrial Fibrillation and Anticoagulation in Hypertrophic Cardiomyopathy*. <https://www.aerjournal.com/articles/atrial-fibrillation-and-anticoagulation-hypertrophic-cardiomyopathy>
- Cappato, R., Ezekowitz, M. D., Klein, A. L., Camm, A. J., Ma, C.-S., Le Heuzey, J.-Y., Talajic, M., Scanavacca, M., Vardas, P. E., Kirchhof, P., Hemmrich, M., Lanius, V., Meng, I. L., Wildgoose, P., van Eickels, M., Hohnloser, S. H., & X-VerT Investigators. (2014). Rivaroxaban vs. Vitamin K antagonists for cardioversion in atrial fibrillation. *European Heart Journal*, 35(47), 3346-3355. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu367>
- Chaar, D., Dumont, B. L., Vulesevic, B., Neagoe, P.-E., Räkel, A., White, M., & Sirois, M. G. (2022). Neutrophils and Circulating Inflammatory Biomarkers in Diabetes Mellitus and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *The American Journal of Cardiology*, S0002-9149(22)00586-0. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2022.05.026>
- Copley, D. J., & Hill, K. M. (2016). Atrial Fibrillation : A Review of Treatments and Current Guidelines. *AACN Advanced Critical Care*, 27(1), 120-128. <https://doi.org/10.4037/aacnacc2016281>
- Cunha, P. S., Laranjo, S., Heijman, J., & Oliveira, M. M. (2022). The Atrium in Atrial Fibrillation – A Clinical Review on How to Manage Atrial Fibrotic Substrates. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 879984. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.879984>

- Demidowich, A. P., Davis, A. I., Dedhia, N., & Yanovski, J. A. (2016). Colchicine to decrease NLRP3-activated inflammation and improve obesity-related metabolic dysregulation. *Medical Hypotheses*, *92*, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.04.039>
- Dupont, E., Ko, Y.-S., Rothery, S., Coppens, S. R., Baghai, M., Haw, M., & Severs, N. J. (2001). The Gap-Junctional Protein Connexin40 Is Elevated in Patients Susceptible to Postoperative Atrial Fibrillation. *Circulation*, *103*(6), 842-849. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.6.842>
- Fridericia, L. S. (2003). The Duration of Systole in an Electrocardiogram in Normal Humans and in Patients with Heart Disease*. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, *8*(4), 343-351. <https://doi.org/10.1046/j.1542-474X.2003.08413.x>
- Frontera, A., Pagani, S., Limite, L. R., Peirone, A., Fioravanti, F., Enache, B., Cuellar Silva, J., Vlachos, K., Meyer, C., Montesano, G., Manzoni, A., Dedé, L., Quarteroni, A., Lațcu, D. G., Rossi, P., & Della Bella, P. (2022). Slow Conduction Corridors and Pivot Sites Characterize the Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation. *JACC: Clinical Electrophysiology*, *8*(5), 561-577. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2022.01.019>
- Frustaci, A., Chimenti, C., Bellocci, F., Morgante, E., Russo, M. A., & Maseri, A. (1997). Histological Substrate of Atrial Biopsies in Patients With Lone Atrial Fibrillation. *Circulation*, *96*(4), 1180-1184. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.4.1180>
- Fürnkranz, A., Brugada, J., Albenque, J.-P., Tondo, C., Bestehorn, K., Wegscheider, K., Ouyang, F., & Kuck, K.-H. (2014). Rationale and Design of FIRE AND ICE: A multicenter randomized trial comparing efficacy and safety of pulmonary vein isolation using a cryoballoon versus radiofrequency ablation with 3D-reconstruction. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *25*(12), 1314-1320. <https://doi.org/10.1111/jce.12529>

