

Université de Montréal

**Les mécanismes sous-jacents aux effets
pathologiques cardiaques de l'angiotensine II dans
le remodelage électrique et contractile entre les
sexes**

par
Sophie Mathieu

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de pharmacie
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Juin 2015

© Sophie Mathieu, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Les mécanismes sous-jacents aux effets pathologiques cardiaques de
l'angiotensine II dans le remodelage électrique et contractile entre les sexes

présentée par :
Sophie Mathieu

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Huy Ong, président-rapporteur
Dr Céline Fiset, directrice de recherche
Dr Michèle Brochu, membre du jury
Dr Susan Howlett, examinatrice externe
Dr Marie Lordkipanidzé, représentante du doyen de la FES

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) est associée à un taux de mortalité et d'hospitalisations élevé causant un fardeau économique important. Les deux causes majeures de décès de l'IC sont les arythmies ventriculaires létales et les sidérations myocardiques. Il est maintenant reconnu que l'angiotensine II (ANGII) est l'un des principaux médiateurs de l'IC. Ses effets délétères découlent de l'activation du récepteur de type 1 de l'ANGII (AT1) et entraînent le développement d'hypertrophie. Toutefois, son rôle dans la genèse d'arythmies demeure incompris. De ce fait, l'étude des mécanismes électriques et contractiles sous-jacents aux effets pathologiques de l'ANGII s'avère essentielle afin de mieux comprendre et soigner cette pathologie.

Il est souvent perçu que les femmes sont protégées envers les maladies cardiovasculaires. Cependant, le nombre total de femmes décédant d'IC est plus grand que le nombre d'hommes. Également, l'impact des facteurs de risque diffère entre chaque sexe. Ces différences existent, mais les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus. De plus, les femmes reçoivent fréquemment un diagnostic ou un traitement inapproprié en raison d'un manque d'information sur les différences entre les sexes dans la manifestation d'une pathologie. Ce manque de données peut découler du fait que les sujets de sexe féminin sont souvent sous-représentés dans les essais cliniques ou la recherche fondamentale ce qui a grandement limité l'avancement de nos connaissances sur ~50 % de la population. Ainsi, il semble plus que nécessaire d'approfondir notre compréhension des différences entre les sexes, notamment dans la progression de l'IC.

L'utilisation d'un modèle de souris transgénique surexprimant le récepteur AT1 (souris AT1R) a permis d'étudier les changements électriques, structurels et contractiles avant et après le développement d'hypertrophie. Premièrement, chez les souris AT1R mâles, un ralentissement de la conduction ventriculaire a été observé indépendamment de l'hypertrophie. Ce résultat était expliqué par une réduction de la densité du courant Na^+ , mais pas de l'expression du canal. Ensuite,

le rôle des protéines kinases C (PKC) dans la régulation du canal Na^+ par l'ANGII a été exploré. Les évidences ont suggéré que la $\text{PKC}\alpha$ était responsable de la modulation de la diminution du courant Na^+ chez les souris AT1R mâles et dans les cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches induites pluripotentes (hiPSC-CM) en réponse à un traitement chronique à l'ANGII. Ensuite, les différences entre les sexes ont été comparées chez la souris AT1R. Une plus grande mortalité a été constatée chez les femelles AT1R suggérant qu'elles sont plus sensibles à la surexpression de AT1R. Le remodelage électrique ventriculaire a donc été comparé entre les souris AT1R des deux sexes. Les courants ioniques étaient altérés de façon similaire entre les sexes excluant ainsi leur implication dans la mortalité plus élevée chez les femelles. Ensuite, l'homéostasie calcique et la fonction cardiaque ont été étudiées. Il a été démontré que les femelles développaient une hypertrophie et une dilatation ventriculaire plus sévère que les mâles. De plus, les femelles AT1R avaient de petits transitoires calciques, une extrusion du Ca^{2+} plus lente ainsi qu'une augmentation de la fréquence des étincelles Ca^{2+} pouvant participer à des troubles contractiles et à la venue de post-dépolarisations précoces.

En conclusion, l'ANGII est impliquée dans le remodelage électrique, structurel et calcique associé à l'émergence de l'IC. De surcroît, ces altérations affectent plus sévèrement les femelles soulignant la présence de différences entre les sexes dans le développement de l'IC.

Mots-clés : Récepteur de type 1 de l'angiotensine II, Différence entre les sexes, Arythmies ventriculaires, Courant Na^+ , Protéine kinase Ca , Homéostasie calcique, Hypertrophie, Souris transgénique, hiPSC-CM

Abstract

Heart failure (HF) is associated with a high mortality and hospitalisations rate causing an important economic burden. The two main causes of mortality in HF are severe ventricular arrhythmias and myocardial stunning. It is now recognized that angiotensin II (ANGII) is one of the main effectors of HF and its deleterious roles are mediated through the activation of the ANGII type 1 (AT1) receptor. Even though it has been shown that ANGII can induce cardiac hypertrophy, its impact on cardiac arrhythmias remains incompletely understood. Therefore, it seems essential to better understand the underlying electrical and contractile mechanisms associated with a chronic ANGII stimulation in order to improve HF therapy.

There is a misperception that women are protected against cardiovascular diseases. Nevertheless, a higher number of women die of HF than men. Risk factors also impact differently men and women. The mechanisms underlying these differences are still poorly understood. Furthermore, women frequently receive an inappropriate diagnosis or treatment because of unacknowledged sex differences. This lack of knowledge may result from the fact that women and female animals are too often underrepresented in clinical trials or basic research studies even though they represent 50 % of the population. As a consequence, our knowledge on women pathology is significantly limited. Hence, these observations warrant further investigation to better comprehend sex differences especially in the manifestation and progression of HF.

Transgenic mice with a cardiomyocyte specific overexpression of the AT1 receptor (AT1R) have been used to study the electrical, structural and contractile changes occurring before and after the development of hypertrophy. It was first observed in AT1R male mice that ventricular conduction was slowed independently of hypertrophy. This result was due to a reduction in Na^+ current density, but not channel expression. Consequently, the involvement of protein kinase C (PKC) in the regulation of the Na^+ current by ANGII was studied and

results obtained from mouse and human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) suggest that PKC α is responsible for the reduction in Na⁺ current observed in AT1R male mice and after chronic ANGII exposure. Subsequently, sex differences were also investigated in AT1R mice. We observed that female AT1R mice have a higher mortality rate compared to males suggesting they are more sensitive to AT1R overexpression. Since ventricular electrical remodeling was similarly altered between AT1R mice of both sexes it could not explain the higher mortality rate of AT1R females. Accordingly, cardiac function and Ca²⁺ dynamics were evaluated next and the data showed that AT1R females develop more severe ventricular hypertrophy and dilation than males. In addition, AT1R females had a small Ca²⁺ transients, slower Ca²⁺ reuptake along with a higher Ca²⁺ spark frequency which could contribute to poor contraction and cardiac arrhythmias through the promotion of delayed after depolarization.

In conclusion, ANGII is implicated in electrical, structural and Ca²⁺ handling remodeling that promotes poor prognosis associated with HF. Furthermore, these alterations affected female mice more severely highlighting important sex differences in the manifestation of HF.

Keywords : Angiotensin II type 1 receptor, Sex differences, Ventricular arrhythmias, Na⁺ current, Protein kinase C α , Ca²⁺ handling, Hypertrophy, Transgenic mouse, hiPSC-CM

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xii
Remerciements.....	xviii
1. Introduction	1
1.1 Maladies cardiovasculaires.....	1
1.1.1 Insuffisance cardiaque.....	2
1.1.2 Cardiomyopathies	3
1.1.2.1 Cardiomyopathie restrictive.....	3
1.1.2.2 Cardiomyopathie hypertrophique	4
1.1.2.3 Cardiomyopathie dilatée.....	5
1.1.2.4 Cardiomyopathie de type Tako-Tsubo	7
1.1.2.5 Cardiomyopathie diabétique	7
1.1.2.6 Remodelage ventriculaire	8
1.1.2.7 Facteurs de risque.....	8
1.1.2.7.1 L'hypertension artérielle	9
1.1.2.7.2 Infarctus du myocarde	12
1.1.2.8 Régulation neurohormonale.....	12
1.1.2.9 Angiotensine II.....	15
1.1.3 Récepteurs à l'angiotensine II	15
1.1.3.1 Le récepteur de type 1 de l'angiotensine II	16
1.1.3.1.1 Protéine kinase C	19
1.1.3.2 Récepteur de type 2 de l'angiotensine II	20

1.1.4	Modèles d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque chez la souris	20
1.1.5	Arythmies ventriculaires	25
1.1.5.1	Extrasystole ventriculaire	25
1.1.5.2	Tachycardie ventriculaire	27
1.1.5.3	Torsade de pointe	28
1.1.5.4	Fibrillation ventriculaire	28
1.2	Activité électrique cardiaque en conditions physiologiques et pathophysiologiques	29
1.2.1	Électrocardiogramme	31
1.2.1.1	Comparaison de l'ECG humain à celui de la souris	33
1.2.2	Électrophysiologie des myocytes ventriculaires.....	34
1.2.2.1	Potentiel d'action ventriculaire	34
1.2.2.1.1	Canaux sodiques	41
1.2.2.1.2	Canaux calciques	47
1.2.2.1.3	Canaux potassiques.....	49
1.2.2.2	Couplage excitation-contraction	51
1.2.3	Différences entre les sexes dans l'activité électrique et contractile cardiaque	56
1.2.3.1	Rôle des hormones sexuelles dans la régulation de l'activité électrique chez l'humain	56
1.2.3.2	Prévalence des arythmies entre les sexes	57
1.2.3.3	Régulation par les hormones sexuelles de l'activité électrique cardiaque dans les modèles animaux	58
1.2.3.4	Régulation par les hormones sexuelles de l'activité contractile dans les modèles animaux	60
1.3	Contextualisation et hypothèses de l'étude	62
2.	Méthodologie	65
2.1	Électrocardiogramme	65
2.1.1	Électrocardiogramme de surface	65

2.1.2	Électrocardiogramme sur cœur isolé par perfusion de type Langendorff	66
2.2	Isolation de myocytes ventriculaires par perfusion de type Langendorff	66
2.3	Cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines	71
2.4	Patch-clamp	72
2.5	Raccourcissement cellulaire	76
2.6	Transitoire calcique	77
2.7	Étincelle calcique	80
2.8	Réaction de polymérase en chaîne en temps réel	80
2.9	Immunobuvardage de type Western	81
2.10	Analyse statistique	85
3.	Article 1	86
3.1	Avant propos	87
	Animals	94
	Animals	117
4.	Article 2	123
4.1	Avant-propos	124
	A detailed description of the methods can be found in the online data supplement.	129
	Animals	129
	Echocardiography	130
	Animals	152
5.	Discussion	158
5.1	Résumé des projets de thèse	158
5.1.1	Commentaire et perspectives de l'étude 1	158
5.1.2	Commentaire et perspectives de l'étude 2	162
5.2	Interrelations entre les projets de recherche sur la souris AT1R	167

5.3	Connaissances et applications cliniques du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	169
5.4	Perspectives d'applications cliniques des projets de cette thèse	173
5.4.1	PKC α comme cible thérapeutique	173
5.5	Limitations des modèles utilisés.....	177
5.5.1	Modèle de souris AT1R	177
5.5.2	Cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines	178
5.5.3	Effets de l'angiotensine II dans divers modèles	180
5.5.3.1	Projet sur les courants Ca ²⁺ de type T	181
5.6	Les femmes et les maladies cardiovasculaires	182
5.7	Commentaire final	184
	Bibliographie	i
	ANNEXE I : Curriculum vitae	i
	ANNEXE II : Données supplémentaires.....	vi

Liste des tableaux

Table 1. Méthode de classement du NYHA de l'IC	2
Table 2. Liste des inhibiteurs de protéases.....	83
Table II.1. Paramètres mesurés sur des ECG de surface sur les souris AT1R et CTL mâles (M) et femelles (F) à l'âge de 50 jours (50d) et 6 mois (6m).....	vii
Table II.2. Paramètres mesurés sur des ECG en Langendorff sur les cœurs isolés de souris AT1R et CTL mâles (M) et femelles (F) à l'âge 6 mois (6m).....	viii

Liste des figures

Figure 1.1. Type de remodelages des sarcomères selon la forme d’hypertrophie....	6
Figure 1.2. Comparaison des types d’insuffisance cardiaque	10
Figure 1.3. Voies de signalisation associées à $G\alpha_q$ dans le développement d’hypertrophie cardiaque.....	17
Figure 1.4. Schématisation d’un circuit de réentrée entre les fibres de Purkinje et les myocytes	27
Figure 1.5. Représentation d’une torsade de pointe à l’ECG	28
Figure 1.6. Exemple d’un ECG présentant une fibrillation ventriculaire	29
Figure 1.7. Représentation du système de conduction cardiaque.....	30
Figure 1.8. Illustration des différents paramètres retrouvés à l’ECG	31
Figure 1.9. Comparaison de l’ECG chez l’humain et la souris	33
Figure 1.10. Les différentes phases du potentiel d’action humain	35
Figure 1.11. Potentiel d’action ventriculaire humain comparé à celui de la souris	36
Figure 1.12. Différents mécanismes d’arythmies cellulaires	38
Figure 1.13. Correspondance entre l’ECG et le potentiel d’action.....	40
Figure 1.14. Structure linéaire de la sous-unité α du canal Na^+	43
Figure 1.15. Structure linéaire des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage	48
Figure 1.16. Couplage excitation-contraction	52
Figure 2.1. Isolation cellulaire par perfusion de type Langendorff.....	67
Figure 2.2 Perfusion adéquate des artères coronaires	68
Figure 2.3 Représentation de potentiels d’action d’une cellule de l’épicaarde et de l’endocarde	70
Figure 2.4. Configuration cellule entière.....	73
Figures de l’article 1	
Figure 1. QRS complex is prolonged in AT1R mice.....	110
Figure 2. I_{Na} is reduced in AT1R mice in comparison to CTL.....	111

Figure 3. mRNA and protein Nav1.5 expression is only reduced with hypertrophy 112

Figure 4. PMA decreases I_{Na} density 113

Figure 5. PKC α expression is increased at the sarcolemmal level in AT1R mice of both ages..... 114

Figure 6. PKC α is involved in I_{Na} density reduction induced by ANGII in hiPSC-CM 116

Figures de l'article 2

Figure 1. Early onset of mortality along with a higher rate is observed in female AT1R mice compared to males 146

Figure 2. Ventricular currents in male and female AT1R mice are similarly affected in comparison to CTL..... 147

Figure 3. Female AT1R mice develop more severe ventricular hypertrophy than AT1R males..... 148

Figure 4. Alteration in Ca²⁺ homeostasis are greater in female AT1R mice..... 149

Figure 5. Caffeine induced transients are differently affected between male and female mice..... 150

Figure 6. Sparks frequency is increased in AT1R female myocytes 151

Figure II.1 Expression du récepteur AT1 dans les souris CTL et AT1R des deux sexes (M : mâle, F : femelle) à l'âge de 50 jours (50d) et 6 mois (6m) vi

Figure II.2 Potentiel d'action chez les souris AT1R de 6 mois ix

Liste des abréviations

Abréviation utilisée	Terme en français	Abréviation anglaise	Terme en anglais
4-AP	4-aminopyridine	4-AP	4-aminopyridine
ANGII	Angiotensine II	ANGII	Angiotensin II
ARA	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II	ARB	Angiotensin receptor blocker
AA	Antagoniste de l'aldostérone	MRA	Mineralocorticoid receptor antagonist
AT1R	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II	AT1R	Angiotensin II type 1 receptor
BNP	Peptide natriurétique du ventricule	BNP	Brain natriuretic peptide
CSQ	Calséquestrine	CSQ	Calsequestrin
CEC	Couplage excitation-contraction	ECC	Excitation-contraction coupling
CICR	Ca ²⁺ induit la relâche de Ca ²⁺	CICR	Ca ²⁺ induced Ca ²⁺ release
Cx43	Connexine 43	Cx43	Connexin 43

Courbe IV	Courbe courant en fonction du voltage	IV curve	Current-voltage relationship
DAD	Post-dépolarisation tardive	DAD	Delayed afterdepolarization
DPA	Durée du potentiel d'action	APD	Action potential duration
EAD	Post-dépolarisation précoce	EAD	Early afterdepolarization
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine II	ACE	Angiotensin II converting enzyme
ECG	Électrocardiogramme	ECG	Electrocardiogram
ER	Récepteur à l'œstrogène	ER	Estrogen receptor
hiPSC-CM	Cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines	hiPSC-CM	Human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes
IC	Insuffisance cardiaque	HF	Heart failure
I _{CaL}	Courant calcique de type L	I _{CaL}	L-type Ca ²⁺ current
ICpEF	Insuffisance cardiaque avec	HFpEF	Heart failure with preserved ejection

	fraction d'éjection préservée		fraction
ICrEF	Insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite	HFrEF	Heart failure with reduced ejection fraction
IECA	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II	ACEI	Angiotensin II converting enzyme inhibitor
I_f	Courant pacemaker	I_f	Funny current or Pacemaker current
I_{K1}	Courant K^+ à rectification entrante	I_{K1}	Inward-rectifier K^+ current
I_{Kr}	Courant K^+ à rectification rapide	I_{Kr}	Rapid delayed rectifier K^+ current
I_{Ks}	Courant K^+ à rectification lente	I_{Ks}	Slow delayed rectifier K^+ current
I_{Kur}	Courant K^+ à rectification ultrarapide	I_{Kur}	Ultrarapid delayed rectifier K^+ current
IM	Infarctus du myocarde	MI	Myocardial infarctus
I_{Na}	Courant sodique	I_{Na}	Na^+ current

I_{NaL}	Courant sodique soutenu	I_{NaL}	Late Na^+ current
I_{peak}	Somme des courants K^+ sortants	I_{peak}	Total outward K^+ currents
I_{ss}	Courant K^+ soutenu	I_{ss}	Steady-state K^+ current
I_{to}	Courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+}	I_{to}	Ca^{2+} -independent transient outward K^+ current
LQT	QT long	LQT3	Long QT
LVIDd	Dimension interne du ventricule gauche à la fin de la diastole	LVIDd	Left ventricular internal dimension at end diastole
NAV	Nœud auriculo-ventriculaire	AVN	Atrioventricular node
NCX	Échangeur sodium-calcium	NCX	Na^+/Ca^{2+} exchanger
NS	Nœud sinusal	SAN	Sinoatrial node
PKA	Protéine kinase A	PKA	Protein Kinase A
PKC	Protéine kinase C	PKC	Protein Kinase C
PLB	Phospholamban	PLB	Phospholamban
RyR2	Récepteur à la ryanodine de type 2	RyR2	Ryanodine receptor, type 2

SERCA2	Pompe Ca ²⁺ ATPase du réticulum sarco/endoplasmique	SERCA2	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ - ATPase
SRAA	Système rénine angiotensine aldosterone	RAAS	Renin angiotensin aldosterone system
TAC	Constriction transaortique	TAC	Transverse aortic constriction
TdeP	Torsade de pointe	TdeP	<i>Torsades de pointe</i>
αMHC	Chaîne lourde de myosine α	αMHC	α myosin heavy chain

*Je dédie cette thèse à Nabil, en qui je suis reconnaissante pour
son aide, son soutien et ses encouragements d'une valeur inestimable
dans l'accomplissement de mon doctorat*

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice Dr Céline Fiset pour son incroyable soutien durant les six années où j'ai fait partie de son équipe de recherche. En raison de son encadrement remarquable, sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique et de son enthousiasme sans limites, je considère que j'ai bénéficié d'un mentorat et d'une formation scientifique incomparables. D'autre part, la grande autonomie qui m'a été accordée a consolidé ma confiance en moi et en mes aptitudes. Je ressors donc grandie de cette aventure que sont les études aux cycles supérieurs et considère que toutes les notions acquises me permettront de relever les défis futurs. Pour tout, un grand et sincère merci chère Céline.

Lors de ces années au laboratoire, j'ai eu l'opportunité de rencontrer plusieurs personnes dynamiques qui ont collaboré à l'avancement de mes travaux. J'aimerais tout spécialement remercier Nabil El Khoury pour son engagement intellectuel et scientifique, de même que pour son appui moral. Également, un merci spécial à Nathalie Éthier pour sa générosité et son altruisme. Sans oublier, tous les autres membres du laboratoire passés et présents avec qui j'ai partagé les hauts et les bas du monde de la recherche, mais avec lesquels j'ai aussi développé de belles complicités; merci à Anh Tuan Ton, Scott Grandy, Gracia El Gebeily, Katy Rivard, Jenna Ross, Marion Gayard, François Huynh, Annie Douillette, Charlotte Guinard, Marie-Ève Matte et Oliver Karadjian. Chacun d'entre vous a contribué à créer une ambiance de travail unique, plaisante et stimulante. Je souhaite aussi remercier Dr Patrice Naud, pour ses précieux conseils. Mes remerciements sont aussi envoyés à Marc-Antoine Gillis et Louis Villeneuve pour leur soutien technique. Je voudrais également souligner l'apport et les conseils de Dr Lucie Parent et Dr Jonathan Ledoux en tant que membre de mon comité consultatif.

De plus, je suis très reconnaissante aux membres de mon comité de thèse composé de Dr Susan Howlett, Dr Michèle Brochu, Marie Lordkipanidzé et Dr Huy Ong qui ont aimablement accepté d'évaluer ma thèse et de partager leur savoir.

Enfin, un merci à ma famille particulièrement à ma mère Christine qui a toujours été présente pour moi.

1. Introduction

1.1 Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de mortalité dans le monde ¹. Elles peuvent découler de mutations génétiques, mais aussi de facteurs environnementaux tels que l'obésité, la sédentarité et le tabagisme. En effet, au Canada, malgré les avancées thérapeutiques qui ont permis de réduire de 40 % le taux de mortalité associé aux maladies cardiovasculaires, celles-ci demeurent responsables du décès d'une personne toutes les sept minutes ². Plusieurs pathologies comme l'hypertension et l'infarctus du myocarde favorisent le développement de l'insuffisance cardiaque (IC) dont le taux de mortalité annuel est de 10 % ^{3, 4}. L'IC se définit par un remodelage du cœur nuisant à sa capacité de pomper le sang et de perfuser l'organisme et son développement diffère entre les hommes et les femmes. Il s'agit d'une condition grave pour laquelle les patients ont un taux de survie inférieur à 50 % durant les cinq années suivant leur diagnostic ce qui illustre la sévérité de cette maladie ^{3, 5}. En général, l'émergence de l'IC a été favorisée, entre autres, par l'arrivée de nouveaux traitements efficaces améliorant la survie post-infarctus, le vieillissement de la population ainsi que l'accroissement de comorbidités ^{6, 7}. D'ailleurs dans la population de plus de 65 ans, les troubles associés à l'IC sont la principale cause de consultation en hôpital ⁸. En conséquence, les frais d'hospitalisation engendrés par l'IC sont évalués à plus de 29 milliards de dollars par année aux États-Unis ⁶. Il apparaît donc impératif de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces pathologies dans le but d'en améliorer les thérapies et d'en prévenir le développement. De plus, il est important de noter que les médicaments actuels ne parviennent pas à réduire la mortalité pour le type d'IC majoritairement retrouvé chez la femme. Ainsi, il existe un réel besoin d'avancer les recherches dans cette direction afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'IC chez la femme et développer des cibles thérapeutiques pour celles-ci ^{9, 10}.

1.1.1 Insuffisance cardiaque

L'IC se caractérise chez les patients par un souffle court, une fatigue extrême et une enflure des membres inférieurs. Ces symptômes surviennent subséquentement à une incapacité du cœur de se remplir ou de pomper le sang, nuisant ainsi à la perfusion des organes. L'IC est une pathologie survenant à la suite d'une atteinte aiguë ou chronique qui entraîne un remodelage structurel, hémodynamique et fonctionnel du cœur ⁴. Dans un premier temps, ces modifications permettent au cœur d'adapter le débit cardiaque afin de remédier à l'hypoperfusion. Cependant, à long terme, ces ajustements ne suffisent plus et entraînent une défaillance puisque le cœur devient trop faible ou trop rigide pour assurer sa fonction de pompe ¹¹. Le pronostic des patients souffrant d'IC est mauvais puisque les médicaments actuels ne parviennent pas à la guérir. Toutefois, ils réussissent à en retarder la progression en raison de leurs effets bénéfiques au niveau du remodelage cardiaque, de la survie et de l'amélioration de la capacité fonctionnelle des patients ^{5, 12-15}. En clinique, les médecins utilisent deux principaux systèmes de classification pour établir leur pronostic. Le premier de la *New York Heart Association* (NYHA) évalue la fonction du cœur en se basant sur le degré d'affection de la maladie à l'effort évaluant la capacité fonctionnelle du patient alors que le deuxième de l'*American Heart Association* alloue la classe selon la sévérité de la progression des maladies cardiaques ciblant ainsi les personnes à risque de développer l'IC (Table 1).

Table 1. Méthode de classement du NYHA permettant d'évaluer la fonction physique et l'état physiologique de l'individu souffrant d'IC afin d'obtenir son pronostic. Adaptée de ¹⁶

Classe	Symptômes du patient
I	Aucune limite quant à l'activité physique. Niveau d'activité physique normale qui ne cause pas de fatigue, de palpitations ou de dyspnée.
II	Faibles limites quant à l'activité physique. Bien-être au repos. Niveau d'activité physique normale cause de la fatigue, des palpitations ou de la dyspnée.

III	Sévères limites quant à l'activité physique. Bien-être au repos. Faible niveau d'activité physique cause de la fatigue, des palpitations ou de la dyspnée.
IV	Incapacité d'entreprendre une activité physique sans inconfort. Les symptômes de l'IC sont présents au repos et augmentent lors de l'activité physique.

Classe	Évaluation objective
A	Pas d'évidences de maladies cardiovasculaires. Aucun symptôme et aucune limitation lors d'un niveau d'activité physique normale.
B	Présence minimale de maladies cardiovasculaires. Symptômes et limitations légers lors d'un niveau d'activité physique normale. Bien-être au repos.
C	Présence modérée de maladies cardiovasculaires. Sévères limitations lors d'un niveau d'activité physique normale ou légère. Bien-être au repos.
D	Présence de maladies cardiovasculaires sévères. Limitations sévères, les symptômes sont présents au repos.

1.1.2 Cardiomyopathies

Le développement de l'IC est habituellement marqué par la croissance de la masse ventriculaire et l'activation de plusieurs voies de signalisation affectant les cellules du cœur ainsi que la matrice extracellulaire. Ces modifications sont donc responsables de changements dans la forme, la taille, la structure et la fonction du cœur ¹⁷. À noter qu'il existe aussi une forme d'hypertrophie physiologique observée notamment chez les athlètes et les femmes enceintes. Généralement, ce type d'hypertrophie a un développement modéré, réversible et souvent non délétère. En conditions pathologiques, le remodelage ventriculaire mène au développement de cardiomyopathie et possiblement d'IC. Les cardiomyopathies sont présentes sous plusieurs formes : restrictive, hypertrophique, dilatée, Tako-Tsubo ou diabétique ¹⁸.

1.1.2.1 Cardiomyopathie restrictive

La cardiomyopathie restrictive, la forme la plus rarement retrouvée, se caractérise par une augmentation du tissu fibreux des ventricules et cause une perte de l'élasticité du muscle cardiaque ^{18, 19}. Cette rigidité nuit à la relaxation et au

remplissage des ventricules ce qui cause un élargissement des oreillettes. Normalement, les ventricules ne démontrent aucun ou peu de signes de cardiomégalie et la fraction d'éjection est conservée^{18,19}. Cependant, à long terme, cette cardiomyopathie peut conduire à une diminution du flot sanguin et entraîner le développement d'IC ainsi que d'arythmies¹⁹. Le sexe masculin et le vieillissement sont deux facteurs de risques de la maladie¹⁸. Elle a de plus été associée à diverses pathologies comme l'amyloïdose (caractérisé par un dépôt anormal de protéines dans le tissu), l'hémochromatose (découlant d'une accumulation toxique de fer) ainsi que la sarcoïdose (source d'inflammation des tissus conjonctifs). Les traitements contre le cancer, les radiations ou la chimiothérapie peuvent aussi entraîner un désordre structurel au cœur^{18,19}. Lors du diagnostic, il est fréquent d'observer une hypertension pulmonaire ainsi qu'une insuffisance du ventricule droit plus grande que celle du ventricule gauche¹⁸. Quant aux traitements, ils peuvent différer en fonction de l'étiologie de la maladie. Généralement des diurétiques, des antagonistes de l'aldostérone (AA) ou des β -bloquants sont recommandés¹⁸.

1.1.2.2 Cardiomyopathie hypertrophique

La cardiomyopathie hypertrophique affecte une personne sur 500 et touche autant les hommes que les femmes¹⁹. Elle se caractérise par le développement d'une hypertrophie concentrique consistant en un épaissement de la paroi du ventricule gauche provoquant un trouble de remplissage. Malgré cet épaissement, la taille du ventricule demeure inchangée. Cette cardiomyopathie peut provenir de défauts d'ordre génétique ayant des répercussions au niveau de la chaîne lourde de la myosine ou des protéines de l'homéostasie calcique, de l'hypertension artérielle chronique, d'une sténose aortique, de la calcification de la valve mitrale et du diabète^{18,19}. Ces facteurs de risques sont associés au développement des sarcomères en parallèle. Ce remodelage des fibres musculaires composant le muscle cardiaque permet d'augmenter la force d'éjection pour contrecarrer une surcharge volémique cardiaque ou une augmentation de la postcharge^{18,20} (Figure 1.1). Ces défauts structurels et hémodynamiques

entraînent aussi un élargissement des oreillettes et sont associés à une augmentation des arythmies cardiaques^{18, 19}. De plus, cet épaissement peut aussi obstruer la sortie de sang et nuire à l'éjection. D'ailleurs, chez les jeunes et les athlètes, la cardiomyopathie hypertrophique est une cause importante de mort subite cardiaque¹⁹. Le développement d'hypertrophie physiologique chez les athlètes peut transiter vers un remodelage pathologique. Ce changement peut être plus difficilement diagnostiqué, c'est pourquoi la cardiomyopathie hypertrophique est associée avec une haute mortalité chez les athlètes. En plus, l'hypertrophie concentrique peut aussi être accompagnée d'une dilatation des ventricules aggravant ses effets et réduisant la survie²⁰. Les traitements administrés dépendent de l'état du patient. Généralement, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA), les β -bloquants, les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine (ARA) et les bloqueurs des canaux Ca^{2+} sont prescrits^{18, 19}.