- Ge, P., Fu, Y., Su, Q., Jin, M., Guo, L., Miao, C., Zhu, S., Zhuang, J., Zhang, Z., & Hong, J. (2022). Colchicine for prevention of post-operative atrial fibrillation : Meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 1032116. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1032116>
- Glasscock, E., Voigt, N., McCauley, M. D., Sun, Q., Li, N., Chiang, D. Y., Zhou, X.-B., Molina, C. E., Thomas, D., Schmidt, C., Skapura, D. G., Noebels, J. L., Dobrev, D., & Wehrens, X. H. T. (2015). Expression and function of Kv1.1 potassium channels in human atria from patients with atrial fibrillation. *Basic Research in Cardiology*, 110(5), 47. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0505-6>
- Haugaa, K. H., Martijn Bos, J., Borckenhagen, E. J., Tarrell, R. F., Morlan, B. W., Caraballo, P. J., & Ackerman, M. J. (2014). Impact of left ventricular hypertrophy on QT prolongation and associated mortality. *Heart Rhythm*, 11(11), 1957-1965. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.06.025>
- Hegemann, N., Primessnig, U., Bode, D., Wakula, P., Beindorff, N., Klopffleisch, R., Michalick, L., Grune, J., Hohendanner, F., Messroghli, D., Pieske, B., Kuebler, W. M., & Heinzl, F. R. (2021). Right-ventricular dysfunction in HFpEF is linked to altered cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis and myofilament sensitivity. *ESC Heart Failure*, 8(4), 3130-3144. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13419>
- Heijman, J., Luermans, J. G. L. M., Linz, D., Van Gelder, I. C., & Crijns, H. J. G. M. (2021). Risk Factors for Atrial Fibrillation Progression. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 13(1), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2020.10.011>
- Heijman, J., Muna, A. P., Veleva, T., Molina, C. E., Sutanto, H., Tekook, M., Wang, Q., Abu-Taha, I. H., Gorka, M., Künzel, S., El-Armouche, A., Reichenspurner, H., Kamler, M., Nikolaev, V., Ravens, U., Li, N., Nattel, S., Wehrens, X. H. T., & Dobrev, D. (2020). Atrial

- Myocyte NLRP3/CaMKII Nexus Forms a Substrate for Postoperative Atrial Fibrillation. *Circulation Research*, 127(8), 1036-1055. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316710>
- Henry, W. L., Morganroth, J., Pearlman, A. S., Clark, C. E., Redwood, D. R., Itscoitz, S. B., & Epstein, S. E. (1976). Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation*, 53(2), 273-279. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.53.2.273>
- Higashikuni, Y., Liu, W., Numata, G., Tanaka, K., Fukuda, D., Tanaka, Y., Hirata, Y., Imamura, T., Takimoto, E., Komuro, I., & Sata, M. (2023). NLRP3 Inflammasome Activation Through Heart-Brain Interaction Initiates Cardiac Inflammation and Hypertrophy During Pressure Overload. *Circulation*, 147(4), 338-355. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.060860>
- Hiram, R., Naud, P., Xiong, F., Al-u'datt, D., Algalarrondo, V., Sirois, M. G., Tanguay, J.-F., Tardif, J.-C., & Nattel, S. (2019). Right Atrial Mechanisms of Atrial Fibrillation in a Rat Model of Right Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(10), 1332-1347. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.06.066>
- Hiram, R., Xiong, F., Naud, P., Xiao, J., Sirois, M., Tanguay, J.-F., Tardif, J.-C., & Nattel, S. (2021). The inflammation-resolution promoting molecule resolvin-D1 prevents atrial proarrhythmic remodelling in experimental right heart disease. *Cardiovascular Research*, 117(7), 1776-1789. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa186>
- Hong, K. L., Borges, J., & Glover, B. (2020). Catheter ablation for the management of atrial fibrillation: Current technical perspectives. *Open Heart*, 7(1), e001207. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2019-001207>
- Howe, K., Ross, J. M., Loiselle, D. S., Han, J.-C., & Crossman, D. J. (2021). Right-sided heart failure is also associated with transverse tubule remodeling in the left ventricle. *American*

Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 321(5), H940-H947.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00298.2021>

Ioannidis, P., Zografos, T., Christoforatos, E., Kouvelas, K., Tsoumeleas, A., & Vassilopoulos, C. (2021). The Electrophysiology of Atrial Fibrillation : From Basic Mechanisms to Catheter Ablation. *Cardiology Research and Practice*, 2021, 1-14.
<https://doi.org/10.1155/2021/4109269>

Iwasaki, Y.-K., Kato, T., Xiong, F., Shi, Y.-F., Naud, P., Maguy, A., Mizuno, K., Tardif, J.-C., Comtois, P., & Nattel, S. (2014). Atrial fibrillation promotion with long-term repetitive obstructive sleep apnea in a rat model. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(19), 2013-2023. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.05.077>