1.1.2.3 Cardiomyopathie dilatée

Contrairement aux deux cardiomyopathies précédentes, la cardiomyopathie dilatée nuit plutôt à l'expulsion du sang lors de la systole. Cette défaillance systolique découle d'une dilatation des ventricules et d'un amincissement de leur paroi en raison de la réorganisation des sarcomères en série, caractéristique d'une hypertrophie excentrique^{18, 20} (Figure 1.1). La cardiomyopathie dilatée touche principalement les hommes et elle est responsable de 25 % des cas d'IC¹⁸. Une réduction de la fraction d'éjection et une atteinte au ventricule droit importante sont associées à un pronostic défavorable. En effet, l'élargissement du ventricule gauche peut conduire, avec le temps, à l'élargissement du ventricule droit et des oreillettes, ce qui aggrave l'état du patient¹⁸. La majorité des cardiomyopathies dilatées sont idiopathiques alors que 30-48% sont associées à des anomalies génétiques^{18, 19}. Une autre cause connue est liée à l'alcoolisme^{18, 19}. Le développement d'une cardiomyopathie dilatée peut aussi résulter d'un infarctus du myocarde, de la progression d'athérosclérose, d'une hypertension artérielle et du diabète¹⁹. Ce phénotype peut découler d'une hypertrophie concentrique décompensée²¹. De plus, l'hypertrophie excentrique et l'augmentation de la

Morphologie du ventricule gauche

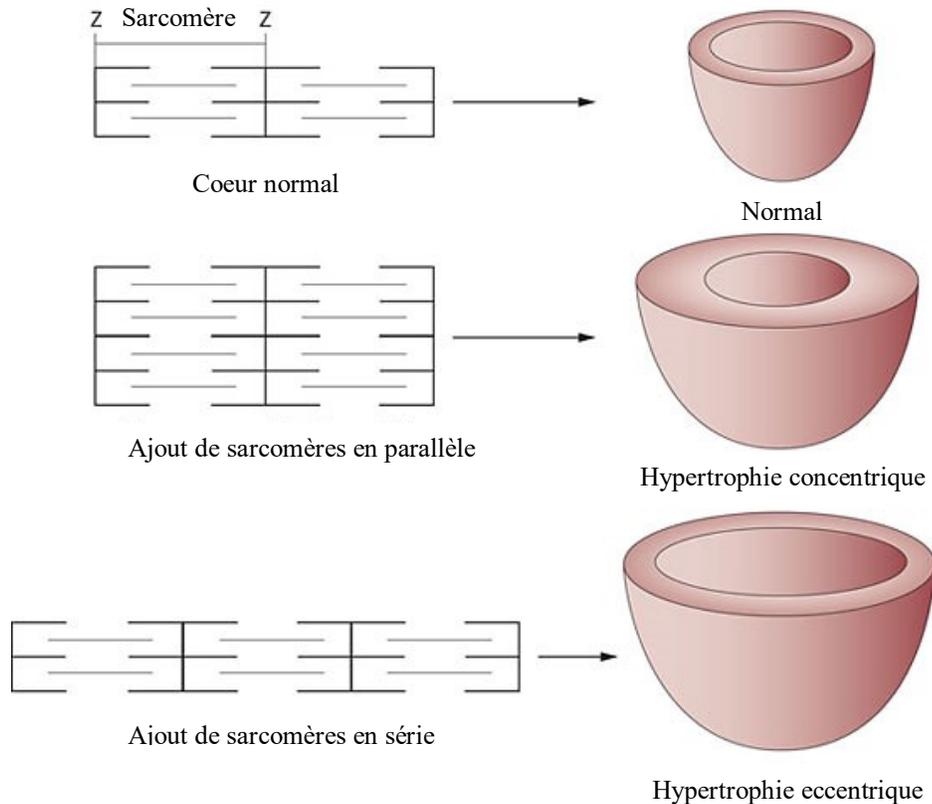


Figure 1.1. Type de remodelages des sarcomères selon la forme d'hypertrophie. Développement des sarcomères en série (*bas*) et en parallèle (*milieu*) et les formes d'hypertrophie qui y sont associées comparativement au cœur normal (*haut*). Adaptée de Gjesdal *et al.* ²⁰

précharge (force qui distend les fibres myocardiques avant la contraction, elle dépend du volume télédiastolique qui définit la pression intra-auriculaire ou ventriculaire) sont associées à un risque d'arythmies plus élevé ^{19,20}. Les thérapies privilégiées sont les IECA, les β -bloquants, les ARA, les diurétiques et les AA. Par contre, l'effet inotrope négatif des bloqueurs des canaux Ca^{2+} est à éviter en raison d'une force de contraction cardiaque déjà affaiblie ¹⁸.

1.1.2.4 Cardiomyopathie de type Tako-Tsubo

Cette cardiomyopathie se caractérise par un ballonnement au niveau de l'apex du ventricule gauche. C'est en raison de cette morphologie particulière en forme d'amphore que son nom, désignant un piège à poulpe, lui a été donné. 90 % des patients affectés par cette cardiomyopathie sont de sexe féminin et ont entre 60-80 ans ce qui suggère un rôle pour les hormones féminines dans l'émergence pathologie ^{18, 22, 23}. De ces cas, la majorité sont d'origine asiatique (57 %) ou caucasienne (40 %) ²². Un relargage important de catécholamines est à l'origine du développement de cette maladie. Les diverses causes pouvant entraîner cette cardiomyopathie sont un événement stressant ou émotionnel, un accident vasculaire cérébral ou une tachycardie ventriculaire ^{18, 22, 23}. Les symptômes sont similaires à ceux d'un infarctus du myocarde, mais découlent d'une sidération myocardique : une hypoperfusion transitoire des coronaires, mais sans blocage de celles-ci. Généralement cette cardiomyopathie est transitoire et les patients sont rétablis en quelques jours ¹⁸. En thérapie, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ANGII ou des β -bloquants sont administrés afin de rétablir la fonction ventriculaire gauche ¹⁸.

1.1.2.5 Cardiomyopathie diabétique

La cardiomyopathie diabétique a été récemment découverte et est devenue un problème de santé important en raison du nombre croissant de personnes souffrant de diabète ^{24, 25}. En effet, le diabète de type 1 et 2 est associé au développement d'une dysfonction diastolique et une hypertrophie ventriculaire gauche précédant la dégénérescence et l'apparition additionnelle d'une dysfonction systolique ²⁵. Ces changements sont associés à une haute incidence de développement d'IC chez les patients souffrant de diabète. Les différents mécanismes identifiés jusqu'à présent et impliqués dans la pathogenèse sont une perturbation de l'homéostasie calcique, la production de fibrose, une augmentation du système rénine-angiotensine et des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des altérations du métabolisme cardiaque et de la fonction mitochondriale ^{24, 25}. Les

patients diabétiques souffrant de cardiomyopathie sont traités avec les mêmes médicaments que ceux souffrant d'IC. De futures études sont nécessaires afin de trouver des cibles thérapeutiques permettant de retarder ou d'arrêter le développement de cette pathologie chez les diabétiques ²⁴.

Dans les prochaines pages, la mention de cardiomyopathie fera référence aux formes hypertrophique ou dilatée puisque ce sont les deux formes les plus connues et fréquentes.

1.1.2.6 Remodelage ventriculaire

La réexpression des gènes fœtaux (« *early fetal gene* ») est propre au phénotype d'hypertrophie. Les stimuli hypertrophiques entraînent l'activation de plusieurs voies de signalisation via les récepteurs couplés aux protéines G, les sérines/thréonines kinases et les thréonines kinases. Ces voies sont connues pour favoriser la transcription de gènes qui sont généralement exprimés lors de la période fœtale pendant laquelle le cœur est en croissance ^{26, 27}. Cependant, à l'âge adulte, cette réexpression s'avère délétère. Lors d'une hypertrophie concentrique, les fibres α de la myosine sont remplacées par des fibres β . Il y a aussi augmentation de l'actine squelettique (fibrose), du peptide natriurétique de l'oreillette (ANP, « atrial natriuretic peptide ») et du ventricule (BNP, « brain natriuretic peptide ») alors que l'expression de la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA2) diminue. Quant à l'hypertrophie excentrique physiologique, elle se caractérise généralement par une dilatation des chambres du myocarde qui peut entraîner ou non une augmentation de l'ANP et/ou du BNP, mais sans modifications de l'expression de SERCA2 ou des fibres de myosine α vers β ^{28, 29}. La cardiomyopathie dilatée peut également se développer à la suite d'une décompensation de l'hypertrophie concentrique.

1.1.2.7 Facteurs de risque

L'IC a une étiologie complexe englobant plusieurs facteurs de risques tels que l'hypertension artérielle, le diabète, le vieillissement et l'infarctus du myocarde qui vont affecter la capacité de contraction et/ou de relaxation du cœur

³⁰. Lorsque la contraction du cœur est réduite, la fonction systolique est atteinte et engendre une diminution du volume d'éjection du ventricule gauche. Ce phénomène caractérise l'IC systolique aussi connue sous le nom d'IC avec fraction d'éjection réduite (ICrEF). Elle apparaît généralement chez les hommes, à la suite d'un infarctus du myocarde ou après une dilatation des ventricules (Figure 1.2) ^{4, 17}. À la différence, une perte de la fonction diastolique, caractérisée par une incapacité du cœur à relaxer, découle généralement d'une hypertrophie concentrique qui permet de conserver la force d'éjection. Cette IC est nommée IC avec fraction d'éjection conservée (ICpEF) ou IC diastolique, sa prévalence est à la hausse depuis plus de 20 ans et compte maintenant pour environ 50 % des cas d'IC ³⁰. Elle est souvent générée par une augmentation de la postcharge, force contre laquelle le ventricule doit pomper pour expulser le sang (Figure 1.2). L'ICpEF est retrouvée principalement chez les femmes, les personnes âgées, obèses, souffrant d'hypertension, de fibrillation auriculaire ou de diabète ^{4, 17, 31, 32}. Selon différentes études, le taux de survie est similaire entre les patients avec ou sans une perte du volume d'éjection ^{32, 33}. Toutefois, le taux de survie des patients souffrant d'ICpEF ne s'améliore pas en réponse à la médication ^{9, 10, 34, 35}. Bref, le développement de cardiomyopathie amène la mise en place de mécanismes visant à rétablir l'activité cardiaque. Cependant, l'activation chronique de ceux-ci devient délétère et promeut l'essor de l'IC. La compréhension des mécanismes sous-jacents au développement des diverses formes d'hypertrophie est importante afin de connaître l'apport des différents facteurs de risque dans la progression de l'IC. Dans la section suivante, l'hypertension et l'infarctus du myocarde, deux des principales causes participant à l'essor de l'IC, sont présentés ^{17, 36}.

1.1.2.7.1 L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle dont souffrent 19 % des Canadiens se définit par une rigidité artérielle responsable de répercussions néfastes sur la fonction du cœur ³⁷. L'hypertension est plus fréquemment diagnostiquée chez les hommes de moins de 55 ans, les femmes de plus de 65 ans, les personnes âgées et les personnes noires ^{4, 38, 39}. Il s'agit d'une maladie ayant des répercussions sévères sur

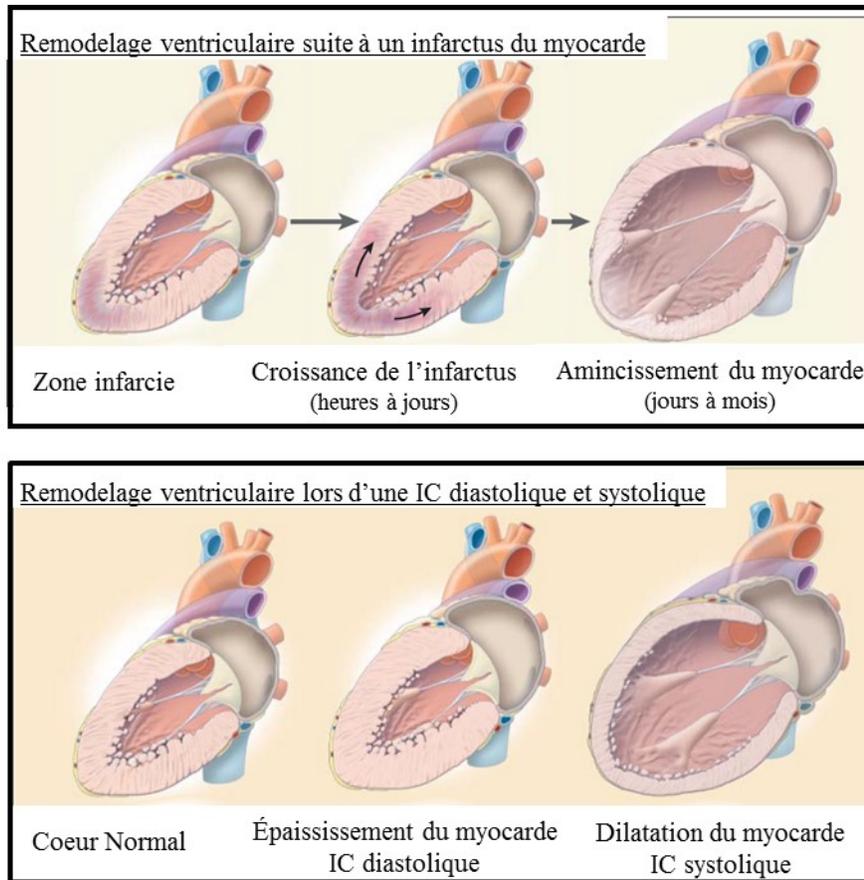


Figure 1.2. Comparaison des types d'insuffisance cardiaque. *Haut*-Schéma de la progression du remodelage suite à un infarctus du myocarde. *Bas*-Comparaison de l'anatomie des cœurs. En premier, présentation d'un cœur sain suivi d'un cœur en insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection préservée (ICpEF) puis d'un cœur en insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection réduite (ICrEF). L'infarctus du myocarde favorise plutôt la progression de l'ICrEF alors que l'hypertension, la sténose aortique, le vieillissement ou le diabète entraîne généralement une ICpEF. Adaptée de Jessup et Broenza ¹¹

l'organisme puisqu'elle peut entraîner une diminution de la perfusion de certains organes et mener au développement de divers remodelages. En effet, l'hypertension artérielle double le risque de développer de l'IC ⁴⁰. D'ailleurs, 75 % des gens souffrant d'IC ont un antécédent d'hypertension artérielle ⁴¹. Plus

spécifiquement, chez les patients souffrant d'hypertension artérielle, les femmes ont un risque plus élevé de développer de l'IC (59 %) que les hommes (39 %) ^{4, 32, 40, 42}. D'autres études ont également démontré que la prévalence de l'hypertrophie est plus importante chez les femmes souffrant d'hypertension artérielle que chez les hommes ^{43, 44}. En outre, il a été suggéré chez la femme que l'hypertension artérielle induit plus fréquemment un phénotype d'hypertrophie concentrique sévère accompagné d'une fonction systolique normale ou supranormale ^{4, 32, 42, 45}. De multiples facteurs entrent en ligne de compte dans le développement de l'hypertension artérielle dont une hyperactivation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et du système nerveux sympathique ainsi qu'un défaut de régulation de la natriurèse, ce qui rappelle la pathologie de l'IC ^{11, 46}. Des habitudes de vie néfastes comme le tabagisme, la sédentarité et l'obésité peuvent exacerber l'hypertension artérielle ⁴⁶. L'hypertension peut aussi être associée à diverses affections comme la pré-éclampsie durant la grossesse, le syndrome de Cushing et l'hypothyroïdie; elle est alors dite secondaire puisque la guérison de la maladie primaire rétablit la pression artérielle ³⁹.

La pathophysiologie de l'hypertension artérielle implique le SRAA qui, en condition physiologique, permet le maintien de la tension artérielle par la régulation de la réabsorption hydro-sodée et la vasoconstriction. Plus précisément, la rénine est libérée par les cellules juxtaglomérulaires du rein en réponse à une diminution du flux sanguin rénal. Dans la circulation sanguine, la rénine procédera à la conversion de l'angiotensinogène hépatique en angiotensine I (ANGI). Ensuite, l'ANGI sera convertie en angiotensine II (ANGII) dans les poumons grâce à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). De par sa liaison au récepteur de type 1 de l'ANGII (AT1), l'ANGII agit comme agent vasoconstricteur et entraîne la libération de l'aldostérone du cortex surrénal, qui régit la réabsorption rénale de l'eau et du sodium. Ces actions concertées entraînent une augmentation du volume et de la pression sanguine. L'augmentation chronique des niveaux d'ANGII favorise le développement de

pathologies telles que l'hypertension artérielle, l'hypertrophie cardiaque et l'IC qui amplifient leurs effets les unes sur les autres.

1.1.2.7.2 Infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde est causé par une ischémie cardiaque à la suite d'un blocage des artères coronariennes souvent associé à l'athérosclérose. La zone ischémique, marquée par l'apoptose des myocytes, est caractérisée par une zone de nécrose qualifiée d'infarctie (Figure 1.2). Cette région et celle en périphérie est donc incapable de se contracter ce qui a pour conséquence de diminuer le volume d'éjection. Pour tenter de pallier à ce phénomène, le diamètre interne du ventricule gauche s'élargit afin d'avoir une plus grande précharge et ainsi, augmenter le volume d'éjection ⁴⁷. La nécrose étant un phénomène irréversible, une dilatation progressive et continue s'ensuit ⁴⁷. À long terme, les mécanismes de remodelage comme l'organisation des sarcomères en série entraînent un amincissement de la paroi ventriculaire. L'infarctus du myocarde a aussi des répercussions sur la fonction diastolique puisqu'avec le temps, le cœur devient plus rigide, ce qui nuit à sa relaxation et son remplissage. Le pronostic va dépendre de la taille, de la transmuralité et de la localisation de l'infarctus ⁴⁷. Un antécédent d'infarctus du myocarde est considéré comme un facteur de risque plus important chez les hommes que chez les femmes dans le développement de l'IC ^{4, 32, 40, 42}.

1.1.2.8 Régulation neurohormonale

L'IC est amorcée par un événement qui trouble la contraction ou la relaxation du cœur et qui en affecte le débit. Son développement progressif découle de la mise en place de mécanismes d'adaptation pour rétablir le débit cardiaque et la fonction ventriculaire gauche à la suite d'un infarctus du myocarde ou d'une exposition à un stimulus délétère chronique telle l'hypertension artérielle ²⁰. Cependant, avec le temps, ces mécanismes n'arrivent plus à corriger la fonction cardiaque et l'état du patient s'aggrave. Deux systèmes physiologiques sont particulièrement affectés lors de l'IC; soit le SRAA et le système nerveux sympathique ¹¹. Ces deux systèmes participent à la régulation hormonale et leurs

rôles ont été clairement identifiés dans le développement d'ICrEF. Actuellement, les traitements utilisés pour traiter l'ICrEF, l'ICpEF et divers types de cardiomyopathies ciblent principalement ces deux systèmes afin de minimiser leurs effets néfastes. Cependant, leur implication dans l'ICpEF demeure questionnée puisque ces traitements ne semblent pas améliorer l'état des patients ^{9, 10, 34, 35}.

D'une part, lors de l'ICrEF, la baisse du volume d'éjection est perçue par les barorécepteurs, ce qui active le système nerveux sympathique au détriment du système parasympathique déclenchant ainsi le relargage de catécholamines telles que l'épinéphrine et la norépinéphrine. Les catécholamines entraînent l'activation des récepteurs adrénergiques qui auront un effet chronotrope et inotrope positif permettant de maintenir le débit cardiaque ¹¹. Au niveau des reins, les catécholamines libérées provoquent la relâche de rénine, résultant en une augmentation des niveaux plasmatiques d'ANGII et d'aldostérone ¹¹. L'élévation de ces deux messagers va engendrer une augmentation de la pression sanguine par vasoconstriction et une stimulation de la réabsorption hydro-sodée résultant en une hausse du volume sanguin ¹¹. De plus, l'ANGII va favoriser le développement d'une hypertrophie pour assurer une force de contraction permettant de conserver le débit cardiaque et tenter de diminuer le stress des parois myocardiques. Ainsi, la mise en place de ces mécanismes compensatoires engendre une réponse chronotrope et inotrope positive par l'activation du système adrénergique. Cependant, elle cause également une vasoconstriction et un remodelage hypertrophique ventriculaire ce qui continue de nuire à la fonction du cœur ⁴. En résumé, ces mécanismes compensatoires physiologiques et bénéfiques vont, s'ils perdurent, contribuer à amplifier l'IC et causer la détérioration de la condition du patient.

D'autre part, l'étude des mécanismes sous-jacents à l'ICpEF a tardé tant chez l'humain que les modèles animaux puisque les critères de diagnostic de cette pathologie ont longtemps été imprécis ^{36, 48}. Néanmoins, il est connu que l'ICpEF est associée à une élévation de la pression intraventriculaire ¹⁸. Ce stimulus

pourrait entraîner une augmentation de la relâche d'ANGII et conséquemment amplifier la production de fibrose, le développement d'hypertrophie ainsi que provoquer la détérioration du remodelage cardiaque ⁴⁹. En effet, les mêmes thérapies qu'en ICrEF sont utilisées ce qui laisse supposer que les deux pathologies pourraient activer des voies de signalisation communes ^{18,50}.

Ainsi, les principaux effets délétères associés à l'IC dépendent de l'activation chronique du système adrénergique et du SRAA. Par ailleurs, il a été démontré chez le chien que l'IC favorise l'activation des voies de signalisation du récepteur adrénergique β_2 qui est couplé à la protéine G α_i et est responsable de l'inhibition de l'adénylate cyclase. La voie β_2 antagonise l'effet inotrope et chronotrope positif de l'isoforme β_1 en nuisant à la fonction contractile et la régulation de l'homéostasie calcique des cardiomyocytes ⁵¹. Cette augmentation de β_2 et la diminution de β_1 a aussi été mesurée dans des modèles de rats en IC ⁵². En conséquence, la réponse à un stress est grandement diminuée et pourrait certainement contribuer à l'émergence d'arythmies ou de problèmes contractiles ventriculaires. Plusieurs conditions pathologiques sont associées avec une activation chronique du SRAA ce qui entraîne, entre autres, un œdème pulmonaire ou des œdèmes périphériques, une dysfonction diastolique et/ou systolique, une augmentation de l'apoptose, du stress oxydant, de l'inflammation, de l'ischémie, une susceptibilité aux arythmies plus grande et la formation de fibrose par diverses voies qui seront présentées dans les prochaines sections ⁵³. À long terme, l'effet le plus délétère du SRAA consiste en l'augmentation continue de la postcharge, ce qui entretient la diminution du volume d'éjection et stimule la relâche constante de catécholamines et l'activation du SRAA. Ainsi, la récurrence de ces mécanismes crée un cercle vicieux lors duquel le SRAA et le système sympathique amplifient le phénotype d'IC en accentuant les effets néfastes des déséquilibres d'ordre fonctionnels, structurels, moléculaires et biochimiques. D'ailleurs, les traitements pour l'IC tels que les β -bloquants, les IECA, les ARA et les AA ciblent ces deux systèmes afin de réduire leurs effets indésirables. En effet, plusieurs études

cliniques ont démontré leur efficacité et leur contribution à l'amélioration du taux de survie des patients souffrants d'IC ^{9, 13-15, 54}.

1.1.2.9 Angiotensine II

L'ANGII est un peptide formé de huit acides aminés et est l'effecteur principal du SRAA ⁵⁵. L'ANGII peut être de source systémique, mais aussi locale soit tissulaire ou cellulaire. Sa biosynthèse systémique a été décrite préalablement (section 1.1.2.6.1) et l'ANGII médie ses effets au niveau de plusieurs organes tels que les reins, le cœur, le foie, les muscles lisses vasculaires et le système nerveux ⁵⁶. Sa dégradation est assurée par diverses angiotensinases ⁵⁵.

La synthèse locale d'ANGII est assurée par la présence partielle ou complète de divers éléments du SRAA. Ceux-ci peuvent être présents au niveau du cœur, des reins, du cerveau, du pancréas ainsi que des tissus reproducteurs, lymphatiques et adipeux ⁵⁵. Cette régulation peut se faire indépendamment du SRAA circulant ou non. Depuis cette découverte, il a été suggéré que l'ANGII pourrait être impliquée dans de nouvelles fonctions diverses en plus de ses effets hémodynamiques notamment dans l'inflammation, la production de stress oxydant, la croissance cellulaire, l'apoptose, le remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que l'activation de certaines voies de signalisation ⁵³. Au niveau cardiaque, la régulation et les effets de l'ANGII produite localement sont moins connus. Néanmoins, l'ANGII ainsi que d'autres composantes du SRAA peut contribuer aux effets locaux, notamment leur libération peut être provoquée par l'étirement cellulaire ⁴⁹. Les effets de ce relargage d'ANGII peuvent être empêchés par le traitement d'un antagoniste du récepteur AT1, mais pas d'un antagoniste du récepteur AT2, démontrant le rôle du récepteur AT1 dans les effets causés par l'étirement ⁴⁹.

1.1.3 Récepteurs à l'angiotensine II

La majorité des effets connus de l'ANGII est médiée par le récepteur de type 1 de l'ANGII (AT1). Au niveau cardiaque, les récepteurs AT1 et de type 2

(AT2) sont présents et semblent avoir des rôles compensatoires⁵⁷. Les isoformes 3 et 4 ont aussi été trouvées, mais leur rôle est encore peu connu et ne sera donc pas présenté.

1.1.3.1 Le récepteur de type 1 de l'angiotensine II

Le récepteur AT1 fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), il possède donc sept domaines transmembranaires et est localisé au niveau des membranes plasmiques ainsi que nucléaires⁵⁸. Chez les rongeurs, deux sous-types de récepteurs sont retrouvés soit le AT1aR et le AT1bR sur les chromosomes 17 et 2, respectivement. Tandis que chez l'homme une seule isoforme existe et se trouve sur le chromosome 3⁵⁶. Les deux isoformes murins ont des rôles similaires. La voie de signalisation du récepteur AT1 est principalement couplée aux protéines G de type $G\alpha_q$ et, selon les tissus, à $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_i/o$ ⁵⁹. La liaison de l'ANGII sur le récepteur AT1 provoque l'activation de ces sous-unités α libérant ainsi le complexe $\beta\gamma$ qui peut également participer à l'activation de voies de signalisation⁵⁹.