Kato, T., Iwasaki, Y., & Nattel, S. (2012). Connexins and Atrial Fibrillation. *Circulation*, 125(2), 203-206. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075432>

Ko, D., Rahman, F., Schnabel, R. B., Yin, X., Benjamin, E. J., & Christophersen, I. E. (2016). Atrial fibrillation in women : Epidemiology, pathophysiology, presentation, and prognosis. *Nature Reviews Cardiology*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.45>

Kornej, J., Börschel, C. S., Benjamin, E. J., & Schnabel, R. B. (2020). Epidemiology of Atrial Fibrillation in the 21st Century. *Circulation Research*, 127(1), 4-20.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316340>

Kumagai, K., Nakashima, H., & Saku, K. (2004). The HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin prevents atrial fibrillation by inhibiting inflammation in a canine sterile pericarditis model. *Cardiovascular Research*, 62(1), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.018>

Latchamsetty, R., & Morady, F. (2016). Catheter Ablation of Atrial Fibrillation. *Heart Failure Clinics*, 12(2), 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2015.08.018>

- Le Heuzey, J.-Y., De Ferrari, G. M., Radzik, D., Santini, M., Zhu, J., & Davy, J.-M. (2010). A short-term, randomized, double-blind, parallel-group study to evaluate the efficacy and safety of dronedarone versus amiodarone in patients with persistent atrial fibrillation : The DIONYSOS study. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *21*(6), 597-605. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2010.01764.x>
- Li, J., Sundnes, J., Hou, Y., Laasmaa, M., Ruud, M., Unger, A., Kolstad, T. R., Frisk, M., Norseng, P. A., Yang, L., Setterberg, I. E., Alves, E. S., Kalakoutis, M., Sejersted, O. M., Lanner, J. T., Linke, W. A., Lunde, I. G., De Tombe, P. P., & Louch, W. E. (2023). Stretch Harmonizes Sarcomere Strain Across the Cardiomyocyte. *Circulation Research*, *133*(3), 255-270. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.322588>
- Li, N., Chiang, D. Y., Wang, S., Wang, Q., Sun, L., Voigt, N., Respress, J. L., Ather, S., Skapura, D. G., Jordan, V. K., Horrigan, F. T., Schmitz, W., Müller, F. U., Valderrabano, M., Nattel, S., Dobrev, D., & Wehrens, X. H. T. (2014). Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation*, *129*(12), 1276-1285. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006611>
- Liang, Y., Zhou, H.-F., Tong, M., Chen, L., Ren, K., & Zhao, G.-J. (2019). Colchicine inhibits endothelial inflammation via NLRP3/CRP pathway. *International Journal of Cardiology*, *294*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.06.070>
- Lip, G. Y. H., Proietti, M., Potpara, T., Mansour, M., Savelieva, I., Tse, H. F., Goette, A., Camm, A. J., Blomstrom-Lundqvist, C., Gupta, D., & Boriani, G. (2023). Atrial fibrillation and stroke prevention : 25 years of research at EP Europace journal. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on*

Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology, 25(9), eua226. <https://doi.org/10.1093/europace/eua226>

Liu, Y., Cousin, J. M., Hughes, J., Van Damme, J., Seckl, J. R., Haslett, C., Dransfield, I., Savill, J., & Rossi, A. G. (1999). Glucocorticoids Promote Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *The Journal of Immunology*, 162(6), 3639-3646. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.6.3639>

Lurie, A., Wang, J., Hinnegan, K. J., McIntyre, W. F., Belley-Côté, E. P., Amit, G., Healey, J. S., Connolly, S. J., & Wong, J. A. (2021). Prevalence of Left Atrial Thrombus in Anticoagulated Patients With Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 77(23), 2875-2886. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.04.036>

Marcus, G. M., Smith, L. M., Glidden, D. V., Wilson, E., McCabe, J. M., Whiteman, D., Tseng, Z. H., Badhwar, N., Lee, B. K., Lee, R. J., Scheinman, M. M., & Olgin, J. E. (2008). Markers of inflammation before and after curative ablation of atrial flutter. *Heart Rhythm*, 5(2), 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2007.10.007>

Margulescu, A. D., & Mont, L. (2017). Persistent atrial fibrillation vs paroxysmal atrial fibrillation: Differences in management. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 15(8), 601-618. <https://doi.org/10.1080/14779072.2017.1355237>