La voie principale associée au récepteur AT1 de la membrane plasmique découle de l'activation de $G\alpha_q$ et plusieurs études ont démontré son implication dans le développement d'hypertrophie et d'IC. L'activation de $G\alpha_q$ va phosphoryler la phospholipase C β (PLC β) qui transformera le phosphatidylinositol-4-5-diphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG)⁵⁹ (Figure 1.3). L'IP3 ira se lier aux récepteurs à l'IP3 pour libérer le calcium du réticulum sarcoplasmique contribuant à la vasoconstriction tandis que le DAG est responsable de l'activation des protéines kinases C (PKC) et de la croissance cellulaire par la voie Ras/Raf/MEK/ERK^{59, 60}. En cas d'activation continue, comme en conditions pathologiques, l'élévation de Ca^{2+} intracellulaire favorise l'activation de protéines dépendantes du Ca^{2+} comme la calmoduline, qui va entraîner l'activation de la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CaMKII) et de la calcineurine. La calcineurine est connue pour activer le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) menant à l'expression de gènes favo-

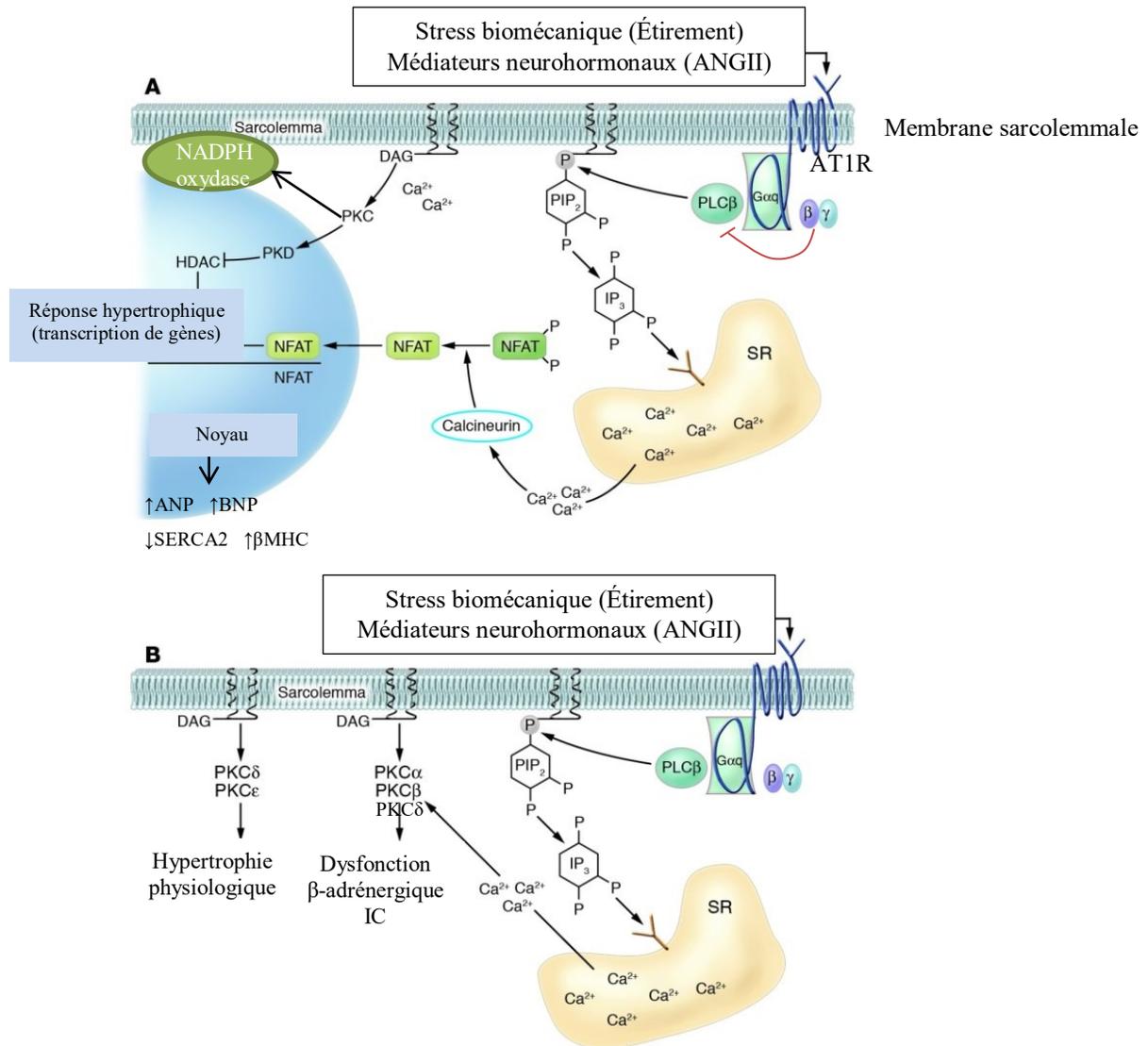


Figure 1.3. Voies de signalisation associées à Gαq dans le développement d'hypertrophie cardiaque. A. La voie Gαq active la phospholipase C (PLC) qui catalyse le PIP₂ en IP₃ et DAG. Ces deux seconds messagers causent respectivement un relargage de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique (RS) et l'activation des PKC. L'augmentation intracellulaire de Ca²⁺ et les PKC vont entraîner la transcription de gènes hypertrophiques soit par l'activation de la voie calcineurine-NFAT ou de la protéine kinase D (PKD)-HDAC qui relève l'inhibition de la transcription de gènes hypertrophiques. B. Plusieurs isoformes des PKC ont été associées avec le développement de l'hypertrophie. Si PKCε est associée à une hypertrophie physiologique, PKCα et PKCβ sont plutôt activées par des stimuli pathologiques tandis que PKCδ est commune aux deux. Adaptée de Dorn et Force⁶⁰

risant le développement d'une hypertrophie concentrique ⁶⁰ (Figure 1.3). CaMKII semble aussi impliquée dans le développement de l'hypertrophie concentrique déclenchée par une augmentation de la résistance artérielle. À long terme, l'activation de ces deux voies peut mener à une IC décompensée. À l'opposé, Gα11, va activer constitutivement la phospholipase D (PLD) par l'intermédiaire de la voie des Rho kinases, ce qui perpétue l'activité des PKC ^{59,61}. La PLD est aussi responsable de la synthèse des ROS par la voie des nicotinamides adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases. L'activation de la NADPH oxydase repose sur la tyrosine kinase c-src qui dépend de la phosphorylation de p47phox (une protéine augmentant l'activité de la NADPH oxydase) par la PKC ⁶². Une deuxième production de ROS survient plus lentement et dépend de Rac ⁶³. D'autres protéines G sont aussi associées avec le récepteur AT1 en fonction de l'espèce ou des tissus dont Gαi/o, qui va inhiber l'adénylate cyclase (AC) prévenant ainsi l'élévation de l'AMPc et l'activité de PKA ⁶⁴. Plusieurs autres seconds messagers peuvent être activés démontrant la diversité et la vaste étendue d'actions du SRAA et du récepteur AT1. Les effets des différentes voies du récepteur AT1 ont été étudiés par la comparaison d'un modèle de souris surexprimant aussi au niveau cardiaque le récepteur AT1 et d'un autre modèle surexprimant au niveau cardiaque le récepteur AT1 tout en étant déficient en Gαq et Gαi/o ⁶⁵. Sans l'activation des voies associées aux protéines Gα, l'hypertrophie et la dysfonction cardiaque semblent être exacerbées tandis que la fibrose et l'apoptose sont réduites en comparaison à une souris ayant une surexpression cardiaque d'un récepteur AT1 complètement fonctionnel ⁶⁵. Également, le développement d'hypertrophie et l'expression de gènes fœtaux provoqués par une surcharge de pression est interrompu chez les souris déficientes en Gαq et Gαi/o alors qu'une surexpression de Gαq au niveau des cardiomyocytes favorise l'hypertrophie, ce qui renforce le rôle distinct de chacun des seconds messagers ^{49,66,67}.

Les sous-unités βγ modulent aussi le récepteur AT1 par un mécanisme de rétro-inhibition en inactivant la PLCβ ⁶⁸. D'autres mécanismes sont aussi

impliqués dans la régulation de l'activation du récepteur AT1 notamment les β -arrestines, les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) et les récepteurs kinases couplés aux protéines G (GRK) ⁵⁹. Certaines voies peuvent aussi être activées indépendamment des sous-unités de la protéine G comme la voie des médiateurs JAK/STAT qui engagent les processus de transcription de gènes impliqués dans la vasoconstriction, la mort cellulaire ainsi que dans des anomalies cardiaques et rénales ⁵⁹.

L'activation du récepteur AT1 peut également résulter d'un stress mécanique comme l'étirement puisque celui-ci va entraîner un changement de conformation du récepteur vers une forme active ⁴⁹. Il a aussi été démontré dans un modèle de souris déficiente pour le gène codant pour l'angiotensinogène qu'une surexpression du récepteur AT1 sous le contrôle du promoteur de la α MHC favorise le développement d'une hypertrophie, démontrant sa capacité de s'activer de façon constitutive ⁶⁹. Des souris déficientes en AT1aR ont également été développées, celles-ci présentent une croissance normale en plus d'une longévité augmentée par rapport aux souris contrôles ⁷⁰. Elles montrent aussi une réduction de l'athérosclérose aortique et sont moins sujettes aux accidents cardiaques. Ces résultats seraient associés avec une diminution du stress oxydant et une augmentation de la transcription de gènes de survie ⁷⁰. Conséquemment, la majorité des effets délétères cardiaques est associée au récepteur AT1. C'est pourquoi la classe de médicament des ARA est sélective pour ce sous-type ⁷¹.

1.1.3.1.1 Protéine kinase C

Les PKC font partie de la famille des sérines/thréonines kinases. Comme mentionné précédemment, les PKC sont activées, entre autres, à la suite de l'activation du récepteur AT1. Au niveau cardiaque, préférentiellement les PKC conventionnelles α , β_I , β_{II} et γ dont l'activation dépend du Ca^{2+} et du DAG ainsi que les nouvelles PKC δ , ε et θ requérant seulement le DAG pour leur activation sont retrouvées ⁷². Chez l'homme, les isozymes α , β_I , β_{II} , δ et ε ont été identifiées ⁷³. Les rôles associés aux PKC sont variés, par exemple, au niveau de la régulation

de la transcription, de la croissance cellulaire, de l'apoptose, de l'activité électrique cardiaque, de l'homéostasie calcique et de la fonction des myofilaments^{60, 72, 74}.

1.1.3.2 Récepteur de type 2 de l'angiotensine II

L'expression du récepteur AT2 est importante au stade fœtal puis diminue rapidement à la naissance. Le gène sous-jacent au récepteur AT2 se trouve sur le chromosome X et possède ~32 % d'homologie avec AT1aR/AT1bR⁵⁶. À l'âge adulte, le récepteur AT2 est exprimé au niveau des vaisseaux sanguins, du cœur, du pancréas, des glandes surrénales, des reins et du cerveau. Les voies de signalisation qui y sont associées sont encore mal comprises. Néanmoins, il semble que dans des conditions physiologiques, le récepteur AT2 est un antagoniste physiologique du récepteur AT1 puisqu'il favorise la vasodilatation et inhibe la croissance cellulaire⁵⁷. En conditions pathologiques, il semblerait être surexprimé lors d'une lésion cardiaque tel un infarctus du myocarde alors qu'il serait moins présent lors de l'IC^{75, 76}. Néanmoins ces résultats sont préliminaires et nécessitent des études futures.

1.1.4 Modèles d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque chez la souris

La recherche fondamentale privilégie l'usage d'animaux afin de réaliser des études permettant de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement d'une pathologie. Ces études sont possibles grâce à la création de modèles mimant une affection ressemblante à celle observée chez l'homme. D'autre part, les modèles animaux permettent aussi d'évaluer l'apport d'un traitement dans la prévention ou la guérison de la pathologie et de se rapprocher le plus possible d'une application chez l'homme. À cet égard, les grandes espèces comme le porc et le chien ont un système cardiovasculaire se rapprochant de celui de l'homme tant au niveau de l'anatomie (forme, taille, structure), que de la physiologie (fréquence cardiaque, expression de canaux ioniques)⁷⁷. Toutefois, les études sur les grands mammifères restent plus coûteuses. Pour cette raison, les

modèles murins sont souvent préférés pour les études de première intention puisqu'ils permettent une approche transgénique, sont moins coûteux et permettent l'exécution d'interventions invasives sur un grand nombre d'animaux permettant une meilleure puissance statistique ⁷⁸. Toutefois, les cibles ainsi déterminées doivent par la suite être validées dans des modèles de grands mammifères tels que le chien et le porc, les deux grandes espèces principalement utilisées en cardiologie, avant le passage chez l'homme. Il est également important de mentionner que l'utilisation des animaux femelles dans les études biomédicales est insuffisante et que de nouvelles politiques plus sévères sont mises en place afin d'augmenter leur nombre dans les publications scientifiques ⁷⁹. Leur intégration dans les études sur l'IC est également faible malgré l'existence importante de différences cliniques entre les hommes et les femmes. Ce constat démontre l'intérêt et le besoin de poursuivre des études chez les souris mâles et femelles ainsi que la nouveauté des résultats qui y seront associés. Diverses approches ont déjà été mises au point, notamment des modèles d'animaux transgéniques avec délétion ou surexpression de gènes, ou des modèles obtenus par chirurgie.

Le plus grand défi dans la création de modèles animaux est de reproduire une maladie chronique qui se développe au cours d'une vie et qui tient compte de la diversité observée dans la population humaine. De plus, plusieurs comorbidités peuvent accompagner une pathologie, comme dans le cas des maladies cardiovasculaires, ce qui complexifie l'identification claire d'une relation de cause à effet ^{7, 77}. Ainsi, la validité d'une approche globale, incluant toutes les variables, est cependant discutable puisqu'elle augmenterait la variabilité interindividuelle et pourrait nuire à l'interprétation des résultats. Un des avantages que procurent les modèles de rongeurs est d'étudier le rôle d'une protéine au cours du vieillissement ou de l'évolution d'une maladie indépendamment de facteurs externes et sur une période de temps plus courte que celle correspondant à l'échelle humaine. Dans le cas de l'IC, plusieurs modèles doivent être conçus afin de reproduire les diverses causes sous-jacentes à la pathologie et permettre l'étude des multiples stimuli impliqués. La création de plusieurs modèles permet de déterminer les processus

responsables associés à chacun dans le développement de l'IC. Un autre point à souligner est le manque d'études chez les animaux femelles puisqu'il a été démontré que plusieurs maladies dont l'IC présentent des différences entre les sexes^{38, 40, 80}. Ce type d'étude permettrait de mettre en place des thérapies mieux adaptées à chaque individu. Dans cette perspective, un des projets de cette thèse inclut la comparaison entre les souris mâles et femelles. Les principaux modèles utilisés pour l'étude de l'IC sont présentés dans les prochains paragraphes.

L'hypertension étant un problème de santé majeur occasionnant des troubles cardiaques, des modèles pour mieux en comprendre la pathologie ont rapidement été développés. Le modèle de constriction transaortique (TAC) mime la sténose aortique et cause une surcharge de pression du ventricule gauche entraînant son remodelage⁷⁷. Cette procédure présente le désavantage d'avoir un haut taux de mortalité post-opératoire et d'avoir une évolution rapide en réponse à un stimulus aigu contrairement au développement de la pathologie chez l'homme qui est lent et chronique⁷⁸. Cependant, le modèle TAC peut aussi être utilisé conjointement avec un modèle génétiquement modifié afin d'approfondir le rôle d'un gène/protéine lors d'une surcharge de pression ventriculaire. Un autre modèle est le rat spontanément hypertendu Sprague-Dawley. Il développe aussi une hypertrophie concentrique ventriculaire gauche qui évolue en IC⁷⁷. L'hypertension peut aussi être induite par un traitement pharmacologique à l'ANGII libéré en continu par des pompes osmotiques ou par des implants sous-cutanés insérés dans l'animal^{81, 82}.

Les modèles animaux de cardiomyopathies dilatées sont nombreux. Les modèles peuvent être obtenus par l'exécution d'infarctus du myocarde, de délétion ou de surexpression d'un gène associé au développement de la cardiomyopathie dilatée ou de l'exposition à une toxine, etc.^{77, 78}. Les modèles transgéniques permettent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'étudier leur évolution dans le développement de la pathologie au cours du vieillissement de l'animal. Les caractéristiques associées au développement d'une cardiomyopathie dilatée qui sont attendues chez le modèle l'animal sont la dilatation du ventricule,

une diminution de la fraction d'éjection et des difficultés contractiles. Au niveau structurel, le remodelage associé consiste en un amincissement de la paroi cardiaque, un élargissement des quatre cavités cardiaques, une dilatation des valves mitrales et tricuspides, un allongement et un épaissement des cardiomyocytes, une apparition de fibrose ainsi que la mort des cardiomyocytes ⁷⁷.

D'autre part, la création de modèles de souris transgéniques permet d'étudier le rôle d'un gène particulier ou d'une protéine particulière dans un modèle *in vivo* afin de mieux comprendre son rôle en étudiant l'impact de leur délétion ou leur surexpression ⁷⁷. Dans le cas où l'abolition d'un gène s'avère être létale à l'état fœtal, il est aussi possible de générer des modèles qui seront inductibles grâce à l'administration de tamoxifène ou de tétracycline qui serviront de ligand régulateur. Le traitement d'un ligand va déterminer la transcription du gène qu'il régule ⁷⁷.

Dans le cadre de mes études aux cycles supérieurs, la majorité des expériences a été réalisée avec un modèle de souris transgénique surexprimant seulement au niveau cardiaque, sous contrôle du promoteur α MHC, le récepteur AT1 (souris AT1R). L'expression protéique du récepteur AT1, évaluée par un essai de liaison radioactif, est augmentée d'environ 200 fois chez les souris AT1R comparativement à leur contrôle du même âge ⁸³. Les niveaux d'ARNm sont également similaires entre les sexes chez la souris AT1R en présence comme en absence d'hypertrophie (Annexe II p.vi). La surexpression sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de myosine permet d'éviter la surexpression au niveau des muscles lisses vasculaires et prévient le développement d'hypertension. Le rôle spécifique du récepteur AT1 au niveau du cœur a donc pu être étudié sans variable confondante. En effet, avec l'âge, les souris AT1R développent de l'hypertrophie, de la fibrose et de l'IC, mais sans manifester d'hypertension artérielle ⁸³. Des études de télémétrie réalisées dans notre laboratoire sur les souris AT1R mâles ont démontré que celles-ci avaient un risque d'arythmies plus élevé en comparaison aux contrôles, et ce avant comme après le développement de l'hypertrophie ⁸⁴. Par ailleurs, ce modèle permet de distinguer les effets de la

surexpression du récepteur AT1 indépendants de l'hypertrophie de ceux associés à la présence d'hypertrophie. Ainsi, les souris AT1R ont été étudiées, à deux âges différents, avant le développement de l'hypertrophie (50 ± 5 jours) et après le développement de l'hypertrophie (entre 6-8 mois) afin de départir si les effets observés sont la conséquence de celle-ci ou non. Des études antérieures au laboratoire menées sur les souris AT1R mâles seulement ont démontré un retard de repolarisation associé à une diminution d'expression des canaux K^+ ventriculaires et que leur couplage excitation-contraction (CEC, « *excitation-contraction coupling* ») est affecté en raison d'une diminution de la contractilité causée par une réduction du courant Ca^{2+} de type L (I_{CaL}), des transitoires calciques et de l'expression protéique de la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA2) et de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) ^{84, 85}. Cependant, les décès de la colonie de souris AT1R ont été répertoriés jusqu'à l'âge de 15 mois et il a été observé que les femelles AT1R ont un taux de mortalité de 21 % alors que chez les mâles, il est de 5,5 % ⁸⁶. De plus, les souris AT1R femelles meurent de façon plus précoce, dès l'âge de trois mois, tandis que les mâles décèdent vers l'âge de huit mois. Ces données suggèrent que les femelles AT1R développent un phénotype plus sévère. En raison de la mortalité plus grande chez les femelles AT1R et le manque de données dans la littérature sur les modèles animaux féminins, un des projets de cette thèse s'est penché sur l'étude des mécanismes pouvant contribuer à cette différence entre les sexes dans un contexte d'IC ⁷⁹. D'ailleurs, l'âge choisi pour conduire les études prend en considération la maturité sexuelle des souris qui est atteinte à 45 jours. Les résultats obtenus sont les premiers qui distinguent le phénotype des souris AT1R mâles et femelles et l'une des premières études à démontrer une caractérisation *in vivo* et cellulaire d'un animal femelle souffrant d'IC renforçant ainsi, la nouveauté du projet. En résumé, cette étude contribue à mieux connaître la régulation de l'IC entre les mâles et les femelles en plus de soulever plusieurs nouvelles pistes d'exploration.

1.1.5 Arythmies ventriculaires

Une arythmie cardiaque se caractérise par un cœur qui bat de façon irrégulière. Plusieurs types d'arythmies existent et les battements peuvent être plus rapides, plus lents ou asynchrones. Certaines arythmies sont bénignes alors que d'autres sont mortelles puisqu'elles peuvent mener à une mauvaise perfusion qui va entraîner une ischémie de certains organes, notamment le cerveau et le cœur. Les arythmies ventriculaires sont l'une des deux principales causes de décès chez les patients souffrant d'IC en plus d'être associées aux maladies coronariennes, aux infarctus du myocarde et à une défaillance du muscle cardiaque⁸⁷⁻⁸⁹. Ces maladies liées à un remodelage des canaux ioniques sont souvent associées à une forte probabilité de mort subite cardiaque (« *sudden cardiac death* »)⁹⁰. La mort subite se caractérise par une incapacité du cœur de battre ce qui entraîne une hypoperfusion de celui-ci, mais aussi des autres organes et mène à la mort en quelques minutes. Les cas de mort subite cardiaque sont considérés fréquents puisque la moitié des décès associés aux maladies cardiaques sont considérés comme soudains⁸⁹. Normalement, de 88-91 % de ces décès adviennent durant l'heure suivant le premier événement arythmique⁸⁸.

1.1.5.1 Extrasystole ventriculaire

L'extrasystole ventriculaire est engendrée par une impulsion électrique prématurée associée à un défaut du rythme cardiaque. Ce battement supplémentaire se manifeste lorsqu'une activité électrique ectopique se déploie dans un foyer de cellules ventriculaires. Il est à noter que l'extrasystole est observée chez le sujet sain comme chez le sujet atteint de cardiomyopathie, seule leur prévalence diffère. En effet, il a été vu par monitoring ambulatoire que durant une période de 24 heures la prévalence des extrasystoles ventriculaires chez un individu se rapporte à 40-55 % et sont considérées peu communes alors que chez les patients ayant des coronaropathies chroniques, ce taux augmente à 75-90 %⁹¹⁻⁹⁴. Si le phénomène est isolé, l'extrasystole est considérée comme bénigne, mais si elles sont nombreuses ($\geq 30/h$), elles sont associées à un risque élevé de mort subite

principalement chez les individus ayant une fraction d'éjection inférieure à 40 % comme les patients souffrant d'IC ^{91, 95}. L'extrasystole est toutefois un facteur indépendant de la mort subite cardiaque post-infarctus malgré leur nombre élevé ^{94, 95}. L'extrasystole est déclenchée si le foyer contient des cellules avec une automaticité, qui en raison de perturbations électrolytiques, d'étirements prononcés ou de stimulations adrénergiques parviennent à atteindre un seuil d'excitation suffisant pour propager l'impulsion aux cellules voisines. Cet événement est possible si les cellules voisines ne se trouvent pas dans leur période réfractaire absolue puisque leur excitabilité sera alors restituée. La pérennité d'un influx électrique proarythmogène peut être maintenue par le phénomène de réentrée (Figure 1.4). Ce phénomène est favorisé lorsque l'influx parvient à réexciter la région dont il était issu initialement de façon à former une boucle d'auto-excitation. La propagation de l'influx peut être ralentie ou arrêtée par de la fibrose, une nécrose, une diminution des jonctions communicantes ou une altération des courants ioniques. Ainsi, le retard de l'influx peut lui permettre de réactiver une région préalablement excitée dont la période réfractaire est terminée. Par exemple, dans la situation où l'influx est interrompu par une région non-excitable, dont la période réfractaire est prolongée (Figure 1.4, région foncée de la branche B) et que l'influx passant par la voie A se propage normalement, ce même influx (A) pourra voyager de façon rétrograde dans la branche B si sa période réfractaire est terminée. La pérennité de l'influx est assurée si le trajet à parcourir par l'influx est plus long que la période réfractaire (Figure 1.4, droite). Dans le cas contraire, cette dépolarisation isolée sera perçue comme une extrasystole sans conséquence. L'influx continue de se propager dans les régions en fonction de la durée des périodes réfractaires de chacune ce qui peut créer un circuit de réentrée ^{90, 96}. Cette dérégulation de la conduction est caractéristique de la fibrillation auriculaire, une arythmie supraventriculaire soutenue. Au niveau des chambres inférieures, elle peut dégénérer en une tachycardie ventriculaire.

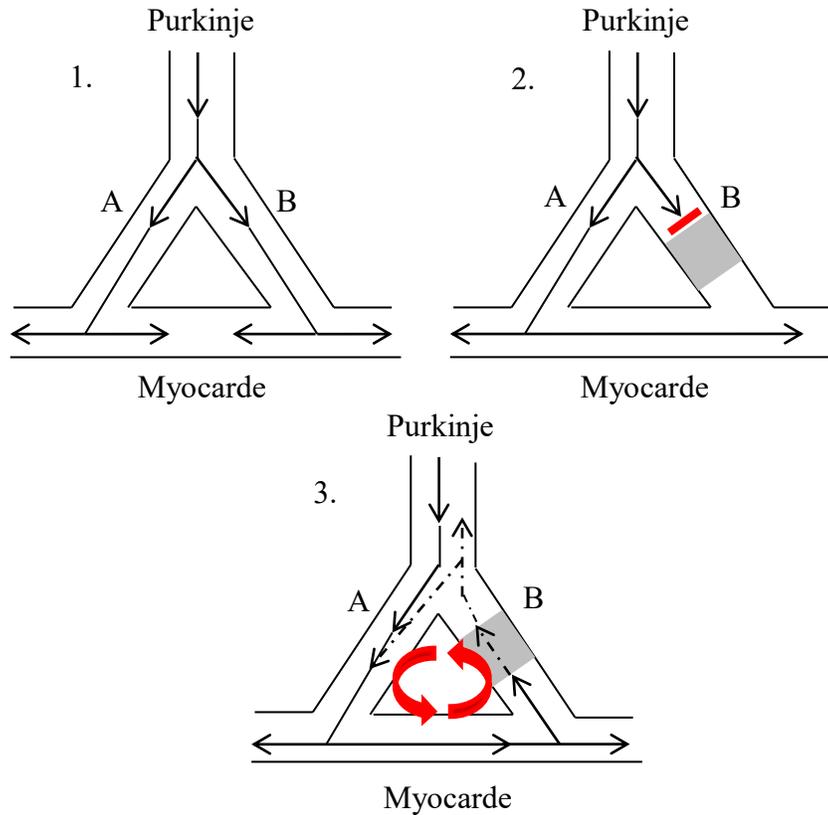


Figure 1.4. Schématisation d'un circuit de réentrée entre les fibres de Purkinje et les myocytes. 1. Propagation normale de l'influx électrique dans les branches A et B. 2. Dans la branche B, il y a un bloc de conduction (zone grise : cellules dont la période réfractaire est prolongée) ce qui empêche le passage de l'influx. 3. L'influx provenant de A parvient à la branche B, qui n'est plus en période réfractaire ce qui permet à l'influx de traverser et réactiver les diverses régions. Une boucle d'activation se forme, constituant un circuit de réentrée (flèches rouges).

1.1.5.2 Tachycardie ventriculaire

Une fréquence ventriculaire plus élevée, mais synchrone est nommée tachycardie ventriculaire. Elle est diagnostiquée par la succession de quatre extrasystoles entraînant une fréquence cardiaque supérieure à 100 bpm. Elle est la

conséquence du phénomène de réentrée expliqué précédemment ⁹¹. Si une tachycardie ventriculaire de quelques secondes ne cause que des dommages limités, sa persistance peut nuire à la perfusion des organes et même entraîner une arythmie encore plus sévère comme la fibrillation ventriculaire.

1.1.5.3 Torsade de pointe

La torsade de pointe (TdeP) est une tachycardie ventriculaire polymorphe avec des dépolarisations ventriculaires (correspondantes aux complexes QRS, définis à la section 1.2.1), de différentes amplitudes et polarités. Ce nom provient du mouvement ventriculaire de rotation en torsades observées à l'électrocardiogramme (ECG), i.e. le complexe QRS pointant en alternance vers le haut et vers le bas (Figure 1.5) ⁹⁶. Le déclenchement d'une torsade de pointe est principalement associé à une prolongation de l'intervalle QT. Celle-ci peut dégénérer en une fibrillation ventriculaire.

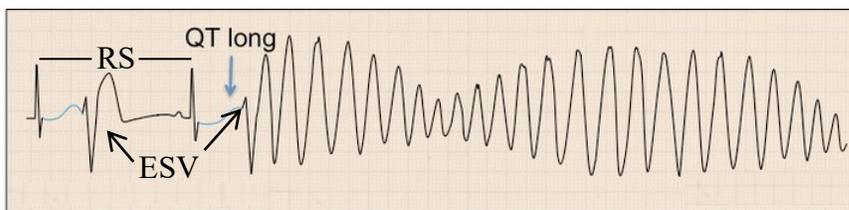


Figure 1.5. Représentation d'une torsade de pointe à l'ECG. Un intervalle QT long permet à une extrasystole d'engendrer plus facilement une propagation de l'activité électrique pouvant générer une torsade de pointe. Sur l'ECG, seulement l'activité électrique ventriculaire est visible et a une forme particulière dite « en torsade ». RS : rythme sinusal, ESV : extrasystole. Adaptée de Taboulet ⁹⁶

1.1.5.4 Fibrillation ventriculaire

La fibrillation ventriculaire est considérée comme l'arythmie la plus maligne. La survie des patients après hospitalisation est de seulement 20 à 25 % ⁹¹.

À la différence des arythmies précédentes, l'activité électrique est non synchronisée favorisant plusieurs phénomènes de réentrée ce qui altère la fonction mécanique des ventricules et peut résulter en une ischémie et une asystolie ⁹⁶ (Figure 1.6). Les femmes sont d'ailleurs plus sujettes à développer des asystolies (« *pulseless electrical activity* ») pour lesquelles les chances de survie sont plus faibles que pour la fibrillation ventriculaire qui peut être cardioversée ^{89, 97}. Si aucun traitement n'est administré, l'arrêt de l'éjection de sang des ventricules va entraîner la mort subite cardiaque entre trois et cinq minutes ⁹¹. Une défibrillation est nécessaire afin de réinstaurer l'activité électrique du cœur. D'ailleurs, l'implantation d'un défibrillateur peut s'avérer un traitement de choix chez les patients présentant peu de comorbidités et ayant un taux de survie supérieur à 1 an puisque les effets secondaires seront moindres et mieux tolérés ⁹⁸. Plusieurs sources d'instabilité électrique peuvent contribuer au déclenchement de fibrillation ventriculaire et mener à la mort subite cardiaque dont une fraction d'éjection diminuée, un infarctus du myocarde ainsi qu'une prolongation de la durée de la dépolarisation ventriculaire (complexe QRS) ^{89, 98}.

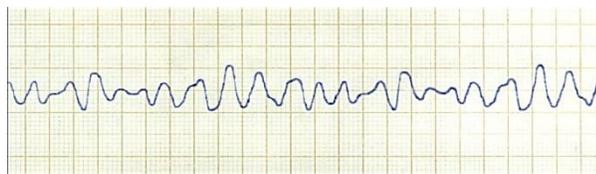


Figure 1.6. Exemple d'un ECG présentant une fibrillation ventriculaire. La fibrillation ventriculaire est caractérisée par un mouvement asynchrone et rapide des ventricules se traduisant à l'ECG par des variations de faible amplitude autour de la ligne isoélectrique. Adaptée de Taboulet ⁹⁶

1.2 Activité électrique cardiaque en conditions physiologiques et pathophysiologiques

Le bon fonctionnement du cœur résulte d'une action concertée de différents éléments permettant la transmission de l'influx électrique pour l'obtention d'une

contraction cardiaque et assurer la perfusion des organes. Le nœud sinusal (NS), situé dans l'oreillette droite sous la veine cave supérieure, est constitué de cellules possédant une propriété d'automatisme connue sous le nom de « *pacemaker* » lui conférant le titre de centre d'automatisme primaire⁹⁰. Il est la source d'un influx électrique ayant une fréquence de 60-100 impulsions par minute. Cet influx traverse ensuite les oreillettes pour se diriger vers le nœud auriculo-ventriculaire (NAV) qui assure le passage de l'influx des oreillettes aux ventricules⁹⁰. Le NAV a pour fonction de ralentir le passage de l'influx afin de permettre au sang de transiter des oreillettes aux ventricules. Une fois le NAV traversé, l'influx se propage au faisceau de His. Ce dernier se divise en deux branches afin de conduire le stimulus électrique dans chacun des deux ventricules. Le signal électrique du faisceau de His jusqu'aux fibres de Purkinje assure la contraction synchronisée de la base jusqu'à l'apex des ventricules (Figure 1.7)⁹⁰.

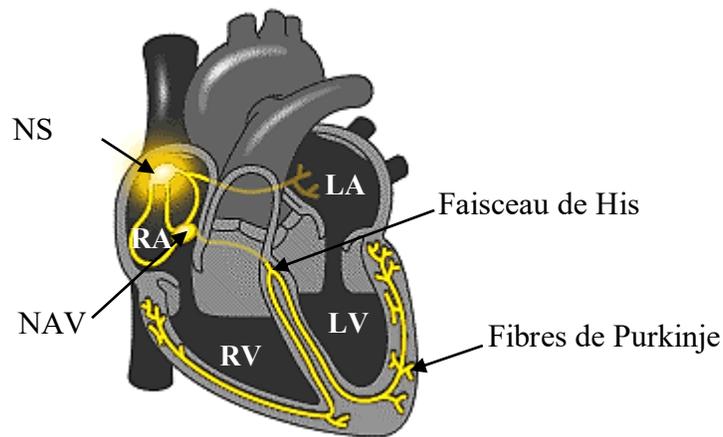


Figure 1.7. Représentation du système de conduction cardiaque. L'influx (en jaune) débute au nœud sinusal (NS) puis traverse les oreillettes pour atteindre le nœud auriculo-ventriculaire (NAV). À partir du NAV, l'influx passe par le faisceau de His qui se divise en deux puis en plusieurs ramifications nommées fibres de Purkinje. RA : oreillette droite, LA : oreillette gauche, RV : ventricule droit, LV : ventricule gauche.

Adaptée de http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cardio1/electrical.html

1.2.1 Électrocardiogramme

L'activité électrique des chambres cardiaques peut être visualisée à l'aide d'un électrocardiogramme (ECG) de surface (Figure 1.8). L'emplacement des électrodes permet de percevoir le passage de l'influx électrique dans le cœur. L'ECG va capter, lors de chaque battement, le trajet de l'influx ce qui permet de définir le nombre de battements par minute représentant la fréquence cardiaque (FC). Le tracé enregistré d'un ECG dépend de l'emplacement des électrodes d'enregistrement, suivant leur positionnement, plusieurs configurations sont possibles. Dans le cadre de nos études, la configuration dérivée bipolaire I ou II a

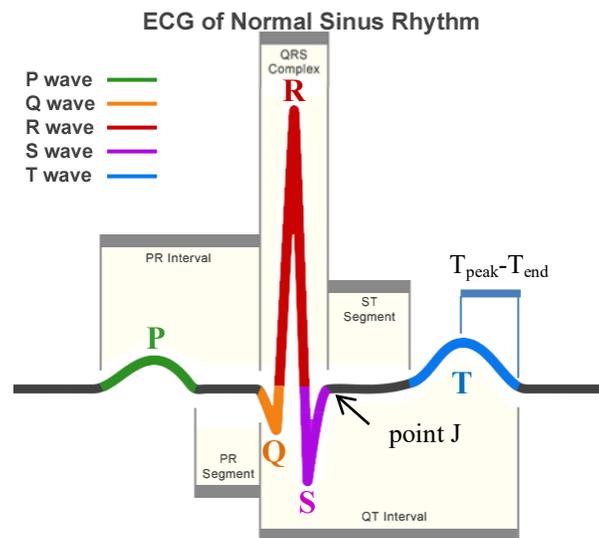


Figure 1.8. Illustration des différents paramètres retrouvés à l'ECG. Représentation d'un tracé d'ECG humain où est montrée l'intervalle PR : le temps de passage dans les oreillettes et le NAV, le segment PR : le temps que prend l'influx pour traverser le NAV et le complexe QRS : la dépolarisation ventriculaire. La repolarisation ventriculaire s'évalue en incluant ou non la dépolarisation ventriculaire et permet d'obtenir, respectivement, l'intervalle QT ou le segment ST/JT. Le point J représente l'intersection entre la fin de la dépolarisation et le début de la repolarisation. Le gradient de dispersion entre la couche épocardique et midmyocardique/endocardique est obtenu par la différence entre l'amplitude maximale de l'onde T (T_{peak}) et la fin de l'onde T (T_{end}). Adaptée de Small Animal Cardiology <http://research.vet.upenn.edu/smallanimalcardiology/ECGTutorial/tabid/4930/Default.aspx>

été utilisée (Figure 1.9). La représentation d'un cycle cardiaque sur l'ECG débute avec la dépolarisation des oreillettes reflétée par l'onde P. Le tracé retourne à la ligne isoélectrique lors du passage au NAV. Ensuite, la dépolarisation ventriculaire apparaît sous la somme des ondes Q, R et S; elle est nommée complexe QRS. La repolarisation ventriculaire est représentée par l'onde T alors que la repolarisation auriculaire est généralement non-visible puisque l'amplitude est trop faible (Figure 1.8). D'autres paramètres peuvent également être interprétés à partir d'un ECG. Par exemple, le temps entre deux dépolarisations ventriculaires correspond à la durée d'un intervalle RR rapportant le temps d'un cycle sinusal. De ce fait, la fréquence cardiaque est calculée selon le nombre d'intervalle RR par minute. L'intervalle PR se rapporte au temps de conduction auriculo-ventriculaire tandis que le segment PR correspond spécifiquement au temps nécessaire pour traverser le NAV. L'intervalle QT est utilisé comme indice de la période de repolarisation ventriculaire. La repolarisation ventriculaire peut aussi être représentée par l'intervalle JT qui est alors indépendant du temps de la dépolarisation ventriculaire. Le point J se définit par la jonction entre la fin du QRS et le début du segment ST. La fréquence cardiaque va influencer la durée de repolarisation, soit l'intervalle QT ou JT. À des fins de comparaisons, la formule de Bazett : $QTc = \frac{\text{Intervalle QT}}{\sqrt{RR}}$ est utilisée pour obtenir l'intervalle QT corrigé (QTc) qui tient compte de la fréquence des battements ⁹⁰. De plus, le degré de dispersion au travers de la paroi du myocarde soit entre la couche épicardique et endocardique, peut être évalué par le temps compris entre l'amplitude maximale de l'onde T (T_{peak}) et la fin de celle-ci (T_{end}); cela correspond respectivement à la fin de la repolarisation de la couche épicardique et de celle appelée midmyocardique ou endomyocardique ⁹⁹. En clinique, l'ECG de surface permet de distinguer plusieurs dysfonctions ou pathologies cardiaques comme un élargissement du QRS accompagné d'une élévation du segment ST ou d'un tracé formant un dos d'âne (« *saddle back pattern* ») caractéristique des patients souffrant du syndrome de Brugada. Il peut également s'agir d'arythmies telles que celles présentées précédemment; une

prolongation de l'intervalle QT indiquant un retard de repolarisation ou encore un infarctus du myocarde.

1.2.1.1 Comparaison de l'ECG humain à celui de la souris

Plusieurs différences existent entre l'activité électrique cardiaque des hommes et des souris. La plus frappante est probablement la fréquence cardiaque de la souris qui est environ dix fois plus rapide que celle de l'homme (env. 600 bpm vs 60 bpm, bpm : battements par minute)¹⁰⁰. Contrairement à l'homme, l'onde T de la souris est inversée (Figure 1.9)¹⁰¹. Cette différence est observée parce que le ratio de la paroi épicaudique-endocardique chez la souris est minime en comparaison à celui chez l'homme. Ainsi, la repolarisation se faisant de

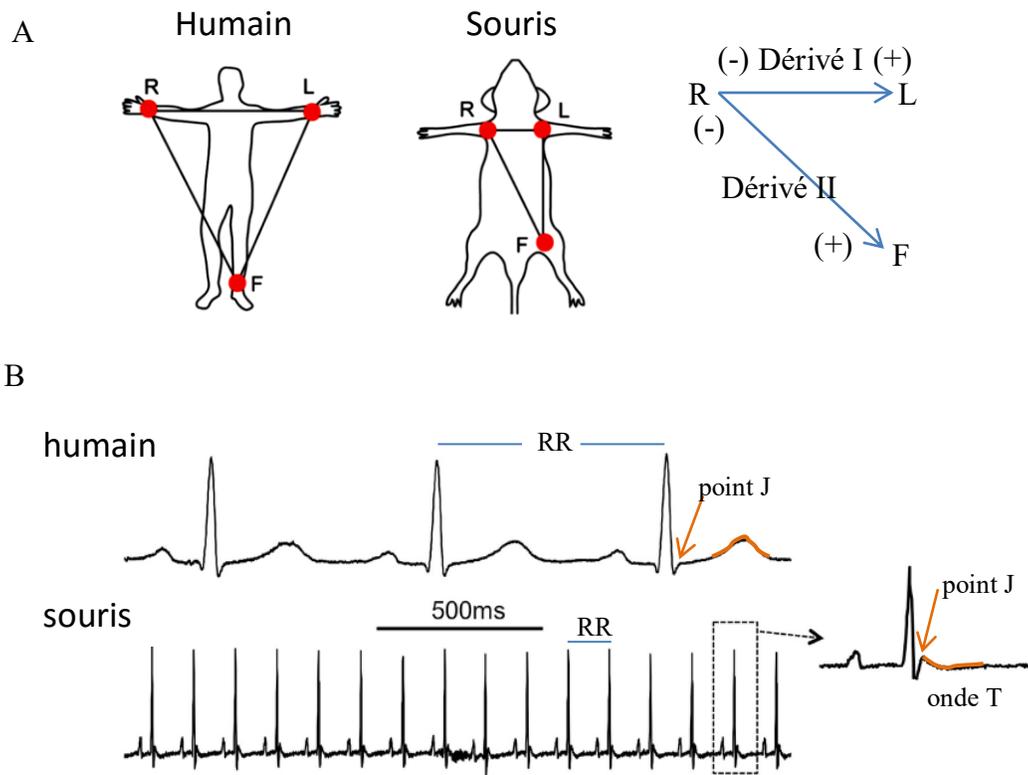


Figure 1.9. Comparaison de l'ECG chez l'humain et la souris. A) Démonstration des différentes configurations en mode dérivé I et II où R : droit, L :gauche, F : mise à terre, (-) : borne négative, (+) : borne positive. B) Exemple d'ECG humain et de souris sur une durée de deux secondes. Identification de l'intervalle RR, de l'onde T et du point J. Adaptée de Kaese¹⁰⁰ et Boukens¹⁰¹

l'épicaarde vers l'endocarde, l'influx prépondérant provenant de la couche endocardique du ventricule gauche masque la repolarisation du ventricule droit principalement composé de cellules endocardiques chez la souris ce qui est perçu par un changement de polarité majoritaire vers la borne négative et une onde T orientée vers le bas (Figure 1.9). De plus, la fréquence cardiaque rapide chez la souris regroupe la fin du QRS et le début de l'onde T ce qui est désigné par le point J. Celui-ci peut être identifié chez l'homme à la jonction de la déflexion de l'onde S et de la ligne isoélectrique. D'autre part, chez la souris le segment ST est absent puisqu'il n'y a pas de retour à la ligne isoélectrique entre la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire ¹⁰¹.

1.2.2 Électrophysiologie des myocytes ventriculaires

En raison de la gravité des arythmies ventriculaires, les projets de cette thèse sont liés à la régulation de l'activité électrique des ventricules. Les prochains paragraphes développent la physiologie de ceux-ci.

1.2.2.1 Potentiel d'action ventriculaire

Le potentiel d'action ventriculaire est causé par l'activation de divers canaux ioniques qui laissent passer les ions de part et d'autre de la membrane en fonction de leur gradient électrochimique. Il est possible de suivre les changements de voltage à la membrane en mesurant le potentiel membranaire de la cellule en réponse à un courant électrique. Celui-ci permet d'atteindre le seuil de dépolarisation pour ainsi générer un potentiel d'action complet. La représentation du potentiel d'action ventriculaire humain (Figure 1.10) débute par la phase de repos, la phase 4, avec un potentiel membranaire aux alentours de -90 mV puis lors, de la phase 0, l'ouverture des canaux sodiques cardiaques dépendants du voltage provoque une entrée massive d'ions Na^+ dans la cellule engendrant le courant Na^+ (I_{Na}) et cause la dépolarisation de la cellule jusqu'à environ +30 mV ¹⁰². Cette dépolarisation rapide entraîne l'ouverture d'autres canaux dépendants du voltage. Premièrement, le canal K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} , correspondant au courant I_{to} s'active rapidement et débute la repolarisation en

contribuant à la phase 1 du potentiel d'action. La durée de celle-ci est courte en raison de l'inactivation rapide des I_{to} et I_{Na} . Elle est suivie de la phase 2, aussi connue sous le nom de phase plateau, correspondant à l'activation des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage de type L et du courant I_{CaL} . En effet, le décalage entre les temps d'activation de I_{to} et de I_{CaL} crée une inflexion (« *notch* ») dont l'amplitude est proportionnelle à la présence de I_{to} ¹⁰³. Ainsi, elle tend à disparaître en fonction du gradient transmural de I_{to} . Cette inflexion correspond au point J sur l'ECG¹⁰⁴. L'activation parallèle du courant Ca^{2+} de type L (I_{CaL}) et de la composante rapide du courant K^+ à rectification retardée (I_{Kr}) engendrent la phase plateau du potentiel d'action en raison de l'équilibre causé par l'entrée d'ions Ca^{2+} et la sortie d'ions

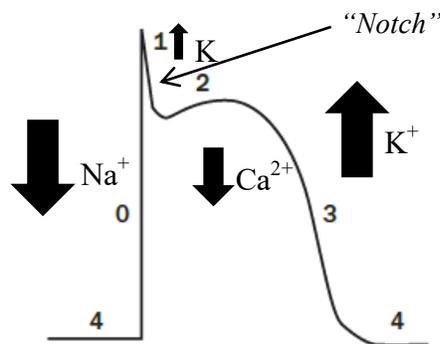


Figure 1.10. Les différentes phases du potentiel d'action humain. La phase 0 représente la dépolarisation cellulaire induite par l'entrée de Na^+ par les canaux Na^+ dans la cellule. La phase 1 représente la phase de repolarisation par l'activation du courant K^+ (I_{to}). La phase plateau (2) est un état d'équilibre entre l'entrée de Ca^{2+} du courant Ca^{2+} de type L et la sortie de K^+ par les autres courants K^+ (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) (phase 3). La phase 4 est la phase de repos. Les flèches vers le bas indiquent une entrée d'ions dans la cellule alors que celles vers le haut une sortie et elles sont proportionnelles au mouvement des ions. Adaptée de Liu¹⁰⁷

K^+ (phase 2). En phase 3, la repolarisation se poursuit plus rapidement en raison de l'inactivation de I_{CaL} . Puis, deux autres courants K^+ se joignent à I_{Kr} : la

composante lente du courant K^+ à rectification retardée (I_{Ks}) et le courant K^+ à rectification entrante (I_{K1}). La fin de la repolarisation et le retour au potentiel de repos (phase 4) sont assurés par I_{K1} , la fermeture des autres canaux K^+ , l'échangeur NCX (discuter plus bas) ainsi que l'activation de pompes ioniques restaurant le déséquilibre ioniques de part et d'autre de la membrane.

Chez la souris, les mêmes courants sont retrouvés au niveau des phases 4 (I_{K1}), 0 (I_{Na}) et 1 (I_{to}) (Figure 1.11). Cependant, des différences existent par rapport au potentiel d'action humain. D'une part, la durée du potentiel d'action est tellement rapide que malgré l'activation de I_{CaL} , la phase plateau n'apparaît pas. La

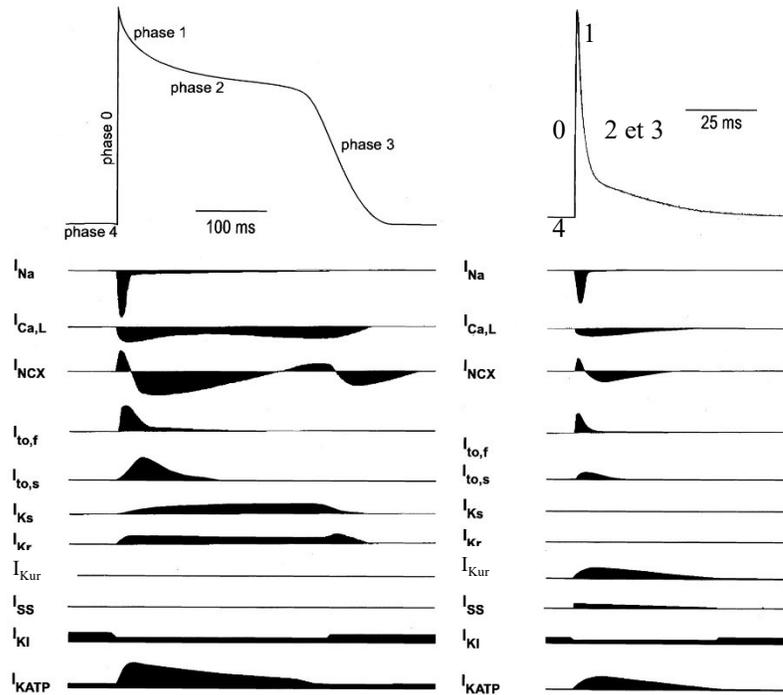


Figure 1.11. Potentiel d'action ventriculaire humain comparé à celui de la souris. Représentations de potentiel d'action humain (*Gauche*) et murin (*Droite*). Sous ces représentations sont exposées les différentes conductances présentes pour chaque espèce ainsi que les fenêtres d'activation des courants. Adaptée de Nerbonne et Kass¹³⁴

repolarisation est plutôt continue et peut plus difficilement être séparée en phase distincte. Les courants K^+ ultrarapides (I_{Kur}), le courant soutenu (I_{ss}) et le courant à rectification entrante (I_{K1}) s'ajoutent à I_{to} pour assurer le retour au potentiel de repos. Les caractéristiques de ces courants seront discutées ci-dessous et les comparaisons entre humain et souris approfondies. Malgré ces quelques distinctions, la souris est un modèle pertinent à étudier et permet de faire des corrélations entre les deux espèces. En effet, les courants ventriculaires I_{Na} , I_{to} , I_{CaL} , I_{Kur} et I_{K1} présents chez la souris sont également retrouvés chez l'homme au niveau des ventricules à l'exception de I_{Kur} qui est seulement dans les oreillettes de celui-ci.

L'équilibre entre les différentes conductances ventriculaires est indispensable au bon fonctionnement du cœur. Une modification au niveau d'un seul des canaux ioniques peut s'avérer néfaste. Lors du développement d'une pathologie qui favorise un remodelage électrique, il est possible de déceler des changements au niveau du potentiel d'action, ce qui permet par la suite d'aller étudier les courants correspondants à cette phase. En conditions pathologiques, différents types d'arythmies liées à l'automaticité, l'excitabilité et la conduction peuvent survenir.

Les cas d'arythmies liées à l'automaticité perturbent la phase 4 du potentiel d'action. Par exemple, une réexpression ventriculaire des canaux HCN, (« *Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotide activated Channel* ») responsables du courant pacemaker (*funny current*, I_f) caractéristique des cellules du NS et du NAV, pourrait favoriser une dépolarisation diastolique et engendrer une dépolarisation spontanée complète au niveau des ventricules (Figure 1.12). Le courant I_{K1} , peut aussi participer à l'automaticité cellulaire de par son rôle physiologique très important dans le maintien du potentiel de repos. Il peut être à l'origine d'arythmies sévères lorsqu'au niveau ventriculaire, le potentiel de membrane se dépolarise conséquemment à une diminution de sa densité (I_{K1}) qui faciliterait l'atteinte du seuil de dépolarisation¹⁰⁵. I_{K1} est responsable du maintien du potentiel de repos et a un rôle constitutif physiologique plus grand que le I_f au

Mécanismes participant aux arythmies

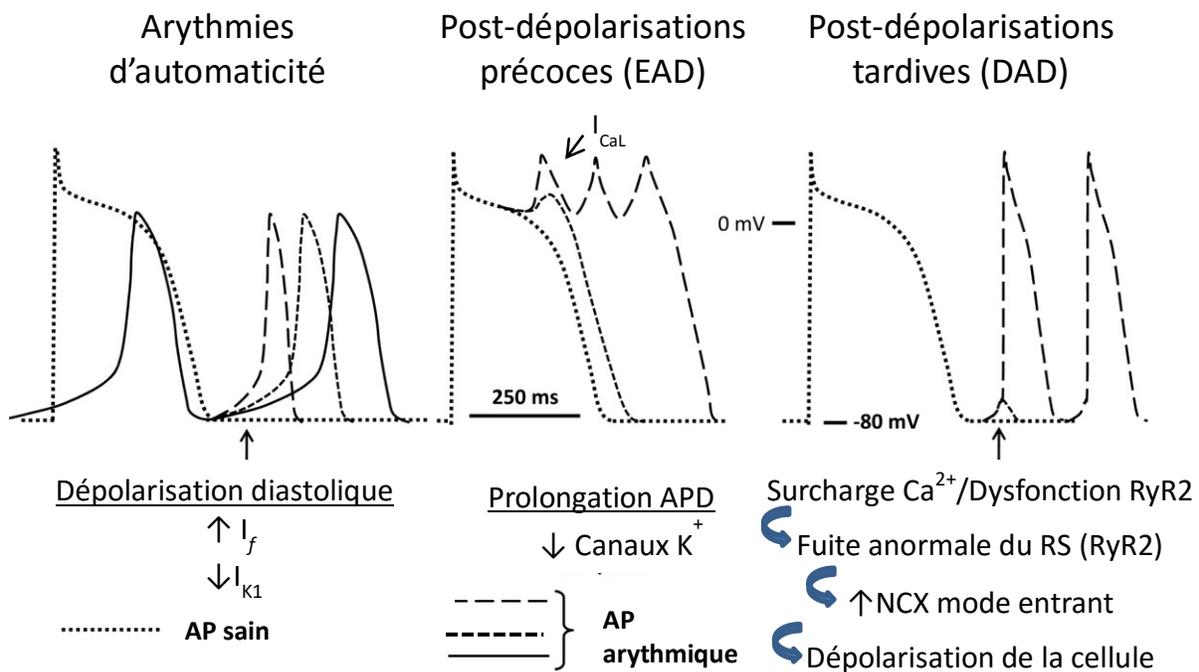


Figure 1.12. Différents mécanismes d'arythmies cellulaires. A. L'initiation d'une activité ectopique peut être initiée par une accélération de l'automatisme favorisant une élévation du potentiel de repos jusqu'au seuil d'excitabilité. B. Les post-dépolarisations précoces sont associées à une réactivation des courants Ca^{2+} (I_{CaL}) en réponse à une prolongation de la repolarisation généralement médiée par une diminution de courants K^+ . C. Les post-dépolarisations tardives découlent de problèmes d'une dérégulation de l'homéostasie calcique. En général, une fuite du réticulum sarcoplasmique, le réservoir intracellulaire de Ca^{2+} des cardiomyocytes, entraîne une élévation de Ca^{2+} locale qui active NCX et produit une dépolarisation cellulaire. Si cette dépolarisation atteint le seuil de dépolarisation, elle peut générer un nouveau potentiel d'action de façon précoce. AP : Potentiel d'action, I_{CaL} : Courant calcique de type L, I_f : Courant pacemaker, I_{K1} : Courant rectifiant entrant, NCX : Échangeur Na^+/Ca^{2+} , RS : Réticulum sarcoplasmique, RyR2 : Récepteur à la ryanodine. Adaptée de Iwasaki *et al.* ¹⁰⁵

niveau des ventricules ce qui lui confère un rôle plus important dans la genèse d'arythmies. En résumé, une diminution de I_{K1} et une augmentation de I_f peuvent créer des foyers ectopiques favorisant des arythmies.

Concernant les arythmies associées à l'excitabilité cellulaire, elles dépendent de la période réfractaire du potentiel d'action. Premièrement, la période réfractaire absolue caractérisée par l'inexcitabilité de la cellule coïncide avec les phases 0, 1, 2 et le début de la phase 3 (Figure 1.13). Elle correspond à la période durant laquelle les canaux Na^+ sont inactivés jusqu'à ce que le potentiel de membrane parvienne à leur seuil d'activation. Cette période se traduit sur l'ECG par l'intervalle entre l'onde Q et le sommet de l'onde T⁹¹. Il s'ensuit une période réfractaire effective ou fonctionnelle qui est un mécanisme empêchant les arythmies prématurées. Les cellules peuvent alors se dépolariser localement sans toutefois transmettre le stimulus aux cellules avoisinantes. Cette période n'est pas à l'origine de la genèse d'arythmies et est souvent fusionnée avec de la période réfractaire absolue.

Par la suite, le retour de l'excitabilité et donc la possibilité de propager un influx correspond à la période réfractaire relative. En effet, si un courant entrant permet au potentiel de membrane d'atteindre un certain seuil d'excitabilité, un nouveau potentiel d'action sera généré. Sur l'ECG, la période réfractaire relative correspond à l'intervalle entre le sommet et la fin de l'onde T et coïncide avec la phase 3 du potentiel d'action (Figure 1.13). L'excitabilité d'une cellule repose donc sur la durée de la période réfractaire qui varie en fonction de la durée du potentiel d'action. Dans le cas d'un raccourcissement de la durée du potentiel d'action, la phase réfractaire est diminuée permettant la réactivation des canaux Na^+ dans un délai plus court, ce qui accroît l'excitabilité cellulaire. Lorsqu'il existe un gradient, un arrêt ou un ralentissement, dans la conduction de l'influx, ceci peut favoriser un phénomène proarythmogène comme l'arythmie de réentrée (Figure 1.4). À l'inverse, lorsque la durée du potentiel d'action ventriculaire est prolongée, la susceptibilité aux post-dépolarisations précoces (EAD, « *early afterdepolarisation* ») est augmentée puisque la cellule verra son potentiel de mem-

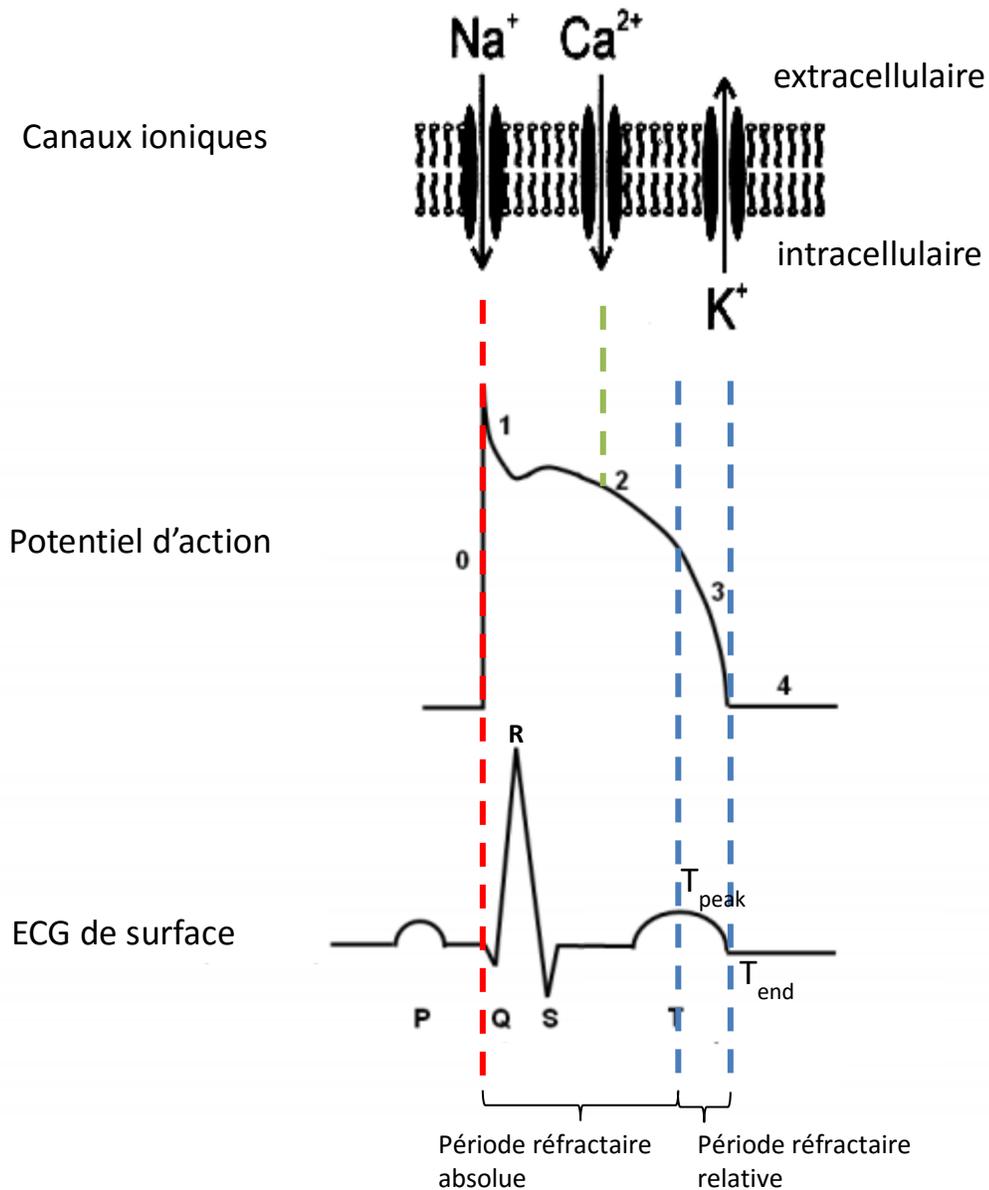


Figure 1.13. Correspondance entre l'ECG et le potentiel d'action. *Haut*-Le déplacement des ions au travers d'un cardiomyocyte en réponse à une dépolarisation est montré. *Milieu*-Le potentiel d'action d'une cellule ventriculaire sur lequel est désigné les quatre phases et les ions qui y sont associés. *Bas*-Exemple de l'activité électrique ventriculaire sur un ECG. Les traits pointillés délimitent les mouvements des ions et les périodes d'excitabilité cellulaire. L'intervalle QT_{peak} correspond à la période réfractaire absolue. La période réfractaire relative, période permettant une nouvelle dépolarisation, s'étend de T_{peak} à T_{end} . Adaptée de tel.archives-ouvertes.fr/tel-00767106/document

brane légèrement dépolarisé à la fin de la période réfractaire, facilitant le déclenchement d'un nouveau potentiel d'action par la réactivation des canaux Ca^{2+} de type L ¹⁰⁵. Les post-dépolarisations tardives (DAD, « *delayed afterdepolarization* ») surviennent lors de la phase de repos et sont causées par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire suite à la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique par une fuite du récepteur à la ryanodine (RyR2). Ce Ca^{2+} va sortir de la cellule via l'échangeur NCX qui fait entrer trois ions Na^+ pour chaque ion Ca^{2+} sortant, participant ainsi à l'entrée d'ions Na^+ et la dépolarisation cellulaire ¹⁰⁵ (Figure 1.12).