McCauley, M. D., Hong, L., Sridhar, A., Menon, A., Perike, S., Zhang, M., da Silva, I. B., Yan, J., Bonini, M. G., Ai, X., Rehman, J., & Darbar, D. (2020). Ion Channel and Structural Remodeling in Obesity-Mediated Atrial Fibrillation. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*, 13(8), e008296. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.120.008296>

Medvedev, R. Y., Sanchez-Alonso, J. L., Mansfield, C. A., Judina, A., Francis, A. J., Pagiatakis, C., Trayanova, N., Glukhov, A. V., Miragoli, M., Faggian, G., & Gorelik, J. (2021). Local hyperactivation of L-type Ca²⁺ channels increases spontaneous Ca²⁺ release activity and

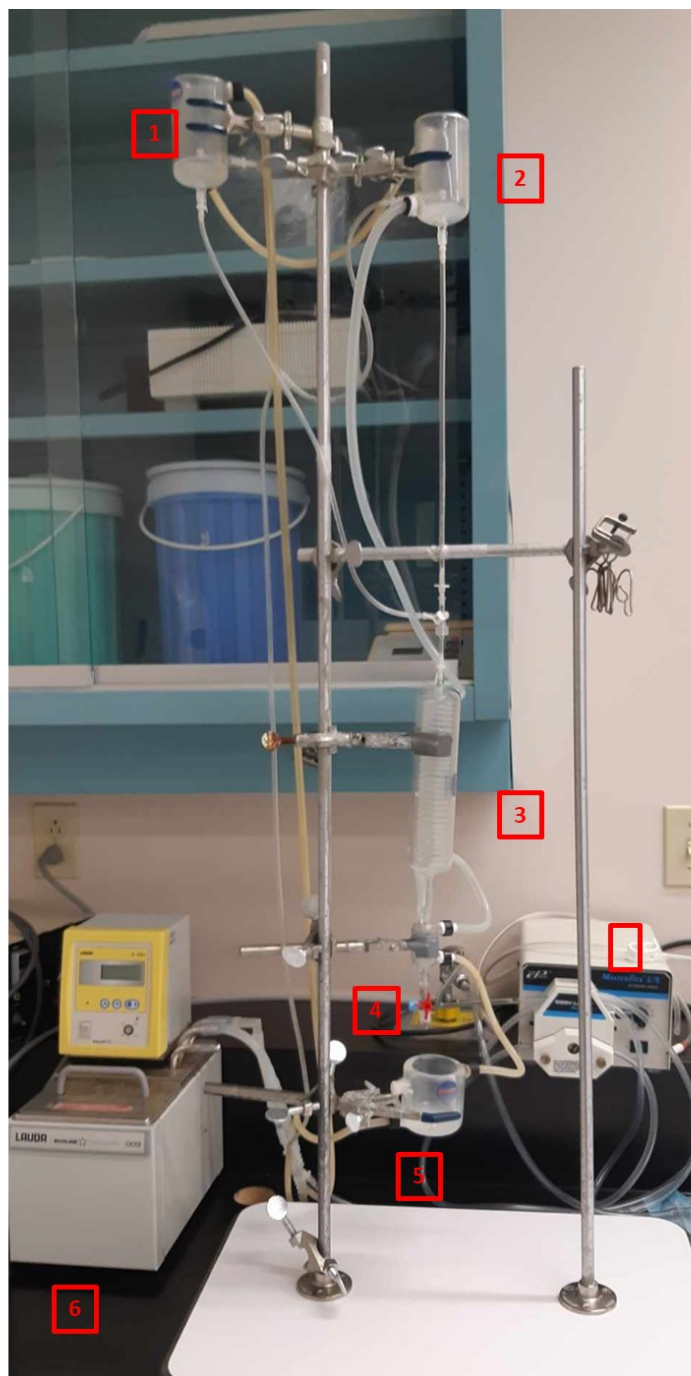
- cellular hypertrophy in right ventricular myocytes from heart failure rats. *Scientific Reports*, *11*(1), 4840. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84275-w>
- Moreira, L. M., Takawale, A., Hulsurkar, M., Menassa, D. A., Antanaviciute, A., Lahiri, S. K., Mehta, N., Evans, N., Psarros, C., Robinson, P., Sparrow, A. J., Gillis, M.-A., Ashley, N., Naud, P., Barallobre-Barreiro, J., Theofilatos, K., Lee, A., Norris, M., Clarke, M. V., ... Reilly, S. (2020). Paracrine signalling by cardiac calcitonin controls atrial fibrogenesis and arrhythmia. *Nature*, *587*(7834), 460-465. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2890-8>
- Moreira, L., Takawale, A., Menassa, D. A., Psarros, C., Mehta, N., Evans, N., Gillis, M.-A., Lee, A., Naud, P., Norris, M., Clarke, M. V., Russell, P. K., Casadei, B., Bhattacharya, S., Zajac, J. D., Davey, R. A., Sirois, M., Sayeed, R., Krasopoulos, G., ... Reilly, S. (2022). Calcitonin paracrine signaling controls heart fibrogenesis and arrhythmia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *173*, 85-86. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.08.171>
- Murphy, N. F., Simpson, C. R., Jhund, P. S., Stewart, S., Kirkpatrick, M., Chalmers, J., MacIntyre, K., & McMurray, J. J. V. (2007). A national survey of the prevalence, incidence, primary care burden and treatment of atrial fibrillation in Scotland. *Heart*, *93*(5), 606-612. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.107573>
- Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0007-y>
- Peng, D.-W., Lai, Y.-Y., Luo, X.-S., Li, X., Deng, C.-Y., Guo, H.-M., Zhao, J.-F., Yang, H., Liu, Y., Wang, Z.-Y., Xu, Y.-W., Kuang, S.-J., Wu, S.-L., Xue, Y.-M., & Rao, F. (2022). Connexin 43 participates in atrial electrical remodelling through colocalization with calcium channels in atrial myocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *49*(1), 25-34. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13580>