Enfin, les arythmies de conduction sont associées à des troubles de la propagation de l'influx électrique. Elles prennent place dans différentes régions du cœur. Le bloc sino-auriculaire, le bloc auriculo-ventriculaire et le bloc de branches correspondent respectivement à une interruption de la conduction entre le NS et les oreillettes, les oreillettes et les ventricules ou au sein même des ventricules. La vitesse de conduction peut être affectée par un remodelage structurel comme par le développement de fibrose. La fibrose a pour conséquence de ralentir le passage d'un influx ou d'être un obstacle à contourner devenant ainsi un substrat arythmogène ¹⁰⁵. Également, la vitesse de conduction dépend des canaux Na^+ et des jonctions communicantes qui déterminent respectivement la puissance de dépolarisation et la vitesse à laquelle l'influx électrique se transmet entre les cardiomyocytes ¹⁰⁵. L'implication des canaux ioniques et des protéines contractiles ainsi que leurs bases moléculaires lors de ces manifestations est approfondie dans les paragraphes suivants.

1.2.2.1.1 Canaux sodiques

Au niveau cardiaque, $\text{Na}_v1.5$ est la principale isoforme de la famille des canaux Na^+ dépendants du voltage. Sa sous-unité α est traduite du gène *SCN5A*. Des études récentes suggèrent que d'autres isoformes, dont $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$, seraient également exprimées de façon significative dans le cœur ^{102, 106}. Ces observations maintenant acceptées ont été une source de

débats, toutefois des études futures seront nécessaires afin de mieux comprendre leur rôle et leur modulation dans le cœur ¹⁰⁷. Nav1.5 demeure néanmoins le principal contributeur à la dépolarisation rapide des myocytes. Nav1.5 est constitué d'un homotétramère de sous-unités α d'un poids moléculaire d'approximativement 220 kDa (Figure 1.14). Chaque sous-unité α possède quatre domaines répétés de six passages transmembranaires dont les segments S4 sont sensibles au voltage ¹⁰². La sélectivité est assurée par le motif DEKA retrouvé dans le pore qui est formé par les segments S5 et S6. Le domaine d'inactivation se trouve entre les domaines III et IV. Différentes modifications posttranslationnelles ainsi que des sites d'interaction avec d'autres protéines ont déjà été répertoriés (Figure 1.14). Ces différents médiateurs sont connus pour moduler le courant Na^+ soit au niveau de la densité du courant, de ses cinétiques d'activation et d'inactivation ainsi que de son expression à la membrane. Le courant Na^+ possède donc deux composantes : le courant maximal macroscopique (I_{Na}) et le courant tardif nommé « *late* » (I_{NaL}). En plus de leur rôle au niveau de la cellule elle-même, les canaux Na^+ sont très importants dans la propagation de l'influx électrique au niveau du cœur en entier. Ce qui explique leur présence à proximité des jonctions communicantes aux disques intercalaires ¹⁰⁸.

Au départ, l'ouverture du canal est engendrée par la dépolarisation de la cellule jusqu'au seuil d'activation des canaux sodiques ~ -90 mV et le courant maximal est obtenu entre -50 et -25 mV selon les espèces, les interactions protéiques éventuelles et les solutions utilisées. Lorsque la dépolarisation maximale est atteinte, le mécanisme d'inactivation rapide du courant, dénommé le mécanisme de la balle et de la chaîne (« *N-ball and chain* »), est engendré assurant le blocage du pore. La fermeture du pore s'opère par le mouvement de l'extrémité N-terminale vers la séquence IFM, située sur la boucle entre le domaine III et IV, ce qui empêche les ions Na^+ de traverser le canal. Cette inactivation correspond à la période réfractaire absolue du potentiel d'action, soit lorsque la cellule ne peut se dépolariser à nouveau. Lors du retour au potentiel de repos, le canal change de conformation en passant d'un état inactivé à un état fermé. Ce phénomène nommé

déactivation est associé à la période réfractaire relative lors de laquelle les canaux Na^+ peuvent être activés de nouveau.

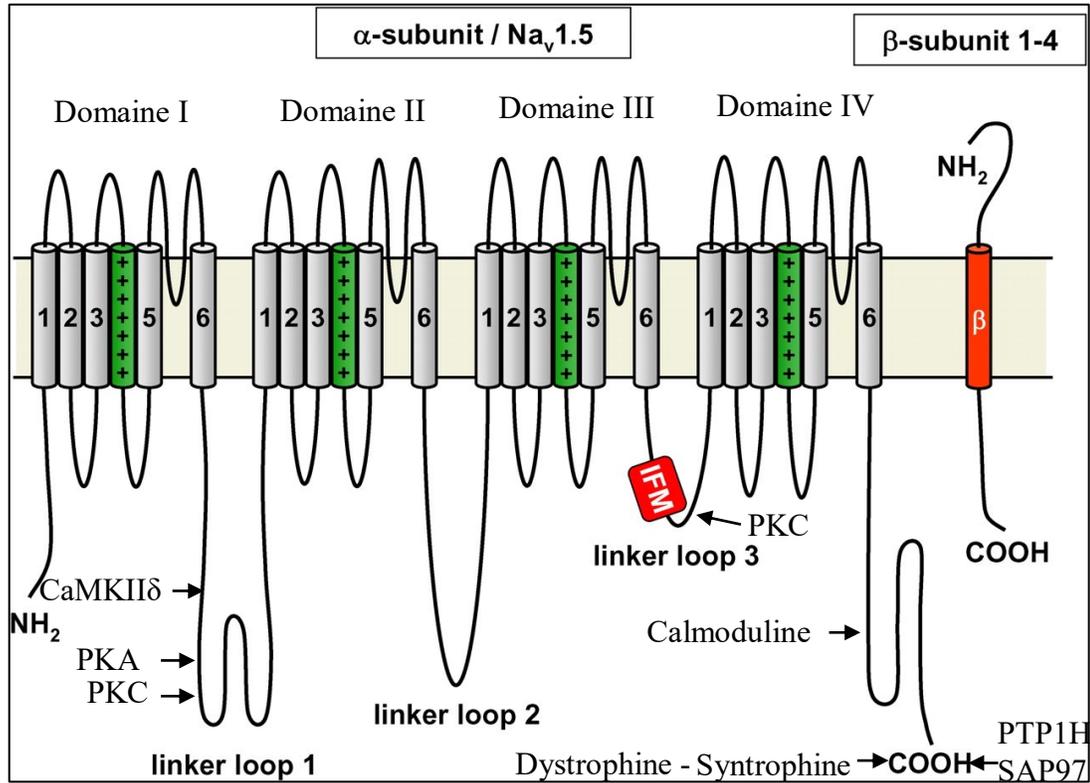


Figure 1.14. Structure linéaire de la sous-unité α du canal Na^+ . Le canal Na^+ est composé de quatre domaines de six passages transmembranaires chacun. La région N- et C-terminale sont du côté intracellulaire. Les segments senseurs de voltage (S4, vert +), le domaine IFM responsable de l'inactivation ainsi que quelques-unes des protéines dont l'interaction avec le canal a été répertoriée sont indiqués. CaMKII δ : calmoduline kinase δ , PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, PTP1H : protéine phosphatase 1H, SAP97 : protéine associée au synapse 97 Adaptée de Abriel⁷

Le gain ou la perte de fonction du courant Na^+ favorise le développement d'arythmies sévères. $\text{Na}_v1.5$ est associé à de nombreuses mutations et phénotypes. Une mutation qui se trouve dans la séquence codante de la boucle d'inactivation

est associée au syndrome du QT long 3 (LQT3). Celle-ci résulte en un gain de fonction causé par une inactivation incomplète, ce qui entraîne l'apparition d'un courant résiduel, I_{NaL} ¹⁰⁷. I_{NaL} va retarder la repolarisation par l'entrée de charges positives ce qui peut faciliter le déclenchement d'un nouveau potentiel d'action dépendant du I_{CaL} causant une post-dépolarisation précoce (EAD). Il est aussi possible que le I_{NaL} participe au potentiel arythmogène en favorisant la réouverture des canaux Na^+ dès la fin de la période réfractaire absolue; puisque la cellule serait plus dépolarisée et le seuil d'activation des canaux Na^+ sera atteint plus facilement.

Une perte de fonction liée à une diminution du courant Na^+ macroscopique est commune dans les maladies comme le syndrome de Brugada qui est aussi associé à diverses mutations, la maladie du nœud sinusal (*sick sinus syndrome*), les maladies de conduction ou bien les cardiomyopathies dilatées¹⁰⁷. La réduction du courant Na^+ peut être causée par une diminution de la probabilité d'ouverture, par un allongement de la période d'inactivation du canal (*recovery from inactivation*) ou par des altérations des cinétiques d'activation et d'inactivation. En conséquence, une perte de courant Na^+ va entraîner un ralentissement de la conduction pouvant participer à la genèse d'arythmies en favorisant une hétérogénéité du gradient de propagation de l'influx électrique cardiaque. De plus, la durée du potentiel d'action pourrait être réduite ce qui pourrait aussi participer au développement du phénomène de réentrée. Certains phénotypes démontrent des altérations au niveau des deux composantes, le courant macroscopique et l'inactivation, augmentant l'instabilité de l'activité électrique^{109, 110}.

La régulation de $Nav1.5$ a été explorée à l'aide de modèle transgénique. La souris surexprimant *SCN5A* ne présente aucun changement au niveau du courant ou de la configuration du potentiel d'action¹¹¹. Ces données suggèrent que la cellule est capable de maintenir un nombre stable de canaux Na^+ à la membrane de façon à empêcher un surplus de courant Na^+ ou bien que la membrane possède une capacité maximale du nombre de canaux Na^+ ¹¹². À l'inverse, une double délétion (homozygote) de $Nav1.5$ est létale au niveau embryonnaire engendrant des malformations cardiaques importantes démontrant que $Nav1.5$ a un rôle primordial

dans le développement du cœur ¹¹³. Les souris hétérozygotes quant à elles souffrent d'un ralentissement de la fréquence cardiaque, de la conduction auriculaire, atrio-ventriculaire et ventriculaire en plus d'avoir une plus grande susceptibilité aux arythmies ventriculaires ¹¹³.

Plusieurs protéines sont connues pour interagir avec Nav1.5. Les sous-unités β se lient au canal et participent à la régulation du courant via une modulation de la dépendance au voltage et des propriétés biophysiques. Ces protéines peuvent également influencer sa translocation à la membrane ainsi que son association avec des protéines d'ancrage comme les ankyrines. Les isoformes des sous-unités β avec lesquelles Nav1.5 interagit sont encore mal définies puisque cette interaction varie en fonction de l'espèce ou du système d'expression utilisé. Néanmoins, des études ont suggéré que Nav β 1, Nav β 2 et Nav β 3 encodé par SCN1B, SCN2B et SCN3B s'associent avec Nav1.5 ^{114, 115}. De plus, les connexines, ayant également un rôle primordial dans la conduction cardiaque, semblent aussi s'apparier avec Nav1.5 ^{114, 115}. Nav1.5 et Kir2.1 peuvent également former un complexe macromoléculaire pouvant être impliqué dans l'excitabilité et la conduction cardiaque. Conséquemment, des perturbations au niveau de ce complexe peuvent entraîner le développement d'arythmies plus sévères ¹¹⁶.

Ces dernières années, des études ont mis en évidence l'existence de deux sous-populations de Nav1.5 présentes à la membrane des cardiomyocytes. L'une des deux est localisée aux disques intercalaires et l'autre sur les membranes latérales. Cette translocation à la membrane est régulée par l'association avec diverses protéines. En effet, les canaux situés sur la membrane latérale sont assemblés au complexe multiprotéique de la dystrophine (dystrophine-syntrophine) grâce à son motif SIV situé dans la portion C-terminale. Les canaux présents aux disques intercalaires interagissent avec plusieurs protéines dont SAP97 de la famille des protéines MAGUK (« *membrane-associated guanylate kinase* ») ^{102, 116-118}. Selon de récentes études, il semble que la population aux disques intercalaires contribuerait davantage au I_{NaL} que la population de la membrane latérale. Aussi, de futures études seront nécessaires afin de mieux

comprendre comment ces interactions peuvent être modifiées en conditions pathologiques lorsque I_{NaL} est augmenté, comme c'est le cas pour le syndrome du LQT3¹¹⁹. Par ailleurs, différentes modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la phosphorylation, l'oxydation par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'ubiquitinylation régissent également l'activité de $I_{Na}/Na_v1.5$ ¹²⁰. Par exemple, la glycosylation ajoute des résidus chargés négativement pouvant moduler la dépendance au voltage. Il a par ailleurs été démontré que le degré de glycosylation de $Na_v1.5$ diffère entre les oreillettes et les ventricules suggérant une régulation différente entre les deux chambres¹²¹. De plus, la régulation de $Na_v1.5$ par $Na_v\beta1$ reposerait sur leur interaction au niveau de leurs sites de glycosylation par l'intermédiaire de résidus sialiques et causerait un décalage de l'activation et de l'inactivation vers des voltages hyperpolarisés¹²². Ainsi, des souris déficientes en SCN1B développent plusieurs altérations cardiaques comme une augmentation du courant Na^+ produite par les isoformes neuronales, des transitoires calciques retardés et une augmentation d'étincelles calciques (« Ca^{2+} sparks ») qui entraînent des arythmies polymorphiques ventriculaires et des DADs¹²³. Plusieurs protéines comme la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CaMKII) et Fyn (protéine kinase de la famille Src) phosphorylent $Na_v1.5$ en conditions physiologiques et pathologiques. Bien que la phosphorylation soit la modification la plus étudiée, il existe plusieurs divergences quant aux effets qui y sont associés en raison de la diversité des protéines kinases phosphorylantes et de leurs cibles cardiaques de différentes espèces. Des stimuli physiologiques ou pathologiques entraînent l'activation des récepteurs β -adrénergiques puis de PKA qui est responsable de la phosphorylation de nombreuses protéines. Les données les plus reproductibles associées à l'activation de la PKA sont un déplacement de la probabilité d'ouverture du canal vers des voltages plus hyperpolarisés^{120, 124-126}. Quant aux PKC, leur activation provoque généralement une diminution du courant Na^+ en raison d'un décalage vers des voltages négatifs de l'inactivation à l'équilibre (« *steady state inactivation* ») résultant en une diminution du courant pouvant être activé à un voltage donné¹²⁷. Bref, si la dépendance au voltage change et se

déplace vers des voltages négatifs, l'amplitude de courant est moindre au niveau des voltages parcourus lors d'un potentiel d'action. De plus, les PKC conventionnelles pourraient être impliquées dans l'internalisation du canal¹²⁸. Ces découvertes intéressantes ont été réalisées dans des modèles de cellules néonatales de rat ou de lignée cellulaire HEK. De ce fait, de futures recherches sont nécessaires afin de valider l'applicabilité dans des cœurs adultes et des modèles *in vivo*. Dans des modèles animaux, la phosphorylation par CamKII semble plutôt augmenter I_{NaL} dans les cellules ventriculaires isolées de cœur en IC¹²⁹⁻¹³¹.

1.2.2.1.2 Canaux calciques

La structure de la sous-unité α_1 des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage (Ca_V) est semblable à celle des Na_V puisqu'elle est composée d'un homotétramère dont chacun possède quatre domaines ayant six segments transmembranaires ayant des propriétés similaires (Figure 1.15)^{132, 133}. Au niveau des ventricules, l'isoforme $Ca_V1.2$ est majoritaire. À la membrane, elle s'associe avec d'autres sous-unités α_2 , δ , β , γ afin d'assurer son activité. Au niveau cardiaque la sous-unité γ a été retrouvé sous forme ADNc chez l'homme et le rat, son rôle fonctionnel demeure toutefois inconnu¹³³. Le courant correspondant, I_{CaL} , s'active entre les voltages -50 et +50 mV et est maximal à 0 mV dans les ventricules puisque l'isoforme prédominante est $Ca_V1.2$ ¹³⁴. Le I_{CaL} peut être généré par $Ca_V1.2$ et $Ca_V1.3$ qui sont traduits de *CACNA1C* et *CACNA2C*, respectivement. Ce dernier a une cinétique d'activation à des voltages plus hyperpolarisés avec un courant maximal vers -10 mV comparable à celui observé dans les cellules du NS où $Ca_V1.3$ est l'isoforme prépondérante^{135, 136}. L'inactivation du canal est dépendante du Ca^{2+} . Le I_{CaL} est important non seulement dans la régulation de l'activité électrique, mais aussi dans le processus de contraction et la transcription de gènes. Une autre famille de canaux calciques composée des isoformes $Ca_V3.1$ et $Ca_V3.2$, est également présente au niveau cardiaque. $Ca_V3.1$ est l'isoforme prédominante impliquée dans le maintien de l'automaticité¹³⁷. Certaines études suggèrent toutefois que ces canaux, $Ca_V3.X$, sont réexprimés en présence d'hypertrophie dans les ventricules pouvant ainsi contribuer aux arythmies

d'automatisme par l'activation du courant Ca^{2+} de type T (I_{CaT}) qui s'effectue à des voltages plus hyperpolarisés ¹³⁸⁻¹⁴⁰.

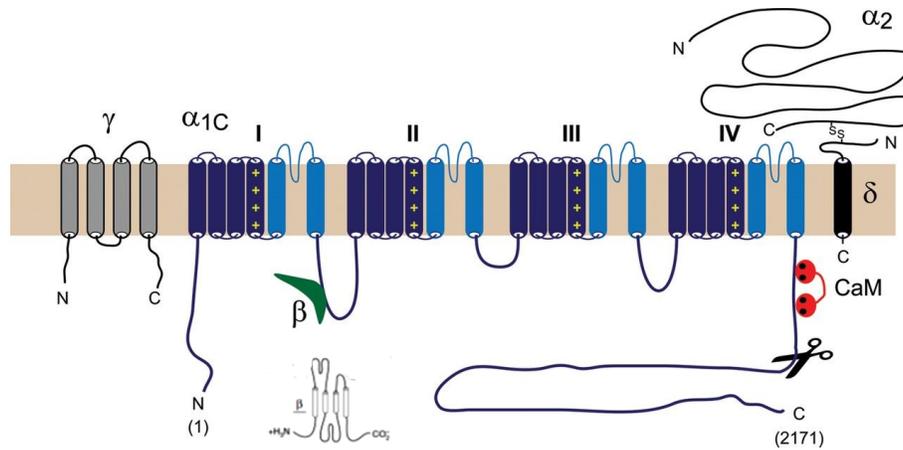


Figure 1.15. Structure linéaire des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage. Le canal Ca^{2+} est composé de quatre domaines de six passages transmembranaires chacun. La région N- et C-terminale se trouve du côté intracellulaire. Le canal requiert pour sa fonction/modulation des protéines accessoires telles que $\alpha 2$, β , δ et γ . Le senseur de voltage est situé dans le segment 4 (+) et les segments 5-6 forment le pore. Adaptée de Catterall ¹³² et Shaw et Colecraft ¹³³

La localisation de $\text{Ca}_v1.2$ est principalement au niveau des tubules transverses qui sont des invaginations de la membrane sarcolemmale. Cette structure est essentielle au CEC afin de favoriser la proximité entre $\text{Ca}_v1.2$ et le récepteur à la ryanodine afin de permettre le processus de libération du Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} (CICR, « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release ») ¹⁴¹; ces concepts seront abordés ultérieurement. Il est intéressant de noter que les tubules transverses n'apparaissent qu'après quatre semaines de vie chez les rongeurs et que leur présence tend à disparaître en culture et en IC ¹⁴²⁻¹⁴⁵. Une autre localisation possible de $\text{Ca}_v1.2$ est au niveau des cavéoles, qui sont une invagination de la membrane sarcolemmale qui est enrichie de cholestérol et de sphingolipides. Chez

la souris, ~50 % des canaux $Ca_v1.2$ sont localisés dans les cavéoles dont le type 3 est prédominant au niveau du cœur ¹⁴⁶. Le rôle de $Ca_v1.2$ dans les cavéoles est plutôt controversé. La disparition des cavéoles dans des myocytes de rat ne change pas la densité de I_{CaL} , mais affecte l'amplitude du transitoire calcique et le raccourcissement cellulaire. Cette observation suggère une interaction non-localisés dans les espaces diadiques (tubules transverses) entre $Ca_v1.2$ et les récepteurs à la ryanodine pouvant moduler le CEC ¹⁴⁷. Un autre groupe a suggéré que le complexe $Ca_v1.2$ -cavéole entraîne une transcription nucléaire de NFAT (« *nuclear factor of activated T-cells* ») dans les myocytes félins, mais d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre cette régulation ¹⁴⁸.

Certaines maladies sont associées à des altérations de I_{CaL} . Le LQT8, aussi connu sous le nom du syndrome de Timothy, réfère à un gain de fonction de I_{CaL} en raison d'un défaut dans l'inactivation du canal ce qui peut prolonger la durée du potentiel d'action et altérer le CEC augmentant ainsi la susceptibilité aux arythmies. À l'inverse, une perte de fonction est associée au syndrome de Brugada, au syndrome du QT court et à la mort subite cardiaque ¹⁴⁹. En IC, la mort subite est intrinsèquement liée à une dysfonction de I_{CaL} dans les tubules transverses qui altère sévèrement le CEC ¹³³. Outre les maladies génétiques, $Ca_v1.2$ peut être modulé par différents médiateurs notamment les PKA, PKC, ROS et CaMKII ce qui en plus d'affecter la balance électrique du cœur va aussi changer la composante contractile en raison de son rôle important dans le CEC ¹⁵⁰,
¹⁵¹.

1.2.2.1.3 Canaux potassiques

La famille des canaux K^+ est celle possédant le plus de diversité. À la différence des canaux Na^+ et Ca^{2+} , les canaux K^+ dépendants au voltage (K_V) peuvent être sous forme d'homotétramères ou d'hétérotétramères ¹⁵². Chacune de leur sous-unité α ne possède qu'un motif de six domaines transmembranaires, ce qui explique leur taille beaucoup plus faible ¹⁵². Leur filtre de sélectivité est conféré par le motif PXP au niveau du pore ¹⁵². Les K_V s'inactivent de deux

façons : par un mécanisme rapide comme chez les canaux Na_V qui mène à un blocage du pore par l'extrémité N-terminale puis par un mécanisme d'inactivation plus lent impliquant la fermeture du pore par un repliement du filtre de sélectivité¹⁵². L'état fermé prend forme lorsque les hélices S6 se replient vers l'intérieur du pore empêchant le passage des ions. Au niveau du potentiel d'action cardiaque, les canaux K^+ rectifiants entrants (K_{ir}) sont aussi impliqués. À l'inverse des autres canaux, ils laissent entrer le K^+ aux voltages plus hyperpolarisés que celui du potentiel d'inversion. Leur rectification est dépendante des ions magnésium et des polyamines qui bloquent le pore en réponse à la dépolarisation¹³⁴.

Au niveau des ventricules, le courant K^+ transitoire indépendant du Ca^{2+} de la couche épocardique (I_{tofast}) correspond principalement au canal $\text{K}_V4.3$ (*KCND3*) chez l'homme alors que chez le rongeur, les isoformes $\text{K}_V4.2$ (*KCND2*) et $\text{K}_V4.3$ (*KCND3*) sont présentes¹⁵³⁻¹⁵⁵. Dans la couche endocardique, I_{toslow} est majoritairement retrouvé et le canal sous-jacent est $\text{K}_V1.4$ chez l'homme comme chez la souris. Ensuite, chez l'homme, I_{Ks} médié par le canal $\text{K}_V7.1$, aussi connu sous l'acronyme K_VLQT1 (*KCNQ1*) et I_{Kr} correspondant à $\text{K}_V11.1$, aussi nommé K_VLQT2 (*hERG2* ou *KCNH2*), sont présents tandis que chez la souris I_{Kur} et I_{ss} sont présents et correspondent respectivement à $\text{K}_V1.5$ (*KCNA5*) et $\text{K}_V2.1$ (*KCNB1*). Au niveau des ventricules se trouve aussi I_{K1} , un canal entrant rectifiant, dont la structure est différente avec uniquement quatre sous-unités α de deux domaines transmembranaires. Les sous-unités α qui retrouvées dans les cellules cardiaques sont $\text{K}_{ir}2.1$, 2.2 et 2.3¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Chez l'homme comme chez la souris, $\text{K}_{ir}2.1$ est l'isoforme prédominante contribuant à I_{K1} ^{158, 160}.

L'implication des canaux K^+ dans le développement de pathologies est grande en raison de leur grande diversité. Au niveau cardiaque, les canaux K^+ sont particulièrement connus pour leur lien avec le syndrome LQT¹⁶¹. Le LQT1 est associé à des mutations au niveau du gène *KCNQ1* correspondant à I_{Ks} . Chez les personnes atteintes de LQT1, l'allongement de la repolarisation est surtout délétère lors de l'exercice physique en raison de l'activation du système β -adrénergique qui favorise les post-dépolarisations précoces (EAD)¹⁶¹. Le LQT2 découle de

mutations au niveau du gène *KCNH2* correspondant au canal hERG et au I_{Kr} . La mort subite chez les personnes développant un retard de repolarisation est généralement reliée à des arythmies induites par un stress sonore ou émotionnel causant une libération de catécholamines et l'activation du système β -adrénergique¹⁶¹. Les prévalences les plus élevées sont retrouvées dans le LQT1 et le LQT2. Il existe aussi le LQT5 et le LQT6 qui sont causés par le mauvais fonctionnement de protéines auxiliaires de $K_v7.1$: minK et $K_v11.1$: MiRP1 provenant des gènes *KCNE1* et *KCNE2*, respectivement¹⁶¹. Le LQT7 provient de défauts génétiques au niveau de *KCNJ2* correspondant à $K_{ir}2.1$ et I_{K1} ¹⁶¹. Les changements associés à cette mutation sont regroupés sous le nom de syndrome de Andersen-Tawil¹⁶²⁻¹⁶⁴. Les individus qui en souffrent développent un phénotype complexe notamment, des arythmies ventriculaires sévères¹⁶²⁻¹⁶⁴.

1.2.2.2 Couplage excitation-contraction

L'activité électrique du cœur est essentielle au fonctionnement cardiaque, mais une deuxième composante, le CEC est tout aussi indispensable. La contraction et la relaxation du muscle cardiaque sont requises pour permettre d'une part, le remplissage des cavités puis l'expulsion du sang vers les coronaires et les organes. Le mécanisme sous-jacent à cette contraction requiert la participation de plusieurs composantes et est finement régulé par les variations de concentrations intracellulaires de Ca^{2+} . Un trouble dans l'action contractile du cœur est associé à une incidence plus élevée d'arythmies et de pathologies cardiaques¹⁵⁰.

I_{CaL} est l'initiateur du CEC (Figure 1.16)¹⁶⁵. Son activation est conséquente à la dépolarisation de la cellule ce qui entraîne une entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Au niveau du cœur, le I_{CaL} est couplé aux récepteurs à la ryanodine de type 2, mais ils ne sont pas en contact¹⁴¹. En effet, l'entrée de Ca^{2+} va induire la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) par le récepteur à la ryanodine (« Ca^{2+} -induce Ca^{2+} release, CICR »)¹⁴¹. Chaque complexe fonctionne indépendamment de son voisin, ce qui nécessite l'action concertée de chacun de

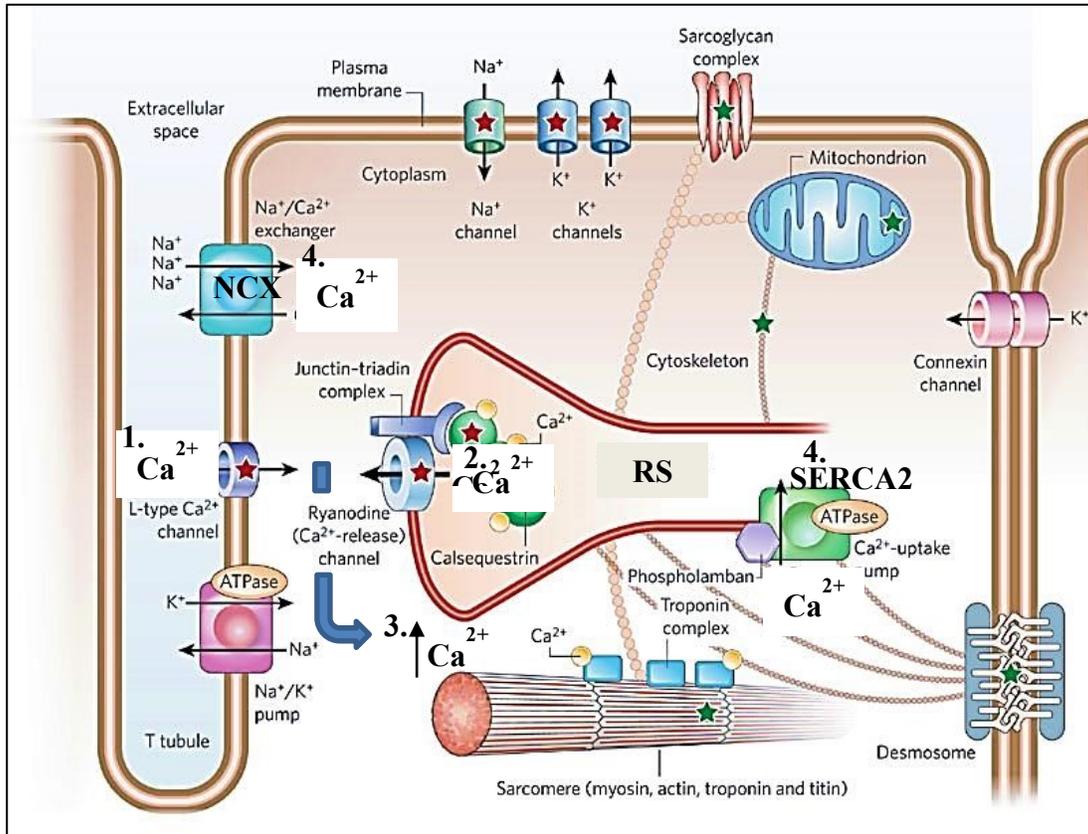


Figure 1.16. Couplage excitation-contraction. Schéma d'un myocyte ventriculaire démontrant le principe du « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release » ainsi que les mécanismes d'extrusion du Ca^{2+} . L'invagination de la membrane, formant les tubules transverses, participe au rapprochement essentiel des canaux Ca^{2+} de type L et des RyR2. Le courant Ca^{2+} de type L est d'abord activé suite à la dépolarisation cellulaire. Cette entrée de Ca^{2+} va ensuite entraîner la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) par le récepteur à la ryanodine de type 2 (#2) désigné comme le phénomène de : « Ca^{2+} induce Ca^{2+} release ». Ce couplage permet l'élévation rapide de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire ce qui conduit à la contraction des myofilaments (#3). La réserve de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique est reconstitué par la pompe Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) (#4). L'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) participe également à la sortie du Ca^{2+} intracellulaire par l'échange d'ions Ca^{2+} et Na^+ (#4). Adaptée de Knollmann and Roden¹⁶⁵

ceux-ci afin d'engendrer une contraction. Cette action concertée est possible grâce au synchronisme de l'activité électrique et la génération du potentiel d'action cellulaire. La libération simultanée de Ca^{2+} dans le cytoplasme qui se liera aux myofilaments et permettra la contraction de ceux-ci. L'augmentation de Ca^{2+} dans l'espace entre I_{CaL} et le récepteur à la ryanodine est importante pour la libération optimale de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, mais aussi pour une inhibition rapide de I_{CaL} par la liaison de la calmoduline au domaine C-terminale ¹⁴¹. L'influx de Ca^{2+} est ainsi régulé par ce mécanisme de rétroaction négative par lequel la relâche de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique inactive I_{CaL} diminuant ainsi l'activité des récepteurs à la ryanodine. En conditions physiologiques, la même quantité de Ca^{2+} que celle libérée sera recaptée afin de conserver un équilibre dynamique. Les mécanismes facilitant cette sortie sont le repompage de Ca^{2+} au niveau du réticulum sarcoplasmique par la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA2) ainsi que l'expulsion d'ions Ca^{2+} via l'échangeur sodium-calcium (NCX) et incidemment ($\sim 1\%$) par les autres pompes. Chez l'homme, l'activité de SERCA2 permet la recapture de 70 % du Ca^{2+} intracellulaire tandis que NCX prend en charge 28 % de l'expulsion de ce même calcium. Tandis que chez la souris et le rat, la contribution de SERCA2 est de l'ordre de 92 % et celle de NCX 7 % (NCX) ^{141, 150}.

L'activation synchrone d'un groupe de 6 à 20 récepteurs à la ryanodine entraîne un relargage de Ca^{2+} dont chaque événement est nommé étincelle calcique ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. En conditions physiologiques, cet événement survient rarement en phase diastolique, mais participe de façon substantielle au mécanisme de CICR lors du CEC. L'afflux de Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule consiste en l'accumulation simultanée de plusieurs étincelles calciques constituant un transitoire calcique. La régulation de l'activité du récepteur à la ryanodine est assurée par trois mécanismes. L'attrition stochastique basée sur l'inactivation rapide de I_{CaL} résulte en une baisse significative de Ca^{2+} empêchant l'activation subséquente des récepteurs à la ryanodine. Également, la déplétion du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique contribuerait aussi à diminuer la sensibilité à cette régulation, tout

comme l'existence d'une période réfractaire du récepteur à la ryanodine durant laquelle son ouverture est impossible ¹⁴¹.

L'activité contractile cardiaque peut être modulée de deux façons en modifiant l'amplitude et/ou la durée des transitoires calciques ou bien par la sensibilité des myofilaments via leur affinité pour le Ca^{2+} ¹⁵⁰.

Dans un contexte d'une activité adrénergique de β_1 exacerbée, l'augmentation d'AMPC puis de la PKA va entraîner la phosphorylation de plusieurs médiateurs comme le phospholamban (PLB), le I_{CaL} et le récepteur à la ryanodine. Le PLB est une sous-unité régulatrice de SERCA2 et a un rôle primordial dans la régulation de l'efflux de Ca^{2+} ¹⁴¹. Lorsqu'il est phosphorylé, il perd son affinité pour SERCA2. L'activité de cette dernière n'est alors plus contrainte et assure un repompage plus efficace du Ca^{2+} cytoplasmique ¹⁵⁰. Dans le cas de I_{CaL} , sa phosphorylation augmente sa densité alors que pour le récepteur à la ryanodine sa sensibilité au Ca^{2+} augmente, favorisant une sortie de Ca^{2+} plus rapide et plus importante du réticulum sarcoplasmique ¹⁵⁰.

La CaMKII est importante dans la régulation des protéines de l'homéostasie calcique. Elle phosphoryle les mêmes cibles que PKA, mais son effet est plus marqué sur le récepteur à la ryanodine ¹⁶⁹. La quantité de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique dicte la sensibilité du récepteur à la ryanodine à s'ouvrir, i.e., une plus grande réserve engendre une plus grande susceptibilité d'ouverture du récepteur à la ryanodine ce qui peut occasionner un plus grand transitoire calcique se traduisant par un relargage plus efficace et par un « *fractional release* » plus élevé ou encore une fuite du réticulum sarcoplasmique facilitée (*SR leak*) par l'augmentation des étincelles calciques. Celles-ci peuvent se propager en vagues calciques par une élévation du Ca^{2+} intracellulaire dans toute la cellule, un phénomène délétère s'il survient lors de la diastole ou de façon asynchrone au CEC ^{166, 170-172}. Alors qu'à l'inverse, une diminution de plus de la moitié du contenu du réticulum sarcoplasmique favorise la fermeture du récepteur à la ryanodine, ce qui empêche son activation par I_{CaL} . Cette mesure permet de ne pas dépleted le réticulum sarcoplasmique de son contenu ¹⁷⁰. En IC, il a été proposé

que la fuite de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique serait induite par une phosphorylation soutenue de PLB favorisant l'activité de SERCA2 et la recapture de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique¹⁷³. Cette fuite de Ca^{2+} lors de la diastole diminuerait la réserve lors de la systole suivante, réduisant l'efficacité de la contraction. D'autre part, il a aussi été démontré qu'en condition pathologique, comme l'IC, la fonction de SERCA2 est généralement diminuée, ce qui entraîne un remplissage moindre du réticulum sarcoplasmique. Quant à NCX, son activité peut être augmentée ou diminuée en IC ce qui peut provoquer une élévation du Na^+ ou du Ca^{2+} intracellulaire selon le cas. Certaines évidences semblent suggérer que NCX aurait un rôle plus important au niveau des microdomaines¹⁵⁰. Puisque NCX possède la particularité de pouvoir fonctionner en mode sortant et en mode entrant en fonction du gradient électrochimique, une accumulation de Na^+ intracellulaire dans ces microdomaines favoriserait le mode sortant afin d'expulser le Na^+ en échange d'une entrée de Ca^{2+} alors qu'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, comme lors du CICR, active le mode entrant stimulant la sortie de Ca^{2+} et l'entrée de Na^+ ¹⁴¹. En IC, plusieurs modifications surviennent dont une prolongation de la durée du potentiel d'action, une diminution de la relâche de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et une augmentation du Na^+ intracellulaire ce qui favorisent l'activation du mode sortant de NCX et l'entrée de Ca^{2+} au lieu de stimuler l'extrusion de Ca^{2+} comme en conditions saines¹⁷⁴. Une augmentation locale de Ca^{2+} à proximité des récepteurs à la ryanodine pourrait accroître leur sensibilité, entraîner leur activation et libérer des étincelles calciques. En quantité suffisante, elles pourraient générer un transitoire calcique¹⁵⁰.

Il existe une relation étroite entre le potentiel d'action et le CEC. En effet, la dépolarisation de la cellule entraîne l'activation de I_{CaL} et la durée du potentiel d'action conditionne la période d'extrusion de Ca^{2+} . Par rapport à l'humain, les modèles murins ont une durée du potentiel d'action beaucoup plus courte du fait que les conductances K^+ diffèrent entre les espèces et dictent la durée du CEC¹⁷⁵. De plus, la phase plateau est absente et la concentration intracellulaire de Na^+ est

plus élevée ce qui diminue l'apport du mode entrant de NCX et donc explique son rôle limité dans l'extrusion du Ca^{2+} ¹⁵⁰.

1.2.3 Différences entre les sexes dans l'activité électrique et contractile cardiaque

Les hommes et les femmes présentent des propriétés électrophysiologiques et contractiles cardiaques différentes. En effet, les femmes ont une fréquence cardiaque plus rapide au repos et un intervalle QTc prolongé qui se traduit par un retard de repolarisation comparativement à l'homme ¹⁰³. De plus, des études d'échocardiographie ont démontré que les femmes ont une masse ventriculaire gauche ainsi qu'une dimension interne du ventricule à la fin de la diastole (LVIDd) plus petite que les hommes ¹⁷⁶. Ces différences ont été attribuées à la régulation des hormones stéroïdiennes ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Le rôle de ces hormones dans la régulation de l'activité électrique et contractile cardiaque et les répercussions de cette régulation dans la genèse d'arythmies est résumé ci-dessous. Par la suite, la régulation hormonale étudiée dans les modèles animaux sera abordée.

1.2.3.1 Rôle des hormones sexuelles dans la régulation de l'activité électrique chez l'humain

L'influence des hormones sexuelles peut expliquer plusieurs des différences au niveau de l'activité électrique entre les hommes et les femmes. En effet, les différences mentionnées précédemment soit l'allongement de l'intervalle QTc et la fréquence cardiaque plus élevée chez la femme n'apparaissent pas avant la puberté, ce qui supporte le rôle des hormones sexuelles dans la modulation des canaux ioniques ¹⁷⁷. À propos de la régulation de la repolarisation, plusieurs études montrent qu'elle serait plutôt corrélée au taux d'hormones masculines qui raccourcissent l'intervalle QT. Plusieurs études ont contribué à former cette conclusion. D'une part, chez les hommes castrés en comparaison aux hommes non castrés, un allongement de l'intervalle JTc, un indice du temps de repolarisation indépendant du temps de dépolarisation ventriculaire, a été observé et a pu être

renversé par un traitement de testostérone ¹⁷⁹. De plus, la durée de l'intervalle JT est réduite chez les femmes ayant un niveau de testostérone plus élevé comme chez celles souffrant d'un syndrome de virilisation ou de la maladie des ovaires polykystiques en comparaison aux femmes saines ¹⁷⁹. Par ailleurs, ni les variations hormonales du cycle menstruel ni les thérapies hormonales de substitution ne suscitent un changement significatif de la durée de l'intervalle QTc chez la femme ^{180, 181}. D'autre part, lors du cycle menstruel, l'intervalle QTc des femmes ne semble pas varier ^{180, 182}. Ces résultats confirment que la testostérone joue un rôle dans la régulation de la repolarisation ventriculaire. La fréquence cardiaque qui est plus élevée chez la femme suggère un rôle pour les hormones sexuelles dans cette régulation puisque le temps de recouvrement du nœud sinusal est plus long chez les hommes que chez les femmes. De plus, cette différence est conservée à la suite de l'inhibition du système nerveux autonome inférant que ces différences sont intrinsèques au nœud sinusal ¹⁸³. Cependant, l'interruption des influx sympathiques et parasympathiques cause un allongement de l'intervalle QTc lors de la phase lutéale (post-ovulation) ce qui suggère un rôle important pour le système autonome dans la régulation de l'intervalle QTc durant le cycle menstruel ¹⁸⁰. Par ailleurs, lors de la grossesse alors que les niveaux d'œstrogène et de progestérone sont significativement élevés, les femmes enceintes présentent une augmentation de la fréquence cardiaque ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. En outre, par échocardiographie, il a été démontré que la contractilité diffère entre les sexes. En effet, la fraction d'éjection au repos est généralement plus grande chez la femme, mais celle de l'homme augmente davantage lors de l'exercice ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Au niveau cellulaire, peu d'information est accessible quant aux différences de l'homéostasie calcique entre les hommes et les femmes.

1.2.3.2 Prévalence des arythmies entre les sexes

En raison des changements électriques entre les hommes et les femmes, la prévalence des arythmies cardiaques diffère. Chez les individus souffrant du syndrome de LQT, l'arrivée de la puberté diminue le risque d'arythmies chez les hommes, mais pas chez les femmes ¹⁹⁰. Par exemple, l'intervalle QTc plus long

chez la femme adulte explique leur plus grande sensibilité à développer des torsades de pointe que ce soit induit par un médicament ou une prédisposition génétique^{103, 191, 192}. En effet, les femmes souffrant de LQT1 ou de LQT2 ont un risque plus important d'événements cardiaques que les hommes^{192, 193}. En revanche, les androgènes, en plus de réduire la durée du potentiel d'action, amplifient la dispersion du gradient transmural ventriculaire ce qui peut mener à divers troubles arythmiques chez l'homme tels que le syndrome de Brugada, le syndrome du QT court ou la fibrillation ventriculaire idiopathique¹⁷⁷. D'autre part, les arythmies supraventriculaires les plus importantes chez les femmes sont la maladie du nœud sinusal (sick sinus syndrome, SSS) et les arythmies de réentrée du nœud auriculoventriculaire alors que les hommes souffrent davantage de bloc du nœud auriculoventriculaire et d'arythmies associées aux voies accessoires¹⁹². Enfin, la prévalence de la fibrillation auriculaire est plus élevée chez les hommes en comparaison aux femmes dans un ratio de 2 :1^{194, 195}.

1.2.3.3 Régulation par les hormones sexuelles de l'activité électrique cardiaque dans les modèles animaux

Diverses études sur les mécanismes sous-jacents aux différences mâles-femelles dans l'activité électrique cardiaque ont été conduites dans plusieurs espèces animales. Au sein du laboratoire, des études antérieures ont démontré que chez les souris, les androgènes sont responsables d'une augmentation de l'expression ventriculaire de $K_V1.5$ résultant en un raccourcissement de la durée du potentiel d'action ventriculaire et de l'intervalle QTc^{153, 196}. De plus, l'association entre les androgènes et le raccourcissement de la repolarisation tel qu'observé chez l'homme a aussi été confirmée chez le chien¹⁹⁷. Chez le cobaye, des expériences antérieures réalisées au laboratoire n'ont démontré aucune différence au niveau de la repolarisation ni au niveau de la densité des courants K^+ (I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1}) ni du I_{CaL} ¹⁹⁸ alors qu'un autre groupe a rapporté une prolongation de la durée du potentiel d'action, une augmentation de I_{Kr} et I_{K1} ainsi qu'une diminution de I_{CaL} ¹⁹⁹. Ces différences sont probablement causées par l'utilisation de méthodologies différentes quant à l'isolation des cardiomyocytes et

l'enregistrement des courants. Chez le rat, il a été démontré que la durée du potentiel d'action ainsi que les densités des courants K^+ et I_{CaL} sont similaires entre les deux sexes malgré la présence d'un cycle œstral^{200, 201}. Les souris femelles possèdent aussi un cycle œstral permettant l'étude des variations hormonales féminines²⁰². Il a déjà été établi que les récepteurs aux hormones stéroïdiennes sexuelles sont présents chez la souris ce qui fait de celle-ci un modèle approprié pour étudier les effets des hormones sur le remodelage électrique et contractile cardiaque²⁰³. Quant au rôle de l'œstrogène, notre laboratoire ainsi que d'autres équipes de recherche ont également son rôle dans la régulation des canaux ioniques cardiaques. Par exemple, un traitement aigu d'une forte concentration d'œstrogène (10-30mM) est associée à une diminution non-spécifique des courants K^+ chez la souris et le cobaye²⁰⁴ (Observations au sein du laboratoire) alors que le traitement aigu au tamoxifène (un modulateur des récepteurs aux œstrogènes agissant comme antagoniste dans le cœur) diminue également les courants K^+ ce qui a été expliqué par le mécanisme d'action aigu du tamoxifène étant indépendant d'une liaison aux récepteurs œstrogéniques. En conditions chroniques, le tamoxifène augmente non-spécifiquement les canaux K^+ chez la souris alors que la déficience en hormones féminines suite à une ovariectomie augmente uniquement I_{to} ce qui se traduit par une augmentation de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QTc^{205, 206}. Ces études démontrent une régulation des canaux K^+ en cas de variations importantes des concentrations d'œstrogène ou de leur liaison aux récepteurs œstrogéniques comme lors de la ménopause ou de la grossesse. En effet, lors de la gestation chez la souris, il a été montré que la densité de I_{to} et de l'expression en ARNm et protéique de l'isoforme sous-jacente $K_v4.3$ sont diminuées²⁹. Nous avons également démontré que la régulation de la densité du I_{to} par l'œstrogène à une concentration comparable à celle retrouvée durant la gestation est médiée par $ER\alpha$ ²⁰⁶. Par ailleurs, il a aussi été rapporté chez la souris que les variations d'œstrogène plus faible lors du cycle œstral (en œstrus) entraînent aussi une prolongation de la durée du potentiel d'action et une diminution de courants K^+ correspondant à $K_v4.3$ et $K_v1.5$ ^{202, 207}. À la différence de notre étude El Gebeiley *et al.*, l'étude de Saito *et al.* n'a pas montré une

modulation de l'expression protéique des canaux ni de l'expression en ARNm de $K_{V4.3}$ en réponse à l'œstrogène, ce qui diminue la solidité de leur étude. D'autre part, dans un modèle de souris gestante reproduisant la hausse de la fréquence cardiaque observée chez la femme, nous avons démontré que cette accélération provenait de changements intrinsèques au cœur²⁰⁸. En effet, une augmentation du courant pacemaker (I_f) participe à la formation d'une pente de dépolarisation diastolique plus rapide, ce qui contribue à l'augmentation de la fréquence cardiaque chez la souris gestante²⁰⁸. Ces changements sont potentiellement associés aux changements hormonaux survenant en cours de grossesse et des études au laboratoire sont en cours afin de répondre à cette question.

1.2.3.4 Régulation par les hormones sexuelles de l'activité contractile dans les modèles animaux

Les différences entre les mâles et les femelles au niveau de l'homéostasie calcique ont été étudiées chez différentes espèces. Il a été rapporté que le raccourcissement cellulaire et les transitoires calciques des cardiomyocytes de rat femelles sont réduits comparativement aux mâles. Cela est dû à une diminution de l'amplitude des étincelles calciques et d'un couplage moins efficace entre I_{CaL} et le récepteur à la ryanodine dans le CICR (« gain ») sans que le I_{CaL} ni le contenu du réticulum sarcoplasmique ne soient affectés^{201, 209, 210}. D'autres études ont mis en évidence des différences entre mâles et femelles au niveau du couplage excitation-contraction à l'âge de 10 mois qui n'existaient pas à l'âge de trois mois²⁰⁰. Cette disparité pourrait être expliquée par l'utilisation de sondes calciques fluorescentes différentes Fura-2/Fluo-4 en comparaison à l'Indo-1 qui ont des constantes de dissociation et des sensibilités différentes²¹¹. Au niveau protéique, l'expression de $Ca_v1.2$, NCX et RyR2 est plus grande chez les femelles alors qu'aucune différence n'a été rapportée pour SERCA2, la calséquestrine (CSQ, protéine liant le Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique) et PLB^{212, 213}. De plus, les rates ont un Ca^{2+} diastolique plus bas que les mâles ainsi qu'une amplitude et une durée des étincelles calciques diminuées²⁰¹. La densité de I_{CaL} est similaire chez les cobayes, les souris et les rats des deux sexes^{153, 198, 201, 213}. Le contenu du réticulum

sarcoplasmique est également similaire entre les sexes chez le rat et la souris ^{201, 213, 214}. Chez les souris femelles, la concentration de Ca^{2+} diastolique est similaire aux mâles alors que chez la rate, elle est diminuée ^{201, 214}. Cette différence pourrait être expliquée par l'utilisation de souris mâles de la lignée C57Bl/6 qui ont des taux de testostérone plus bas que les mâles d'autres lignées ²¹⁵. Jusqu'à ce jour, l'effet de la testostérone sur la concentration de Ca^{2+} diastolique n'a pas été examiné ¹⁷⁸. Chez la souris, les étincelles calciques ont les mêmes variations quelle que soit l'espèce étudiée. D'autres études ont aussi évalué la sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments des myocytes de chats et de rats. Leur force maximale de contraction est similaire, mais il a été constaté chez le rat que l'activité ATPase myofibrillaire est plus grande chez les femelles, leur accordant une plus grande sensibilité au Ca^{2+} ^{216, 217}. De plus, cette sensibilité des myofilaments est modifiée lors du cycle œstral; elle augmente lors de la phase œstrus ²⁰². Le rôle des hormones féminines dans cette régulation a été étudié dans des modèles d'ovariectomies. Les données obtenues varient en fonction du temps de déplétion des hormones féminines ¹⁷⁶. De plus, les variations des taux d'hormones durant le cycle œstral semblent aussi affecter certains paramètres du CEC. Par exemple, le raccourcissement cellulaire et les transitoires calciques sont augmentés lors de la phase œstrus, ce qui suggère un rôle pour l'œstrogène dans cette régulation ²⁰². Des études ont été réalisées pour mieux comprendre le rôle de la testostérone sur l'homéostasie calcique, mais plusieurs limites empêchent une interprétation claire leurs effets. Néanmoins, des résultats se distinguent et sont reproductibles dans plusieurs études. La testostérone serait ainsi responsable d'un plus grand raccourcissement cellulaire ainsi que d'une relaxation plus rapide des cellules ^{176, 218, 219}. En somme, des différences entre les sexes existent au niveau de l'homéostasie calcique, mais de nouvelles études sont nécessaires afin de compléter les connaissances et permettre une meilleure compréhension des mécanismes qui les régulent.

1.3 Contextualisation et hypothèses de l'étude

Les maladies cardiovasculaires étant l'une des principales causes de mortalité dans le monde, elles font l'objet de nombreux projets de recherche afin de mieux définir les mécanismes et processus impliqués dans le développement de ces pathologies ¹. Cependant, un manque plus important existe quant à la compréhension des mécanismes sous-jacents à ces pathologies chez la femme puisqu'elle et les animaux femelles ont longtemps été exclus des études ^{79, 220}. En plus, il est connu que les hommes et les femmes sont touchés différemment quant au développement des maladies cardiovasculaires et que la fonction cardiaque peut être régulée par les hormones sexuelles. Notamment en IC, les femmes développent plutôt un phénotype d'ICpEF alors que les hommes souffrent d'ICrEF, mais les raisons expliquant ces différences sont encore incomprises ^{4, 17, 31, 32}. Un autre médiateur important dans le développement de maladies cardiovasculaires est l'ANGII dont une élévation chronique de sa concentration entraîne des répercussions sévères ¹¹. Néanmoins, sa régulation en conditions pathologiques demeure mécomprise. De plus, le rôle de l'ANGII dans les différences entre les hommes et les femmes lors du développement de l'IC a été peu étudié jusqu'à maintenant. C'est pourquoi il appert important d'une part, d'approfondir les mécanismes associés aux effets délétères de l'ANGII et d'autre part, de distinguer les effets de l'ANGII entre les sexes.

Jusqu'à ce jour, l'IC demeure incurable et le taux de mortalité chez les patients qui en sont atteints est de 50 % dans les cinq ans suivant leur diagnostic ce qui laisse présager une évolution rapide et sévère de la maladie ^{3, 5}. Les deux principales causes de mortalité sont la sidération myocardique et les arythmies ventriculaires ^{221, 222}. Parmi les arythmies associées à la mort subite, l'asystolie est celle la plus retrouvée chez la femme alors que la fibrillation ventriculaire est préférentiellement détectée chez l'homme ^{89, 97}. De par le rôle central de l'ANGII dans le développement de l'IC nous avons élaboré l'hypothèse que l'ANGII est responsable de remodelage ionique et mécanique délétères affectant différemment les hommes et les femmes en présence ou en absence d'hypertrophie. Il s'avère

pertinent d'évaluer son rôle dans le développement des arythmies observées lors de l'IC chez les deux sexes.

Pour ce faire, nous avons choisi le modèle de souris AT1R puisque la majorité des effets délétères de l'ANGII est médiée par le récepteur AT1 et que la souris développe progressivement un phénotype d'IC comme chez l'homme⁸³. Le stimulus de l'IC est une surexpression du récepteur AT1 spécifique au niveau des cardiomyocytes, par la chaîne lourde de myosine α , ce qui permet d'étudier l'effet cardiaque de l'ANGII sans l'influence de l'hypertension. De plus, ni la surexpression du récepteur AT1, ni le sexe n'affectent les niveaux plasmatiques d'ANGII ou la pression artérielle⁸³ (données supplémentaires Annexe II p.vi). Le modèle de souris AT1R permet également de départir l'effet direct de la surexpression du récepteur AT1 de celui de l'hypertrophie en utilisant les souris à deux âges différents soit lorsque l'hypertrophie est absente à 50 jours (50d) et lorsqu'elle est développée à 6 mois (6m)^{84, 85}. Bien sûr, les variations dues à l'âge sont évaluées par la comparaison des souris CTL de la même lignée. Ainsi, le premier objectif a été d'établir que l'ANGII est directement associée à des troubles de conduction chez les souris AT1R mâles indépendants de l'hypertrophie et de déterminer les mécanismes sous-jacents à la diminution du courant Na^+ (I_{Na}) ventriculaire. Deuxièmement, l'objectif était de définir les différences de remodelages électriques, contractiles et morphologiques cardiaques entre les souris AT1R mâles et femelles.

Dans le cadre du premier projet présenté dans cette thèse, uniquement les souris AT1R mâles ont été utilisées afin de valider dans un premier temps la relation entre l'ANGII, le courant Na^+ et l'hypertrophie. En raison de l'importance des courants Na^+ dans la fonction cardiaque et de son implication dans la promotion d'arythmies, il est apparu intéressant d'entreprendre des études sur sa régulation par l'ANGII et sur son impact dans l'activité électrique ventriculaire. Ainsi, cette étude repose sur l'exploration des mécanismes sous-jacents aux effets pathologiques de l'ANGII dans la régulation du courant Na^+ ventriculaire avant comme après le développement d'hypertrophie.

Le deuxième projet entoure la régulation de la fonction cardiaque par divers facteurs neurohumoraux telle l'ANGII, mais aussi les hormones sexuelles en évaluant les différences entre les souris mâles et femelles. Dans le modèle de souris AT1R, il a été intéressant de constater que les souris femelles meurent plus précocement, mais aussi de façon beaucoup plus importante ce qui nous a incités à explorer les différences au niveau des fonctions électriques et contractiles entre les souris AT1R mâles et femelles. Pour cette raison, cette étude porte sur l'étude du remodelage des canaux Na^+ , Ca^{2+} , et K^+ , du couplage excitation-contraction, de paramètres structurels ainsi que de la fonction cardiaque chez les femelles en comparaison aux mâles afin de déterminer si un phénotype plus sévère se développe chez celles-ci et pourrait expliquer leur taux de mortalité plus important.

En résumé, le modèle de souris AT1R permet de mieux comprendre les effets pathologiques de l'ANGII ainsi que les résultats bénéfiques des thérapies avec les IECA ou les ARA et comment ils peuvent différer entre les sexes.

2. Méthodologie

Les techniques présentées ci-dessous ont été réalisées lors des projets de mon doctorat.

2.1 Électrocardiogramme

2.1.1 Électrocardiogramme de surface

Les travaux de Willem Einthoven ont permis de mettre en évidence pour la première fois en 1895, les cinq déflexions de l'ECG P, Q, R, S et T (présentées à la section 1.2.1) ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1924. L'ECG de surface est utilisé afin de faire une première évaluation *in vivo* permettant de recueillir plusieurs données sur la fonction électrique cardiaque. La technique a été adaptée pour les rongeurs afin de fournir des informations sur la régulation électrique cardiaque chez l'animal entier. Premièrement, les souris ont été préalablement anesthésiées à l'isoflurane (2 %) ¹⁵³. La température corporelle de l'animal a été maintenue grâce à un système de lampe et de tapis chauffant. Les électrodes de platine ont été positionnées de façon sous-cutanée et les enregistrements des ECG de surface ont été obtenus en configuration bipolaire en dérivé I à une fréquence de 2 kHz utilisant le système d'acquisition Biopac MP100 (EMKA Technologies, France). Le signal a été amplifié et filtré à 100 Hz (filtre passe-bas) et à 60 kHz (filtre coupe-bande). L'analyse des tracés a été réalisée avec le programme ECG auto (version 2.2.1.18, EMKA Technologies). L'intervalle QTc est utilisé afin de normaliser l'intervalle QT en fonction de la fréquence. En raison de la fréquence cardiaque plus élevée chez la souris, la formule est adaptée ainsi : $QTc = \frac{\text{Intervalle QT}}{\sqrt{(RR-100)}}$, où RR est l'intervalle entre deux dépolarisations ventriculaires et QT la période de repolarisation ventriculaire ²²³. Les analyses ont été exécutées et comparées entre deux évaluateurs afin d'éviter les biais.

2.1.2 Électrocardiogramme sur cœur isolé par perfusion de type Langendorff

Une technique *ex vivo* peut être utilisée afin d'obtenir un ECG cardiaque indépendant de toute innervation du système autonome. Cette technique permet de déterminer si lors d'une étude, l'effet observé sur l'ECG de surface est intrinsèque au cœur ou s'il est influencé par des facteurs systémiques. Pour ce faire, le cœur est perfusé de façon rétrograde en mode Langendorff avec une solution de Krebs-Heinseleit à 37 °C constamment gazée 95 % O₂/5 % CO₂ composé de (en mM) 118.5 NaCl, 25 NaHCO₃, 11.2 glucose, 4.7 KCl, 2.45 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 CaCl₂ afin de soutenir sa capacité contractile et son apport en énergie¹⁹⁸. Deux électrodes sont positionnées, la première est placée sous l'oreillette droite et l'autre à l'apex. Il est intéressant de noter que la fréquence cardiaque mesurée lors des enregistrements *ex vivo* réalisés chez la souris est plus basse que lors de l'ECG de surface. En effet, la perte de l'innervation du système nerveux autonome démontre une contribution importante du système sympathique dans le maintien de la fréquence cardiaque chez la souris²²⁴. Chez l'homme, à l'inverse, le système parasympathique prime et donc sans innervation le cœur bat plus rapidement¹⁸⁰.