- Rietbrock, S., Heeley, E., Plumb, J., & van Staa, T. (2008). Chronic atrial fibrillation : Incidence, prevalence, and prediction of stroke using the Congestive heart failure, Hypertension, Age >75, Diabetes mellitus, and prior Stroke or transient ischemic attack (CHADS2) risk stratification scheme. *American Heart Journal*, 156(1), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.03.010>
- Sánchez, F. J., Gonzalez, V. A., Farrando, M., Baigorria Jayat, A. O., Segovia-Roldan, M., García-Mendivil, L., Ordovás, L., Prado, N. J., Pueyo, E., & Diez, E. R. (2020). Atrial Dyssynchrony Measured by Strain Echocardiography as a Marker of Proarrhythmic Remodeling and Oxidative Stress in Cardiac Surgery Patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 8895078. <https://doi.org/10.1155/2020/8895078>
- Scott Jr, L., Fender, A. C., Saljic, A., Li, L., Chen, X., Wang, X., Linz, D., Lang, J., Hohl, M., Twomey, D., Pham, T. T., Diaz-Lankenau, R., Chelu, M. G., Kamler, M., Entman, M. L., Taffet, G. E., Sanders, P., Dobrev, D., & Li, N. (2021). NLRP3 inflammasome is a key driver of obesity-induced atrial arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 117(7), 1746-1759. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab024>
- Staerk, L., Sherer, J. A., Ko, D., Benjamin, E. J., & Helm, R. H. (2017). Atrial Fibrillation : Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. *Circulation Research*, 120(9), 1501-1517. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309732>
- Sun, Y.-L., Li, P.-H., Shi, L., Su, W.-Z., Li, D.-S., Xue, G.-L., Zhao, Y., Li, C.-Z., Li, Y., Zhou, Y., Li, S.-X., Zhang, Y., Lu, Y.-J., & Pan, Z.-W. (2018). Valsartan reduced the vulnerability to atrial fibrillation by preventing action potential prolongation and conduction slowing in castrated male mice : SUN ET AL. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 29(10), 1436-1443. <https://doi.org/10.1111/jce.13697>