2.2 Isolation de myocytes ventriculaires par perfusion de type Langendorff

L'isolation de cellules permet d'étudier en profondeur les mécanismes cellulaires régulant certaines activités physiologiques. De plus, les expériences sur cellules isolées comparativement à un tissu entier offrent un meilleur contrôle des paramètres afin de mesurer l'activité électrique comme le potentiel d'action et le potentiel de repos. En plus, les traitements pharmacologiques, les méthodes de transfection ou de transfert de gènes peuvent être plus facilement exécutés et réussis sur des cellules isolées que sur un animal entier. Ce procédé permet aussi de sélectionner la région du cœur avec laquelle il est nécessaire de travailler comme les ventricules, les oreillettes ou encore le système de conduction. Les

techniques d'imagerie en temps réel (ex. : sondes calciques fluorescentes) ou en marquage fixe (ex. : immunofluorescence) sont également mieux réalisées avec des cellules isolées. Finalement, l'étude sur des cellules cardiaques isolées d'un modèle *in vivo* permet d'obtenir des résultats avec une pertinence physiologique plus grande qu'avec l'utilisation d'une lignée cellulaire.

La technique de perfusion rétrograde en mode Langendorff est privilégiée pour l'obtention de cellules de qualité et assurer la reproductibilité des expériences. Deux méthodes sont couramment utilisées pour obtenir une perfusion constante soit celle par gravité ou celle avec une pompe (Figure 2.1). Les prépara-

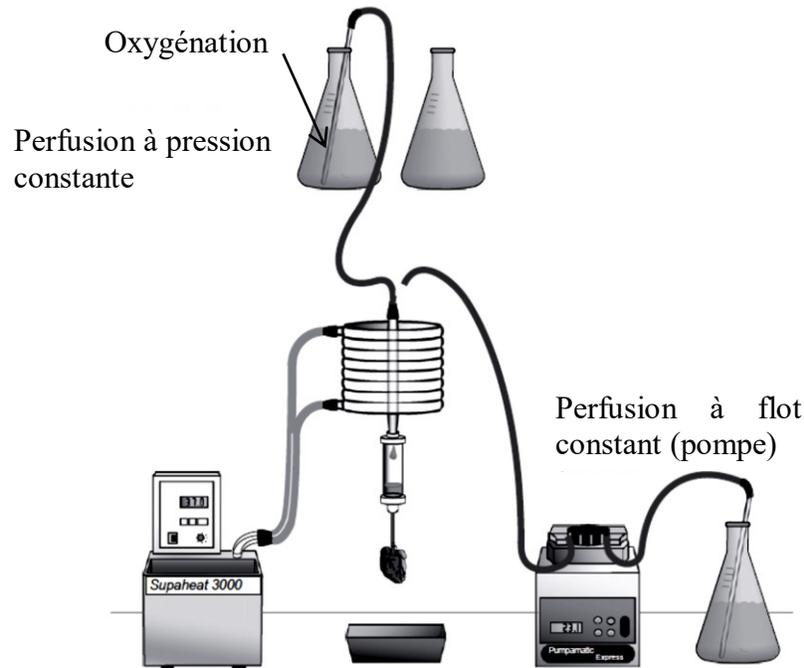


Figure 2.1. Isolation cellulaire par perfusion de type Langendorff. Schéma des différents systèmes de perfusion par gravité et avec la pompe pour la perfusion rétrograde par l'aorte en mode Langendorff. Adaptée de Louch *et al.* ²²⁶

tifs de l'isolation requièrent d'oxygéner pour une durée minimale de 20 minutes la solution de Tyrode-Hepes (en mM : 130 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl₂, 0,3 Na₂HPO₄, 10 Hepes, 5,5 glucose pH 7,4 avec NaOH). De 10 à 15 minutes avant le sacrifice la souris reçoit une dose d'héparine de 1 u.i./kg afin d'éviter les caillots sanguins qui

généraient une perfusion adéquate des coronaires^{225, 226}. L'isoflurane, un agent anesthésique, est utilisé pour sa rapidité d'action et est sans conséquence sur les canaux ioniques²²⁷. Dès que la souris est anesthésiée, elle subit une dislocation cervicale et une ouverture de la cage thoracique. Le cœur y est rapidement excisé puis déposé dans une solution Tyrode-Hepes + 1 mM CaCl₂ froide afin de ralentir son métabolisme et de conserver l'intégrité de ses fonctions. L'aorte est dégagée puis montée sur la canule (Figure 2.2).

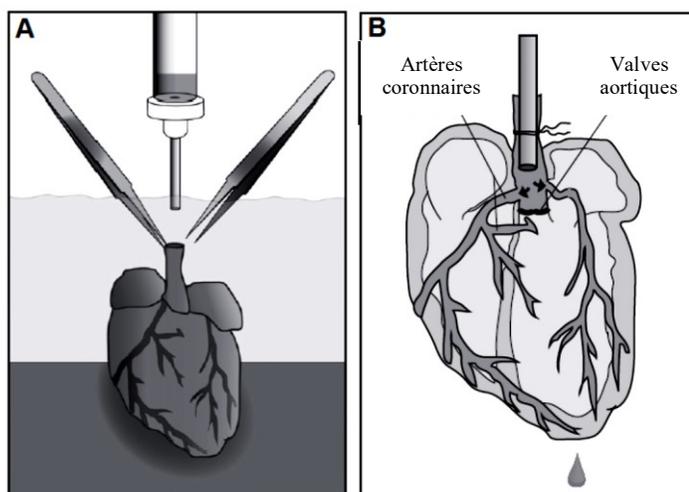


Figure 2.2. Perfusion adéquate des artères coronaires. Positionnement approprié de l'aorte au niveau de la canule du système de perfusion en mode Langendorff afin de favoriser une perfusion via les artères coronaires. Adaptée de Louch *et al.*²²⁶

Une perfusion rétrograde adéquate par l'aorte provoque la fermeture des valves aortiques et force le déplacement du liquide vers les ostias qui sont responsables de la perfusion des coronaires²²⁶. Dans le cas où la canule serait insérée trop profondément dans le cœur, la valve aortique serait brisée et la perfusion se ferait par le ventricule gauche empêchant ainsi le succès de l'isolation. La solution est ensuite changée pour un Tyrode-Hepes sans Ca²⁺ qui permet d'arrêter la contraction du cœur afin de préserver ses réserves énergétiques. De plus, la concentration de Ca²⁺ cardiaque est minimisée afin de conserver une

activité enzymatique similaire entre les expériences. Il est important de perfuser cette solution pour une durée maximale de cinq minutes afin d'éviter le phénomène de paradoxe du Ca^{2+} ^{228, 229}. Ce phénomène délétère se caractérise par une augmentation de la perméabilité du sarcolemme lors de l'absence de Ca^{2+} , détériorant les interactions cellule-cellule. Le retour du Ca^{2+} cause un déplacement massif par osmose de Ca^{2+} dans la cellule causant une hypercontracture et la mort cellulaire ²³⁰. En troisième lieu, la solution enzymatique est perfusée, elle se compose de la solution Tyrode-Hepes qui est complétée par l'enzyme de digestion (73,1 U/mL), une basse concentration de CaCl_2 (30 μM) afin de préserver une activité enzymatique adéquate, de la taurine (20 mM) et de l'albumine sérique bovine (BSA) (0,1 %) de façon à modérer l'activité enzymatique ^{175, 226}. Comme la majorité des laboratoires, nous préférons la collagénase de type II de Worthington pour réaliser la digestion en raison de sa plus grande activité de clostripaïne, mais surtout pour la persistance de son activité dans le temps ^{153, 226}. Le temps de digestion varie en fonction de la lignée de souris, son âge, son phénotype transgénique, etc. La digestion est arrêtée par la perfusion de la solution de Kraft-Brühe (KB) (en mM : 100 K^+ glutamate, 10 K^+ aspartate, 25 KCl, 10 KH_2PO_4 , 2 MgSO_4 , 20 taurine, 5 créatine base, 0,5 EGTA, 5 Hepes, 20 glucose et 0,1 % BSA, pH 7.2 ajusté avec KOH). À noter que l'EGTA n'est pas incluse lorsque les cellules sont utilisées pour les expériences d'imagerie calcique ou de raccourcissement cellulaire afin de ne pas altérer l'homéostasie calcique. Les cellules ont été obtenues par trituration du ventricule droit. Les cellules ont été entreposées dans le KB à 4 °C pour être utilisées dans un délai maximal de huit heures. Les cellules utilisées auront de belles striations, une forme rectangulaire et pourront servir aux expériences de patch-clamp, de raccourcissement cellulaire et de transitoire calcique.

Dans le cadre des expériences réalisées pour cette thèse, le ventricule droit a été utilisé afin d'éviter la variabilité d'expression des canaux ioniques entre la couche épocardique et endocardique du ventricule gauche ²³¹⁻²³⁴. Cette séparation est possible puisque le ventricule droit de la souris est principalement constitué

d'une couche épicardique en raison de sa mince paroi qui ne peut contenir un gradient endocarde-épicarde. Plus précisément, entre ces couches, il existe un gradient électrique qui permet la coordination de l'activité électrique lors de la dépolarisation et la repolarisation. Par exemple, les cellules endocardiques présentent une repolarisation plus longue que les cellules épicardiques (Figure 2.3) puisque les myocytes de l'endocarde se dépolarisent les premiers et se repolarisent

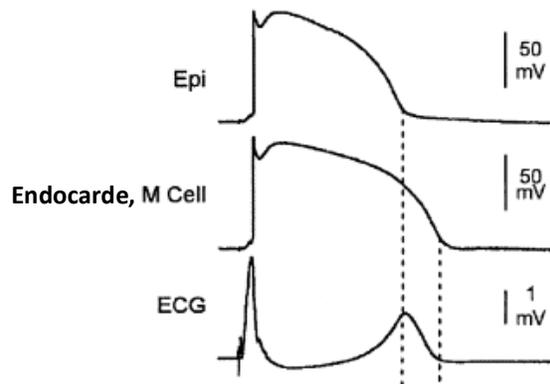


Figure 2.3. Représentation de potentiels d'action d'une cellule de l'épicarde (Epi) et de l'endocarde (M cell). La différence entre la durée de leur potentiel d'action détermine le temps entre le sommet de l'onde T et la fin de l'onde T. Adapté de Antzelevich⁹⁹

en dernier⁹⁹. Cette différence est due, d'une part, à une expression différente de canaux K^+ entre les deux couches. Par exemple, dans la couche épicardique, la repolarisation est initiée par $I_{to\ fast}$ ($Kv4.2$, $Kv4.3$) alors que dans la couche endocardique, il s'agit préférentiellement de $I_{to\ slow}$ ($Kv1.4$). D'autre part, la densité du courant Na^+ est plus petite (33 %) dans la couche épicardique du ventricule gauche en comparaison à la densité similaire observée dans la couche endocardique et le ventricule droit²³⁴. Ainsi, dans le cas du courant Na^+ , le ventricule droit semble être plus représentatif de l'ensemble du myocarde (l'endocarde du ventricule gauche). Quant à l'homéostasie calcique, elle varie également entre la couche épicardique et endocardique. En effet, dans l'endocarde

on retrouve une concentration de Ca^{2+} plus grande en systole et en diastole, les transitoires calciques plus grands, la fréquence d'étincelles calciques spontanées est plus élevée de même que l'expression du récepteur à la ryanodine. Toutefois, l'expression de NCX est diminuée et le courant Ca^{2+} inchangé ²³³. Donc, le ventricule droit est choisi puisque la variabilité entre les cellules de l'endocarde et de l'épicarde pourrait masquer les différences de remodelage ionique entraînées par un stimulus.

2.3 Cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines

L'utilisation des myocytes ventriculaires de souris présente certaines limites. En effet, la conservation des myocytes en culture pour une durée plus longue que 24 heures entraîne une perte des tubules transverses, amorce une différenciation cellulaire et un remodelage électrique qui peut affecter la validité des résultats obtenus ^{227, 235}. Ainsi, dans le cadre d'expériences nécessitant un temps d'incubation plus long (>24 h) avec divers agents pharmacologiques, dans notre cas, un traitement à l'ANGII pendant 48 heures, l'utilisation de cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC-CM) est de choix. De plus, les hiPSC-CM nous ont permis de valider le mécanisme d'action établi chez la souris dans un modèle cellulaire humain. En effet, l'accès à des cellules de donneurs sains est plutôt rare et quant aux cellules provenant de donneurs pathologiques, il peut être difficile d'obtenir de résultats concluants en raison de la grande variabilité interindividuelle. Ainsi les hiPSC-CM nous permettaient d'avoir une population saine (CTL) à laquelle comparer l'effet de l'ANGII. D'autre part, il a été démontré que les hiPSC-CM récapitulent plusieurs pathologies associées au courant ionique comme LQT1, 2, 3 et 8, le syndrome de Brugada ou la tachycardie polymorphique ventriculaire ²³⁶ faisant d'eux un modèle représentatif pour étudier le remodelage ionique. De plus, les paramètres du couplage-excitation contraction sont comparables à ceux du lapin qui sont similaires à ceux de l'homme ²³⁷. Dans un contexte plus général, les

hiPSC-CM sont également un outil intéressant pour valider des cibles thérapeutiques personnalisées pour un patient, modéliser une maladie ou établir une thérapie génique²³⁸. En conclusion, les hiPSC-CM offrent plusieurs avantages facilitant la transition des données obtenues sur des modèles animaux vers l'humain.

Les hiPSC-CM ont été obtenus auprès de la compagnie Axiogenesis Cor.4U® (Cologne, Allemagne). Les cellules ont été dégelées puis préparées sur des lamelles selon le protocole du fabricant. Après une semaine de culture, elles ont été et stimulées électriquement à raison de 1 Hz à une force de 2,5 volts/cm pour une durée de deux semaines (IonOptix, Milton, U.S.A). Après ce délai, les agents pharmacologiques ont été ajoutés au milieu de culture pour un traitement de 48 heures avant de réaliser les expériences.

2.4 Patch-clamp

La technique de patch-clamp permet de mesurer l'activité électrique au niveau cellulaire. Elle a été développée dans les années 1970-80 par Erwin Neher et Burt Sackmann qui ont reçu le prix Nobel de Médecine pour leurs travaux en 1991. Pour la première fois, il était possible de mesurer le flux d'ion au travers d'un canal ce qui a fait grandement avancer la compréhension de la fonction des canaux ioniques^{239, 240}. Le patch-clamp est une technique privilégiée pour étudier l'activité ionique des cellules excitables notamment les cellules neuronales, cardiaques, squelettiques et pancréatiques β .

Diverses approches de patch-clamp existent selon l'information à recueillir. La première étape est commune à toutes : la formation d'un joint étanche (« *gigaseal* ») jusqu'à 1 méga Ohm de résistance entre la pipette de verre borosilicate et la cellule. Une fois le *gigaseal* atteint, l'accès à la cellule entière peut être obtenu grâce à une succion rapide (Figure 2.4²⁴¹) qui brise la membrane sous la pipette. Le cytosol de la cellule tend alors à s'équilibrer avec celui de la pipette. Lorsque dans la pipette des ions plus gros comme l'aspartate sont présents, leur diffusion plus lente crée un potentiel de jonction liquide en raison de

l'accumulation de charges négatives dans la pipette ²⁴². Ce potentiel de jonction, lorsque présent, a été pris en compte lors des enregistrements ainsi, les valeurs

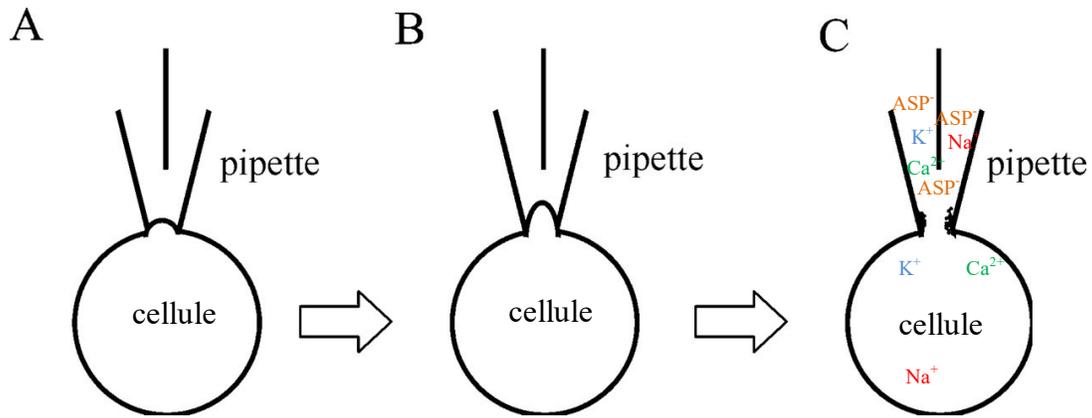


Figure 2.4. Configuration cellule entière. A) La technique de patch-clamp requiert un contact entre la pipette et la cellule. B) Une succion permet de créer un *gigaseal* entre la pipette et la cellule assurant le contact entre les deux. C) La rupture de la membrane permet d’avoir un accès au cytosol de la cellule, ce qui donne lieu à la configuration cellule entière. La dialyse des ions débute, mais les ions aspartates (Asp^-) étant trop gros pour traverser, ils génèrent une charge négative dans la pipette créant un potentiel de jonction. Adaptée de Li ²⁴¹

présentées sont corrigées pour celui-ci. Cette conformation, « cellule entière », permet de mesurer la taille de la cellule par l’envoi d’un intervalle dépolarisant en calculant l’aire sous la courbe du tracé obtenu. De plus, les modes de courant imposé et de voltage imposé peuvent être utilisés afin d’enregistrer des potentiels d’actions et les divers courants respectivement. Les potentiels d’actions sont enregistrés dans une solution physiologique (Tyrode-Hepes) alors que pour l’enregistrement des courants il est souvent nécessaire d’adapter les solutions afin d’isoler le courant d’intérêt.

La mesure des courants Na^+ (I_{Na}) requiert la diminution de la concentration extracellulaire de Na^+ puisque l’amplitude et la rapidité du courant sont trop

importantes et peuvent nuire à une acquisition adéquate. De plus, les expériences sont réalisées à la température de la pièce afin de ralentir les cinétiques d'activation et d'inactivation. Également, les canaux K^+ sont bloqués par l'ajout de césium dans la solution extra et intracellulaire. Pour l'enregistrement sur des myocytes adultes, les solutions suivantes ont été utilisées : (en mM) solution interne 132,5 CsF, 5 NaCl, 5 MgATP, 10 EGTA, 5 HEPES, pH 7,2 ajusté avec CsOH; solution externe : 132,5 CsCl, 5 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glucose, pH 7,35 ajusté avec CsOH. Pour les expériences utilisant les hiPSC-CM, la concentration de Na^+ a été augmentée puisque la densité du courant était plus faible, la solution externe est devenue : 102,5 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glucose, 0,1 CdCl₂, pH 7,35 ajusté avec CsOH (CdCl₂ a été utilisé pour bloquer I_{CaL}).

Pour les courants Ca^{2+} , l'ion Na^+ est remplacé par l'ion TEA⁺ qui bloque le pore du canal Na^+ . Le césium est utilisé pour bloquer les conductances K^+ . La séparation du I_{CaT} et du I_{CaL} est assurée par l'utilisation de deux protocoles. Lors d'un premier enregistrement, le courant Ca^{2+} total est enregistré de -90 mV à +50 mV. Après, le I_{CaL} est obtenu à la suite de l'inhibition du I_{CaT} par un saut d'inactivation à -50 mV pour une durée de 50 ms. Le courant obtenu par la soustraction de ces deux enregistrements équivaut à I_{CaT} . Une particularité du I_{CaL} est que sa densité diminue à la suite de la dialyse du cytoplasme de la cellule et de la solution de la pipette, cette particularité est nommé le « *rundown* ». Une façon d'y remédier est de minimiser la dialyse par l'usage de la technique de patch-clamp en configuration perforée (l'accès à la cellule est possible en perméabilisant la membrane avec de la nystatine, un antifongique). Par ailleurs, lors de nos expériences en cellule entière, ce phénomène a été contrôlé en attendant la stabilisation du courant survenant à la fin de la dialyse. Le bain est perfusé à 37 °C avec la solution extracellulaire composée de (en mM) 145 TEACl, 10 CsCl, 2 CaCl₂, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, 5,5 glucose, pH 7,4 ajusté avec CsOH et la solution de la pipette faite de (en mM) 100 Aspartate, 70 CsOH, 40 CsCl, 2 MgCl₂, 4 MgATP, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7,2 ajusté avec CsOH.

Les courants K^+ sont enregistrés lors de la perfusion de la solution physiologique Tyrode-Hepes +1 mM $CaCl_2$. Le courant total (I_{peak}) incluant I_{K1} est enregistré à partir d'un potentiel de repos de -80 mV et obtenu par un protocole de -110 mV à +50 mV. Un courant nommé I_{Kslow} est par la suite enregistré à l'aide d'un protocole inactivant I_{to} par l'entremise d'un saut d'inactivation à -40 mV pendant 50 ms. Ainsi, la différence entre ces deux tracés correspond à I_{to} . Subséquemment, l'application de 100 μ M de 4-aminopyridine (4-AP) cause le bloc de I_{Kur} , l'enregistrement se fait avec le protocole ayant le saut d'inactivation du I_{to} ce qui permet d'obtenir I_{ss} et I_{K1} . I_{Kur} est obtenu grâce à la différence entre I_{Klow} et ce dernier enregistrement. Selon la validation faite préalablement par el laboratoire, les divers degrés d'inactivation au voltage et la sensibilité à la 4-AP permettent de distinguer les courants K^+ ventriculaires de souris²⁴³.

La technique de current-clamp a été utilisée pour mesurer les potentiels d'action. Les enregistrements peuvent être exécutés parallèlement à ceux des courants K^+ puisque les mêmes solutions externes et internes sont utilisées (Tyrode-Hepes + 1 mM $CaCl_2$)¹⁵³. Suite à l'accès à la cellule entière, le potentiel de repos de la cellule est estimé grâce à l'amplificateur. Selon le protocole, un courant de l'ordre de 0,4-1 nA d'une durée de 0,5 ms est injecté afin de stimuler une dépolarisation cellulaire. La fréquence est étudiée à 1 Hz et 4 Hz afin de vérifier la dépendance à la fréquence. De ces enregistrements, les paramètres d'amplitude du potentiel d'action (APA) et de la vitesse de la pente de dépolarisation (V_{max}) pour évaluer la contribution des canaux Na^+ ainsi que de la durée du potentiel d'action (APD) à 20 %, 50 % et 90 % de repolarisation afin de déterminer la participation de courants K^+ I_{to} , I_{Kur} et I_{K1} .

La suite pClamp 10.2 a été utilisée afin d'établir les protocoles, enregistrer et analyser les tracés des potentiels d'action et des courants. Tous les enregistrements ont été filtrés à 1 kHz, sauf courant Na^+ à 2 kHz et numérisés entre 4-10 kHz. La résistance en série a été réduite par compensation à 75 %. L'amplitude de courant (picoampère, pA) pour chacun des tracés a été déterminée puis normalisée à la capacitance cellulaire (picofarad, pF) pour chacun des

voltages. Ces données sont reportées sur la courbe courant (I, pA/pF) en fonction du voltage (V, mV) nommé courbe IV. La moyenne des courbes IV pour chaque cellule permet d'apprécier la relation entre le courant moyen à chacun des voltages expérimentés. Chaque groupe étudié possède donc sa courbe IV moyenne démontrant comment le canal peut être influencé par rapport à la surexpression de AT1R ou bien à un traitement d'ANGII pour chacun des voltages physiologiques du potentiel d'action.

2.5 Raccourcissement cellulaire

La technique de raccourcissement cellulaire permet donc de mesurer la capacité de contraction des cardiomyocytes isolés en réponse à un champ électrique. Pour ce faire, un bain possédant une paire d'électrodes en argent est préalablement recouvert de laminine afin d'assurer une adhésion cellulaire adéquate et éviter des mesures d'artéfacts. Cependant, lors de nos expériences, il a été déterminé que les cellules doivent être changées après une heure sinon leur contraction diminue drastiquement en raison de leur adhésion à la laminine. Lors de l'expérience, les cellules sont perfusées à 36 ± 1 °C avec la solution de Tyrode-Hepes contenant 1 mM CaCl_2 . La stimulation imposée est de 2 Hz à 80 V. Seulement les cellules qui répondent efficacement à la fréquence de contraction imposée sont choisies. L'acquisition des données est réalisée par le système de Photon Technology International (PTI; Birmingham, NJ). La première étape est de positionner les curseurs (détecteurs de trame) aux extrémités de la cellule en diastole et d'assurer la détection de leur contraction en réglant les contrastes de phase. Ensuite, l'enregistrement des contractions sur une période de 10 secondes est réalisé avec le logiciel Felix4.1.0. La conversion en fonction de la régression linéaire préalablement établie est aussi obtenue avec Felix et le nouveau fichier est analysé avec Clampfit 10.2. L'analyse des tracés permet d'obtenir la longueur des cellules et le % de contraction en normalisant l'amplitude (delta de raccourcissement) par la taille de la cellule (Figure 2.5).

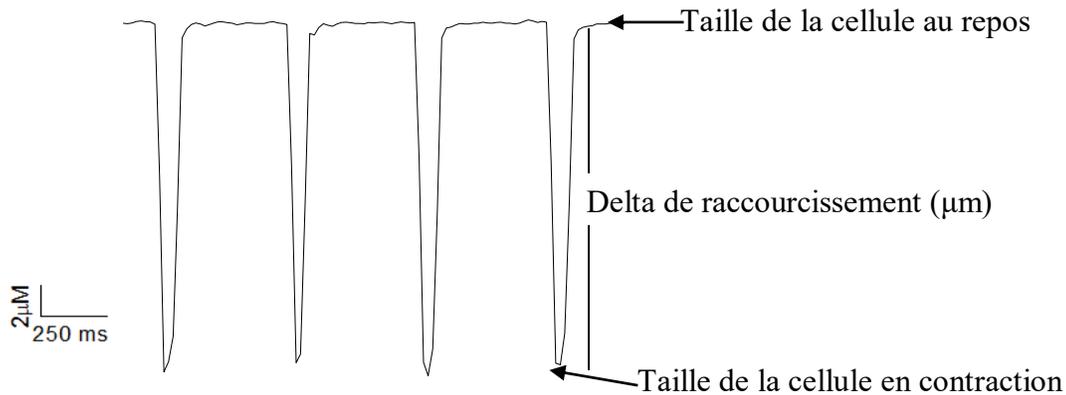


Figure 2.5. Tracé de raccourcissement cellulaire. Représentation de la contraction et de la relaxation d'un myocyte ventriculaire stimulé à une fréquence de 2 Hz. Les paramètres étudiés sont identifiés. Longueur de la cellule : la taille de la cellule au repos, taille de la cellule en contraction, delta de raccourcissement : la différence entre la taille en diastole et en systole.

2.6 Transitoire calcique

Les transitoires calciques permettent de suivre les variations de calcium intracellulaire grâce à une sonde calcique fluorescente (Fura-2) ayant une affinité pour le calcium et un groupement acétoxyméthyle (AM) ester. Le Fura-2AM a été utilisé dans le cadre de nos expériences. Il s'agit d'une sonde ratiométrique permettant d'obtenir la valeur de Ca^{2+} libre intracellulaire par le ratio de la fluorescence entre le Ca^{2+} lié à une longueur d'onde de 340 nm et le calcium non lié à 380 nm subséquente une émission à 510 nm²⁴⁴. Les cellules ventriculaires isolées sont incubées avec 10 μM Fura-2AM pour une durée de 15 minutes dans le bain préalablement couvert de laminine dans le noir afin de permettre l'internalisation du Fura-2AM. Ensuite, la perfusion de la solution dans le bain (Tyrode-Hepes + 1 mM CaCl_2) entraîne la déestérification (la scission du groupement ester (AM) de la sonde) l'empêchant de sortir de la cellule. La

stimulation des cellules à 2 Hz débute en même temps que la perfusion du Tyrode oxygéné. Les critères de sélection des cellules sont les mêmes que pour la contraction cellulaire. Le système PTI et le logiciel Felix servent à l'acquisition des données et la conversion des tracés enregistrés. Le premier ~10 secondes de l'enregistrement montre les transitoires calciques résultant de la stimulation à 2 Hz puis la stimulation est arrêtée pour ~10 secondes. Ensuite, près de la cellule, à l'aide d'un stylet une solution de Tyrode-Hepes + 10 mM de caféine (un agoniste du récepteur à la ryanodine) est brièvement perfusé (1 s) induisant la relâche en Ca^{2+} du contenu du RS soit le transitoire calcique induit par la caféine. À la fin de chaque expérience, la fluorescence maximale (R_{\max}) et minimale (R_{\min}) sont évaluées en conditions saturantes de calcium en présence d'un ionophore (Tyrode-Hepes + 10 mM ionomycin + 5 mM Ca^{2+}) puis en conditions sans calcium avec 5 mM EGTA respectivement^{244, 245}. Ces valeurs sont nécessaires afin de convertir nos ratios de fluorescence en concentration de Ca^{2+} ^{244, 245}. Pour ce faire, la formule suivante est utilisée : $[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left[\frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \right] * 1$ où la constante de dissociation K_d est de 0,433 μM , et R la valeur de fluorescence pour chaque point. La conversion est effectuée avec le logiciel Felix et l'analyse effectuée sur Clampfit 10.2. Plusieurs paramètres peuvent être obtenus lors de ces analyses sur le transitoire calcique : l'amplitude, qui correspond à la quantité de Ca^{2+} relâchée lors de la contraction, le TTP : le temps nécessaire pour atteindre l'amplitude maximale et la concentration de Ca^{2+} diastolique, le Tau : un indice de la pente de la déclinaison du Ca^{2+} intracellulaire et le temps pour atteindre 50 % et 90 % de déclinaison de Ca^{2+} intracellulaire (Figure 2.6). Le transitoire calcique induit par la caféine (10 mM) permet de mesurer l'amplitude du transitoire calcique induit par la caféine équivalent au contenu en Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. La sortie du Ca^{2+} intracellulaire est évaluée par les temps pour atteindre 50 % et 90 % de déclinaison ainsi que le Tau : un indice de la pente de déclinaison de Ca^{2+} intracellulaire. Le Tau, les temps pour atteindre 50 % et 90 % de déclinaison dans les deux types de transitoires permettent d'estimer l'activité de SERCA2 et NCX.