- Wakili, R., Yeh, Y.-H., Yan Qi, X., Greiser, M., Chartier, D., Nishida, K., Maguy, A., Villeneuve, L.-R., Boknik, P., Voigt, N., Krysiak, J., Kääh, S., Ravens, U., Linke, W. A., Stienen, G. J. M., Shi, Y., Tardif, J.-C., Schotten, U., Dobrev, D., & Nattel, S. (2010). Multiple Potential Molecular Contributors to Atrial Hypocontractility Caused by Atrial Tachycardia Remodeling in Dogs. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 3(5), 530-541. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.933036>
- Waldmann, V., Jouven, X., Narayanan, K., Piot, O., Chugh, S. S., Albert, C. M., & Marijon, E. (2020). Association Between Atrial Fibrillation and Sudden Cardiac Death : Pathophysiological and Epidemiological Insights. *Circulation Research*, 127(2), 301-309. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316756>
- Wang, L., Zhang, Y.-L., Lin, Q.-Y., Liu, Y., Guan, X.-M., Ma, X.-L., Cao, H.-J., Liu, Y., Bai, J., Xia, Y.-L., Du, J., & Li, H.-H. (2018). CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration. *European Heart Journal*, 39(20), 1818-1831. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy085>
- Watson, T., Shantsila, E., & Lip, G. Y. (2009). Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *The Lancet*, 373(9658), 155-166. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60040-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60040-4)
- Wei, X., Zou, S., Xie, Z., Wang, Z., Huang, N., Cen, Z., Hao, Y., Zhang, C., Chen, Z., Zhao, F., Hu, Z., Teng, X., Gui, Y., Liu, X., Zheng, H., Zhou, H., Chen, S., Cheng, J., Zeng, F., ... Li, J. (2022). EDIL3 deficiency ameliorates adverse cardiac remodelling by neutrophil extracellular traps (NET)-mediated macrophage polarization. *Cardiovascular Research*, 118(9), 2179-2195. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab269>

- Wijffels, M. C. E. F., Kirchhof, C. J. H. J., Dorland, R., & Allessie, M. A. (1995). Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation. *Circulation*, 92(7), 1954-1968. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.7.1954>
- Woodcock, E. A., & Matkovich, S. J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(9), 1746-1751. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.04.011>
- Yao, C., Veleva, T., Scott, L., Cao, S., Li, L., Chen, G., Jeyabal, P., Pan, X., Alsina, K. M., Abu-Taha, I., Ghezelbash, S., Reynolds, C. L., Shen, Y. H., LeMaire, S. A., Schmitz, W., Müller, F. U., El-Armouche, A., Tony Eissa, N., Beeton, C., ... Li, N. (2018). Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation*, 138(20), 2227-2242. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035202>
- Yeh, Y.-H., Wakili, R., Qi, X.-Y., Chartier, D., Boknik, P., Kääh, S., Ravens, U., Coutu, P., Dobrev, D., & Nattel, S. (2008). Calcium-Handling Abnormalities Underlying Atrial Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Dogs With Congestive Heart Failure. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 1(2), 93-102. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.107.754788>
- Zhao, N., Li, Q., Zhang, K., Wang, K., He, R., Yuan, Y., & Zhang, H. (2020). Heart failure-induced atrial remodelling promotes electrical and conduction alternans. *PLoS Computational Biology*, 16(7), e1008048. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008048>
- Zhou, X., Wu, Y., Ye, L., Wang, Y., Zhang, K., Wang, L., Huang, Y., Wang, L., Xian, S., Zhang, Y., & Chen, Y. (2019). Aspirin alleviates endothelial gap junction dysfunction through inhibition of NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced vascular injury. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(4), 711-723. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.02.008>

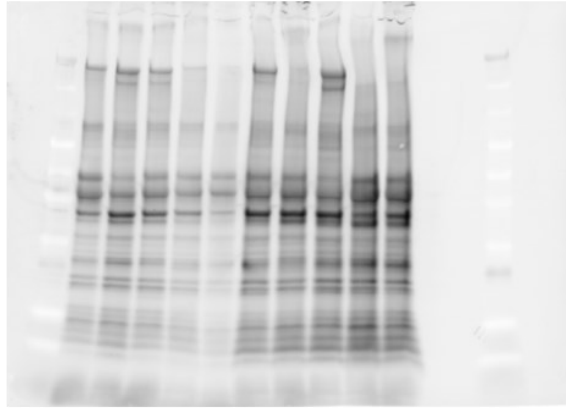
Annexes



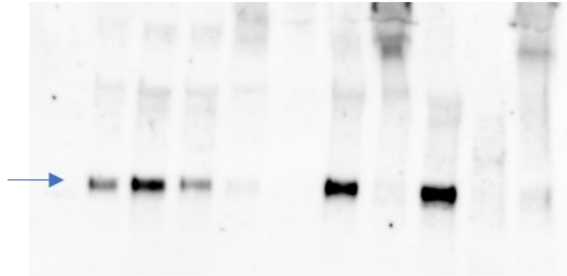
Système de Langendorff: 1: cuve n°1; 2: cuve n°2; 3: serpentin de chauffage; 4: canule; 5: cuve de chauffage; 6: bain-marie; 7: pompe péristaltique.

Annexe 1 – Photographie du système de Langendorff

Gel de protéine totale M1



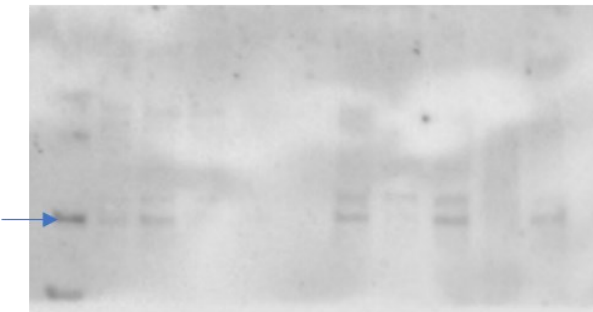
SERCA2a, 110kDa



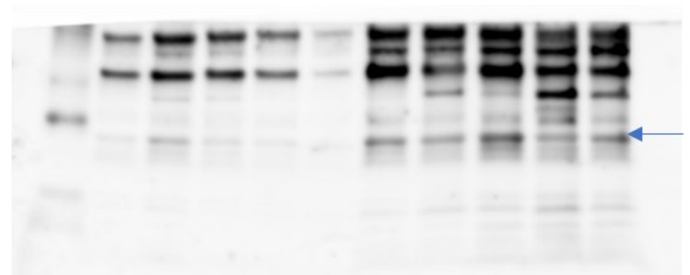
IL-1b, 17kDa



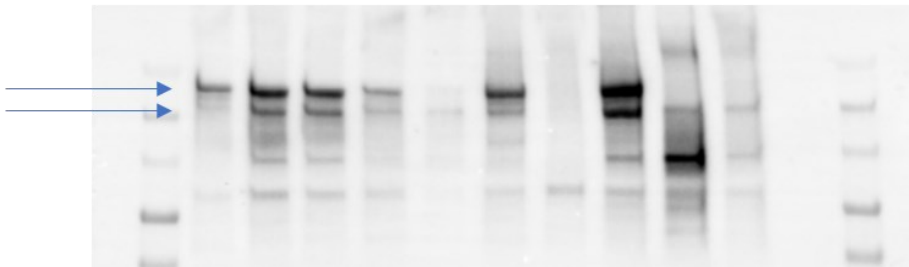
NLRP3, 110kDa



IL-6, 26kDa

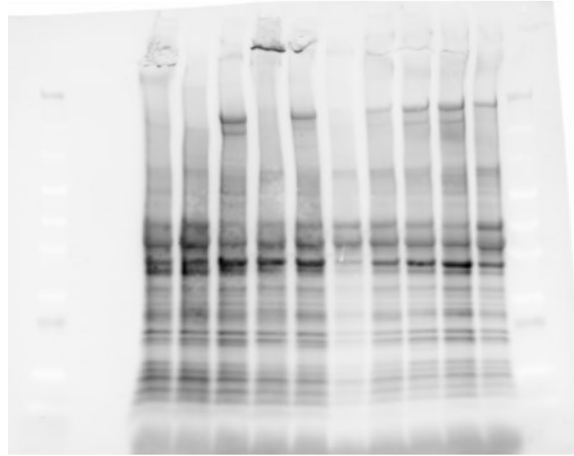


Cav1.2, 210,250kDa

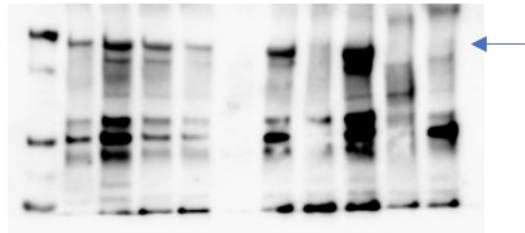


Annexe 2 – Numérisation du gel d'immuno-buvardage de protéine totale M1 et les gels entiers associés

Gel de protéine totale M2

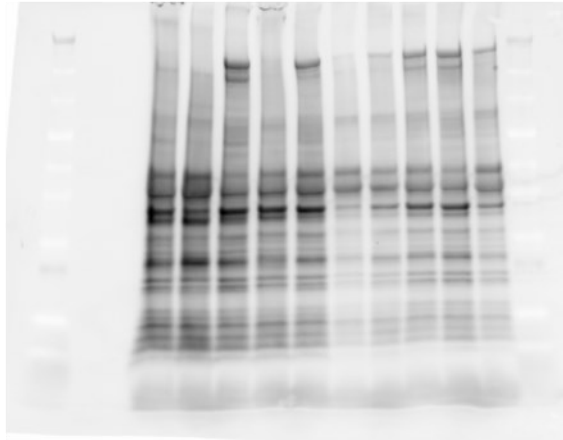


Nav1.5, 227kDa

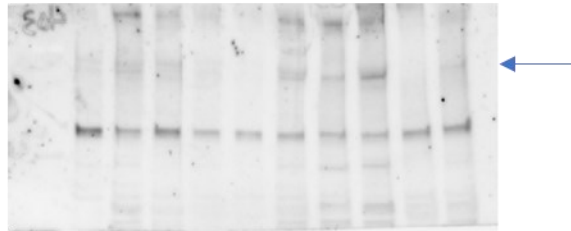


Annexe 3 – Numérisation du gel d'immuno-buvardage de protéine totale M2 et le gel entier associé

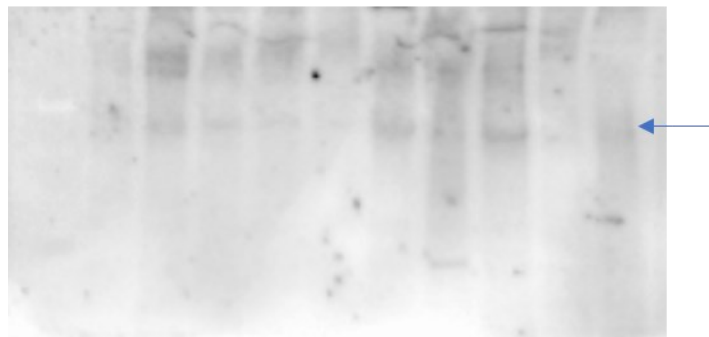
Gel de protéine totale M3



Col1A1, 139kDa

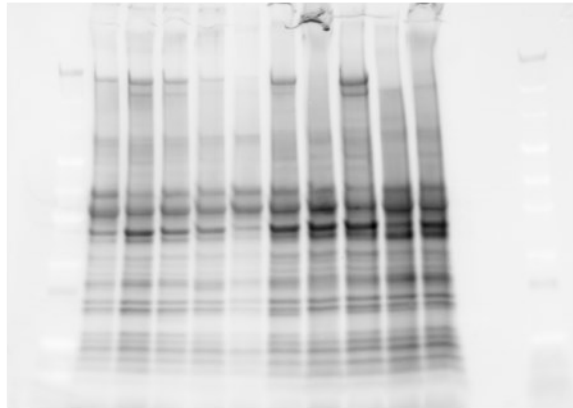


Col3A1, 139kDa



Annexe 4 – Numérisation du gel d'immuno-buvardage de protéine totale M3 et les gels entiers associés

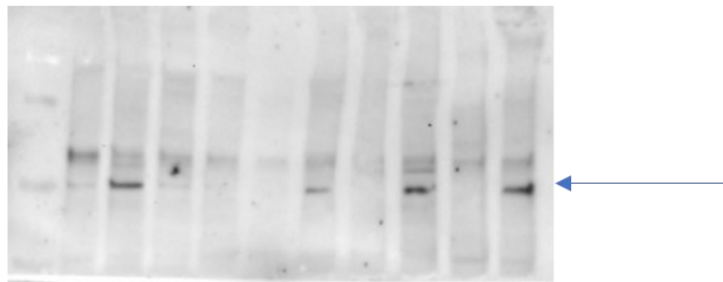
Gel de protéine totale M4



RyR2, 565kDa



KCNQ1, 75,61kDa



Annexe 5 – Numérisation du gel d'immuno-buvardage de protéine totale M4 et les gels entiers associés