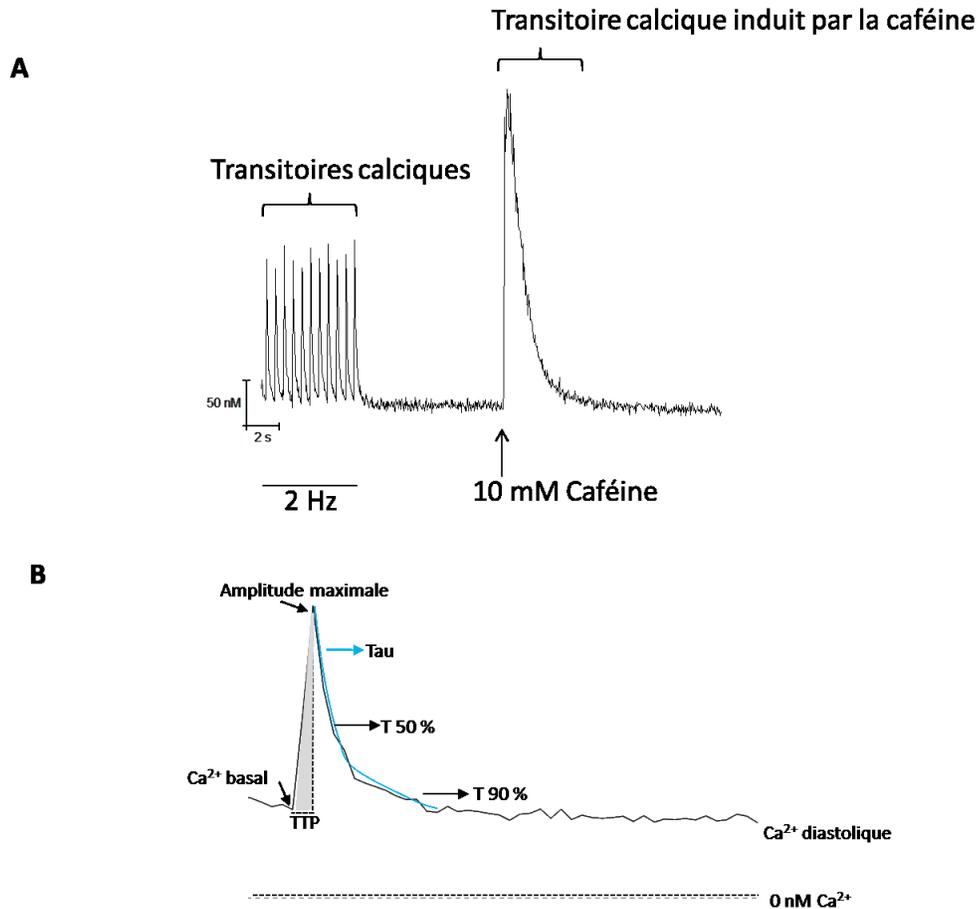


Figure 2.6. Représentation d'un enregistrement de transitoires calciques. A. Un exemple de tracé obtenu sur un cardiomyocyte ventriculaire isolé de souris C57Bl/6. De gauche à droite, des transitoires calciques enregistrés en présence d'une stimulation à 2 Hz suivi de l'arrêt de la stimulation afin de mesurer la concentration de Ca²⁺ diastolique puis le transitoire calcique induit par la caféine représentant la quantité de Ca²⁺ présente au réticulum sarcoplasmique. **B.** Le dernier transitoire calcique enregistré avant l'arrêt de la stimulation a été agrandi. Les divers paramètres étudiés sont identifiés, le transitoire calcique découle de la différence entre le Ca²⁺ basal et l'amplitude maximale, le TTP est le temps pour atteindre l'amplitude maximale, le T 50 % correspond au temps pour atteindre 50 % de déclinaison, le T 90 % concorde avec le temps pour atteindre 90 % de déclinaison et le Ca²⁺ diastolique est la concentration de Ca²⁺ présent dans la cellule en diastole.

Un autre paramètre est le « *fractional release* » correspondant au ratio entre la concentration de Ca^{2+} libérée lors du transitoire calcique régulier par rapport à celle du transitoire calcique induit par la caféine ce qui démontre l'efficacité du CICR par rapport au contenu du réticulum sarcoplasmique.

2.7 Étincelle calcique

La libération de Ca^{2+} spontanée du réticulum sarcoplasmique via le récepteur à la ryanodine lors de la diastole est quantifiée par la technique d'étincelle calcique (Ca^{2+} sparks). C'est un indice de la sensibilité d'ouverture du récepteur à la ryanodine. Si plusieurs récepteurs à la ryanodine s'activent en même temps, la création d'une vague calcique (Ca^{2+} wave) peut être engagée. En IC, ce phénomène a été répertorié²⁴⁶⁻²⁴⁸. Pour mesurer la fréquence et les paramètres des étincelles calciques, les cellules ventriculaires sont incubées 20 minutes dans 10 μ M de Fluo-4AM avec 0,05 % d'acide pluronique. Les cellules sont ensuite perfusées 10 minutes afin de procéder à la déestérification. L'expérience est conduite à 35 ± 1 °C et la solution de Tyrode-Hepes + 1 mM $CaCl_2$ est utilisée. Les expériences ont été réalisées en mode de « *scan* » linéaire.

L'analyse est réalisée grâce à Image J et au plug-in sparkmaster selon le protocole publié par Picht *et al.*²⁴⁹. La fréquence des étincelles calciques ainsi que leurs caractéristiques comme la durée, le temps pour atteindre l'amplitude maximale, l'amplitude (F/F_0), le tau peuvent être obtenues. L'exclusion de données est nécessaire puisque le programme présente quelques biais, ainsi les événements correspondants à des doublets ou situés à la limite de la cellule et les faux positifs (pas d'événements) sont éliminés de l'analyse des paramètres.

2.8 Réaction de polymérase en chaîne en temps réel

La quantification d'ARNm en raison de sa rapide dégradation et de sa faible quantité n'est pas possible. C'est pourquoi les techniques de transcription inverse et de polymérase en chaîne (PCR) en temps réel ont été développées. En effet, elles permettent de transformer l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc)

puis de l'amplifier afin de distinguer des variations dans l'expression du gène d'intérêt. Ci-dessous est décrite la procédure utilisée au laboratoire ¹⁵¹. Premièrement, l'ARNm est extraite, dosée puis son intégrité vérifiée. Ensuite, l'ARNm grâce à une enzyme de transcriptase inverse va être convertie en ADNc; des amorces non spécifiques ont été utilisées. L'ADNc est utilisée pour la réaction PCR quantitative (qPCR) avec le kit SYBR®green. L'ADNc est mélangée avec la polymérase, le tampon, des nucléotides et des amorces sens et anti-sens spécifiques au gène étudié ainsi qu'avec un colorant normalisant ROX. Ce mélange permet l'amplification des transcrits d'intérêt selon le principe en chaîne par polymérase inventé par Kary Mullis ²⁵⁰. Les brins sont hybridés, synthétisés puis dénaturés; ces trois étapes sont répétées une trentaine de fois afin d'amplifier suffisamment la région d'intérêt. La quantification est possible puisqu'à chaque cycle d'amplification le nombre de brins (B) double et donc suit la formule suivante où n correspond au nombre de cycles : $B = 2^n$. L'analyse permet ensuite de déterminer l'intervalle de cycles nécessaires pour chaque échantillon afin de parvenir au seuil de détection fixé à partir de la pente logarithmique des courbes d'amplification ²⁵¹. Par la suite, ces moyennes logarithmiques sont normalisées par celles d'au moins deux gènes de référence comme la cyclophiline et le 18S. L'uniformité est assurée par la normalisation des données par la valeur d'un calibrateur présent dans toutes les plaques. Les résultats obtenus démontrent donc les différents niveaux d'expression relatifs à chaque échantillon.

2.9 Immunobuvardage de type Western

Premièrement, l'extraction de protéines a été réalisée. Les protocoles qui permettent d'obtenir diverses fractions cellulaires ont été établis antérieurement au laboratoire ²⁵². Au départ, les ventricules entiers sont lysés dans un tampon d'extraction (TE) contenant les inhibiteurs de protéases (+IP) appropriés pour la protéine d'intérêt (Table 2). La première centrifugation à 10 000 rpm permet d'enlever les débris cellulaires, le surnageant équivaut donc au lysat total. Ce lysat total est ensuite ultracentrifugé à 69 000 rpm, le surnageant correspond aux

protéines cytosoliques. Le culot peut servir à extraire deux types de protéines. D'une part, il peut être dissout et incubé avec du triton 1X ajouté au TE+IP afin de solubiliser les protéines membranaires totales qui seront récoltées dans le surnageant après une autre ultracentrifugation. D'autre part, il peut être dissout et incubé dans 6 mM de KCl afin de précipiter les protéines associées aux myofilaments. Lors de la centrifugation suivante, le culot sera donc enrichi à ~70 % par des protéines sarcolemmales. Cette préparation permet de corrélérer l'expression des canaux à la membrane sarcolemmale avec ceux participant au courant mesuré dans les myocytes isolés ²⁵². Ensuite, trois cycles de lavages au TE+IP sont nécessaires afin de réduire les sels, particulièrement pour les protéines de haut poids moléculaire.

La concentration protéique de chaque échantillon est ensuite déterminée grâce à une quantification de type Bradford. Les échantillons à comparer sont par la suite placés sur un gel préfabriqué avec un gradient de 4-15 % Tris-Glycine facilitant la visualisation de grosses et de petites protéines. La migration est réalisée à 4 °C dans un tampon (en mM : 25 Tris, 1% SDS, 192 Glycine) jusqu'à obtenir une séparation adéquate des bandes du marqueur moléculaire. Le tampon de transfert (en mM : 191 Glycine, 25 Tris, 0,005 % SDS) été adapté puisque pour une meilleure mobilisation des grosses protéines, le méthanol doit être enlevé et 0,005 % de SDS ajouté. Après le transfert sur membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF), il est cependant nécessaire de procéder à une étape de fixation où la membrane est incubée 30 minutes dans une solution 70 % méthanol, 29 % acide acétique et 1 % glycérol. À la suite d'un rinçage au TBST 1X (en mM : 25 Tris, 136,5 NaCl, 2.7 KCl, pH 7,4 avec NaOH), la membrane est incubée avec une solution TBST 1X et 5 % lait afin de prévenir le marquage non-spécifique en bloquant la membrane avec la caséine. La période de blocage de la membrane pour les protéines de grandes tailles moléculaires (Na_v , $Ca_v1.2$ et RyR2) a été prolongée jusqu'à trois heures afin de réduire le signal de fond. Par après, les membranes ont été incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire, selon la dilution déterminée au préalable. L'incubation avec l'anticorps secondaire lié à la

peroxydase de raifort selon la concentration déterminée a ensuite été effectuée. La durée des périodes de lavage ont été augmentée à 15 minutes pour les protéines de haut poids moléculaire en comparaison à 10 minutes pour les autres protéines. La révélation a été faite avec un substrat chemiluminescent pour la détection de l'activité de la peroxydase au raifort (ECL). L'intensité du signal obtenu sera proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

Table 2. Liste des inhibiteurs de protéases utilisées lors des extractions de protéines. La concentration à laquelle chacun des inhibiteurs a été dilué et leur fonction est décrite.

	[] finale	Fonction
Tris	20 mM	Tampon
EGTA (Acide éthylène glycol tétraacétique)	5 mM	Prévenir la déphosphorylation des résidus sérine-thréonine
EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique)	5 mM	Prévenir la déphosphorylation des résidus sérine-thréonine
Benzamidine	10 mM	Inhibiteur de la trypsine, des enzymes de type « trypsine » et des sérines protéases
Leupeptide	25 mg/ml	Inhibiteur de protéase dont les cystéines, les sérines et les thréonines peptidases

PMSF (phénylméthanesulfonylfluoride)	0,5 M	Inhibiteur des sérines peptidases
Pepstatine A	1 ug/ml	Inhibiteur d'aspartyl protéase
Aprotinine	10 ug/ml	Inhibiteur de la trypsine pancréatique
NaF (Fluorure de sodium)	20 mM	Prévenir la déphosphorylation des résidus sérine-thréonine
NaVO₄ (Orthovanadate de sodium)	0,2 mM	Prévenir la déphosphorylation des résidus tyrosine
β-glycérophosphate	20 mM	Prévenir la déphosphorylation des résidus sérine-thréonine
DTT (Dithiothreitol)	5x10 ⁻³ mM	Agent réducteur puissant et inhibiteur des ponts disulfides afin d'éviter les liaisons intra et inter protéines
AEBSF (4- benzénésulfonylhydrochloride fluoride)	0,5 mM	Inhibiteur des sérines protéases comme la chymotrypsine, la kallikréine, la plasmine, la thrombine et la trypsine

2.10 Analyse statistique

Tous les résultats sont présentés ainsi : valeur moyenne \pm écart-type de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel OriginPro 8 ainsi qu'avec l'aide du personnel du Centre de Coordination des Essais Cliniques de Montréal (MHICC). Les tests statistiques ont été déterminés en fonction des groupes à comparer. L'ANOVA à deux niveaux d'interactions a été réalisée suivie de l'analyse post hoc de Tuckey ou de Fisher LSD afin de comparer les sous-groupes deux à deux. Le test de type T (Student) a aussi été exécuté. Le test de Chi-carré a été utilisé pour évaluer la mortalité et un modèle mixé logit multiniveau a été utilisé pour événements spontanés calciques. Une différence significative a été attribuée lorsque $p < 0,05$.

3. Article 1

Reduction in Na⁺ Current by Angiotensin II is Mediated by PKC α in Mouse and Human Cardiomyocytes

Sophie Mathieu, Nabil El Khoury, Katy Rivard, Pierre Paradis, Mona Nemer & Céline Fiset

Heart Rhythm (accepté)

Contribution des auteurs

Sophie Mathieu : Stratégie expérimentale, expérimentation, analyse, rédaction, conceptualisation, discussion

Nabil El Khoury : Expérimentation de patch-clamp, culture cellulaire, rédaction, discussion scientifique

Katy Rivard : Expérimentation de current-clamp

Pierre Paradis : Collaborateur, création du modèle de souris AT1R, conseils, lecture et commentaires de l'article

Mona Nemer : Collaborateur, création du modèle de souris AT1R

Céline Fiset : Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale

3.1 Avant propos

Cette première étude a été réalisée chez les souris AT1R mâles avant (50 jours) et après (6 mois) le développement d'hypertrophie afin de connaître son effet sur le remodelage électrique ventriculaire, plus particulièrement au niveau de la conduction et du courant Na^+ .

Il a été démontré que les IECA sont efficaces dans l'amélioration de la survie et de l'état du patient souffrant d'IC. Ainsi, la réduction des niveaux d'ANGII par les IECA est associée à des effets bénéfiques comme une réduction de l'hypertrophie cardiaque, une réponse qui est bien connue. Cependant, le rôle de l'ANGII dans le remodelage électrique n'a pas été autant exploré et demeure mécompris. Le but de cette étude est de mieux discerner le rôle direct de l'ANGII dans le remodelage électrique principalement la conduction ventriculaire en utilisant le modèle de souris AT1R. Avec le temps, ce modèle développe de l'hypertrophie ce qui permet d'établir si l'hypertrophie entraîne des modifications supplémentaires sur les courants. Dans le cadre de cette étude, la régulation de la conduction ventriculaire par la stimulation chronique de l'ANGII a été examinée. Diverses méthodologies telles que l'ECG, le patch-clamp, le qPCR et l'immunobuvardage de type Western ont été utilisées afin d'approfondir et de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents à cette relation.

RÉSUMÉ

Contextualisation- Les arythmies ventriculaires sont associées à la mort subite cardiaque et représentent l'une des principales causes de mortalité chez les patients souffrant d'IC. Toutefois, les mécanismes responsables de cette mortalité sont encore mécompris. Une élévation chronique de la concentration d'angiotensine II (ANGII) contribue grandement au développement d'IC. Par conséquent, cette étude a examiné par l'entremise d'un modèle de souris transgénique surexprimant au niveau des cardiomyocytes le récepteur de type 1 de l'ANGII (AT1R) le rôle pathologique de l'ANGII dans la conduction ventriculaire et le courant Na^+ . Les souris AT1R n'exhibent pas de remodelage structurel à 50 jours, mais présentent une importante hypertrophie cardiaque à 6 mois. **Méthodes & Résultats-** L'analyse des tracés d'ECG de surface a montré que les souris présentent une prolongation similaire de la durée du QRS en présence ou en absence d'hypertrophie. Des expériences de patch-clamp en mode courant imposé ont démontré que chez les myocytes ventriculaires des souris AT1R, la vitesse de dépolarisation maximale du potentiel d'action est ralentie. Ce ralentissement de la conduction a été attribué à une réduction du courant Na^+ de 60%. Un médiateur en aval de l'activation de AT1R est la protéine kinase C (PKC) dont l'activité a été mesurée par immunobuvardages de type Western. La translocation de divers isoformes dans la fraction enrichie en protéines sarcolemmales a été vérifiée et seulement l'expression de la PKC α était augmentée chez les souris AT1R pour les deux âges. La contribution de la PKC α dans la régulation du courant Na^+ a été étudiée dans les cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines. Ces cellules ont été traitées à l'ANGII (100nmol/L x 48H) ce qui a engendré une diminution de la densité du courant Na^+ . Lorsqu'elles étaient traitées à la fois avec l'ANGII et le peptide inhibiteur de la translocation de la PKC α , $\alpha\text{V5-3}$, l'effet de l'ANGII était bloqué. **Conclusion-** Cette étude suggère que dans les cardiomyocytes de souris et humains, la PKC α est un médiateur important de la réduction du courant Na^+ associée à l'ANGII et pourrait participer à la genèse d'arythmies ventriculaires.

Mots-clés : hiPSC-CM, récepteur AT1, arythmie, hypertrophie cardiaque, conduction ventriculaire

ABSTRACT

Background-Ventricular arrhythmias and sudden cardiac deaths are among the leading causes of mortality in heart failure patients and their underlying mechanisms remain incompletely understood. Chronic elevation of angiotensin II (ANGII) is known to be one of the main contributors in heart failure development. **Objective-**Accordingly, in this study we tested whether ANGIO can alter ventricular conduction and Na⁺ current properties using transgenic mice with cardiomyocyte restricted overexpression of type 1 ANGIO receptor (AT1R). AT1R mice aged 50 days show no signs of cardiac hypertrophy however, it is clearly present at 6 months. **Methods and Results-**Surface ECG showed a prolonged QRS complex duration in AT1R mice independently of hypertrophy. Current-clamp experiments on isolated ventricular myocytes showed slower maximal velocity of action potential upstroke in AT1R mice suggesting slowed ventricular conduction attributable to a 60% reduction in Na⁺ current. Activation of protein kinase C (PKC), a known downstream mediator of AT1R, was assayed by measuring translocation of various PKC isozymes. Western blots demonstrated a selective increase in sarcolemmal PKC α in AT1R mice at both ages. The involvement of PKC α in regulating Na⁺ current was subsequently studied in human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes. In these cells, ANGIO treatment (100 nmol/L x 48 h) reduced Na⁺ current density while concomitant treatment with α V5-3, a PKC α translocation inhibitor peptide, blocked the effect of ANGIO. **Conclusion-**Overall, this study suggests that in mouse and human cardiomyocytes PKC α is an important mediator of the ANGIO-induced reduction in Na⁺ current density and may contribute to ventricular arrhythmias.

Key words: hiPSC-CM, AT1 receptor, cardiac hypertrophy, arrhythmia, ventricular conduction

Glossary of Abbreviations

50d	50 days
6m	6 months
ANGII	Angiotensin II
APA	Action potential amplitude
ARA	AT1R antagonists
AT1R	Angiotensin II type 1 receptor
ECG	Electrocardiogram
HF	Heart failure
hiPSC-CM	Human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes
I_{Na}	Sodium current
PKC	Protein kinase C
RAS	Renin-angiotensin system
SCD	Sudden cardiac death
SCN5A	Sodium channel, voltage-gated, type 5, alpha subunit
V_{max}	Maximal velocity of the action potential upstroke

INTRODUCTION

Proper electrical activity of the heart relies on a finely regulated and synchronized activity of various ion channels. Alteration in the function of these ion channels may be detrimental to cardiac function by increasing the risk of arrhythmias. In particular, ventricular arrhythmias represent some of the most life-threatening electrical disturbances and may lead to sudden cardiac death (SCD) ¹. Out of hospital, SCD has a minor chance of survival and it accounts for at least 50% of all cardiac deaths representing 15-20% of all deaths ¹.

The sodium current (I_{Na}) plays a critical role in action potential (AP) depolarization and conduction of the electrical impulse within the heart and alteration in Na^+ channels function can favor the triggering of ventricular arrhythmias associated with SCD ². Indeed, a prolonged ventricular depolarization time associated with widening of QRS complex has also been associated with SCD ³. The pore forming α -subunit of the Na^+ channel, $Nav1.5$, is encoded by the *SCN5A* gene and many genetic mutations in $Nav1.5$ or in its interacting proteins have been shown to modulate channel function ⁴. Indeed, $Nav1.5$ has been shown to interact with β -subunits, Ca^{2+} calmodulin-dependant protein kinase II (CaMKII), syntrophins, protein kinase C (PKC) and several other partners under physiological or pathological stimuli ⁵. While genetic mutations in the α -subunit and interacting partners have been associated with several disorders such as LQT3 syndrome, Brugada, sudden infant death syndrome (SIDS), dilated cardiomyopathy and conduction defects among others, the mechanisms by which I_{Na} and $Nav1.5$ can be regulated in the context of cardiovascular diseases remain incompletely understood.

One hallmark of cardiovascular disease is chronic activation of the renin-angiotensin system (RAS). RAS activation has been previously associated with development of hypertension, hypertrophy and heart failure (HF) and these

diseases have been linked to arrhythmias in both animal models and humans⁶⁻⁹. A key effector of the RAS pathway is angiotensin II (ANGII) and most of its known cardiac adverse effects are mediated by the ANGI type 1 receptor (AT1R)¹⁰. Despite the existence of drugs aimed at controlling the deleterious effects of RAS, cardiovascular diseases remain the leading causes of mortality in Western societies¹¹. This suggests that the actual treatments are not optimal yet and that the adverse effects of chronic elevation of ANGI levels remain incompletely understood. Accordingly, the objective of our study was to elucidate how the ANGI/AT1R pathway induces electrical remodeling and affects critical ionic currents, notably the Nav1.5 encoded I_{Na} , by using a transgenic mouse model with cardiomyocyte restricted overexpression of the human AT1R (*AGTRI*)¹². These mice progressively develop hypertrophy and structural changes after 50 days of age without any change in blood pressure^{6, 12, 13}. Therefore, we used these mice at two different ages in order to discriminate the direct effects of AT1R signaling (50-day, 50d) from the effects of hypertrophy (6-month, 6m) on the Na⁺ channel function. Furthermore, we performed additional experiments using human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) to provide mechanistic insight in a human cardiomyocyte model while complementing animal data.

MATERIAL AND METHODS

A detailed description of the following methods can be found in the online data supplement.

Animals

All experiments were performed on heterozygous male C57BL/6 AT1R mice of either 50±5 days old (50d; no hypertrophy) or 6-8 months old (6m; presence of hypertrophy) and their age-matched wild-type littermate male controls (CTL). Animal protocols were conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The Montreal Heart Institute Animal Care Committee has also approved the animal procedures of this study (reference number 2014-08-01).

Ventricular mouse myocyte isolation

Ventricular myocytes were isolated as previously described¹⁴ using a modified Langendorff perfusion system. Single myocytes were isolated from the right ventricular free wall after enzymatic dissociation using Worthington collagenase type 2 (73.7 U/ml).

Surface electrocardiogram (ECG)

Lead I surface ECGs were recorded in anaesthetized (2% isoflurane) mice for 5 minutes at a rate of 2 kHz after baseline period as previously described¹⁴.

hiPSC-CM

The Cor.4U® human cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem (hiPSC-CM) cells were kindly provided by Axiogenesis AG and prepared according to the manufacturer's instructions (Cologne, Germany). Cells were exposed to a 48-hour treatment with 100 nmol/L ANGII without or with 15

$\mu\text{mol/L}$ $\alpha\text{V5-3}$, a PKC α translocation inhibitor peptide with a cell-permeable N-terminal tag ¹⁵.

Cellular electrophysiology

All experiments were carried out at room temperature (20–22°C). The whole-cell voltage- and current-clamp recording methods, data acquisition, voltage-clamp protocols, and analysis methods have been described previously ¹⁶.

Quantitative polymerase-chain-reaction (qPCR)

qPCR for the α -subunit of Nav1.5 was performed on ventricular mRNA as previously published ¹⁶. Briefly, was isolated (RNeasy Fibrous Tissue kit, Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and cDNA was synthesized with SuperScriptIII first-strand (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). qPCR (SYBR Green qPCR Supermix, Life Technologies) was performed with specific primers for Nav1.5. mRNA expression was normalized by the geometric mean of two housekeeping genes cyclophyllin and Lamin C.

Western blots

The protocols used for isolation of sarcolemmal-enriched protein and Western blot analysis have been previously described ^{6, 17}. In brief, proteins were isolated from mouse ventricles, separated by electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal primary antibodies directed against Nav1.5 (Nav1.5 1:250, Alomone) and PKC isoforms (PKC α 1:2000, Cell Signaling; PKC β_1 1:1000, Santa Cruz; PKC β_{II} 1:1000, Santa Cruz; PKC δ 1:5000; PKC ϵ 1:2000, Cell Signaling). Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein loading and transfer. Bands were quantified by densitometry analysis using the Versadoc imaging system and Quantity One software (Bio-Rad, CA, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Unpaired Student t-test and analysis of variance (ANOVA) with a Fisher's post-hoc test were used when appropriate. Statistical analysis was performed by Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA). The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

QRS complex is prolonged in AT1R mice

Surface ECG recordings were obtained on anesthetized CTL and AT1R mice of 50d and 6m. Figure 1 shows that the QRS complex was prolonged in AT1R mice of both age groups in comparison with their respective CTL. Moreover, the prolongation of the QRS complex was comparable between 6m AT1R mice and the 50d mice, indicating that the change in QRS is due to overexpression of the AT1R receptor and not secondary to cardiac hypertrophy.

Ventricular action potential configuration is modified in AT1R myocytes

Current-clamp experiments were performed on freshly isolated ventricular myocytes from CTL and AT1R mice of both age groups. Data reported in Table 1 shows that the action potential amplitude (APA) and the resting membrane potential were similar in CTL and AT1R myocytes, however the maximal velocity of the action potential upstroke (V_{max}) was reduced in AT1R mice of both ages suggesting that the alteration in ventricular conduction velocity is independent of hypertrophy.

I_{Na} density is decreased in AT1R mice

I_{Na} was measured using voltage-clamp techniques on freshly isolated ventricular myocytes from 50d and 6m CTL and AT1R mice. Representative I_{Na} normalized to cell capacitance are shown in Figure 2A. I_{Na} current-voltage relationships display mean data obtained for each group and I_{Na} density was decreased by 60% in 50d and 6m AT1R mice (Figure 2B). Cell capacitance was unchanged in 50d AT1R (CTL: 141.5 ± 8.5 pF, $n=26$; AT1R: 140.4 ± 7.7 pF, $n=23$, $p=NS$) but increased in 6m AT1R (CTL: 155.3 ± 12.5 pF, $n=13$; AT1R: $207.2 \pm 10.2^*$ pF $n=16$, $*p<0.05$), indicating the presence of cellular hypertrophy. Together the results presented thus far indicate that a reduction of I_{Na} density independently of cardiac hypertrophy is consistent with slower ventricular conduction in mice with AT1R overexpression.

Ventricular Na⁺ channel expression is only decreased with hypertrophy

Using qPCR, we compared the mRNA expression of the cardiac Na⁺ channel, Na_v1.5, in ventricular tissues from CTL and AT1R mice of both ages. Figure 3A and 3B show that Na_v1.5 transcripts were only reduced in AT1R 6m mice indicating that hypertrophy reduces mRNA expression of the Na_v1.5 compared to 50d. Consistent with these results, Western blot analysis on sarcolemmal-enriched protein fraction showed that Na_v1.5 protein expression was unchanged in 50d AT1R mice whereas it was decreased in the 6m AT1R mice compared to age-matched CTL (Figure 3C and 3D). These results suggest that I_{Na} is similarly reduced in AT1R mice of both ages, however with the appearance of hypertrophy, Na_v1.5 expression is affected but yields no further effect on current density.

PKC α is involved in the reduction of I_{Na} caused by angiotensin II

AT1R signaling cascades involve, among many mediators, activation of PKC 10, 18. In addition, previous studies have demonstrated that Na_v1.5 can be modulated by PKC 19-21. Thus, we hypothesized that AT1R stimulation induces PKC activation and affects I_{Na}. Accordingly, using CTL ventricular myocytes, we tested if PKC activation by the non-selective PKC activator, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) could affect I_{Na}. Data reported in Figure 4A shows that PMA decreases I_{Na} density, supporting the notion that PKC activation could be potentially implicated in the reduction of I_{Na} in AT1R mice. Therefore, PKC activity was evaluated in AT1R mice. Since PKC activation requires translocation of the various PKC isozymes to the membrane and binding to their specific receptor for activated C-kinase (RACK) protein 22, the sarcolemmal expression of various PKC isoforms were examined as a measure of PKC activation. Western blot analysis of PKC α , β I, β II, δ and ϵ isoforms were performed on 50d and 6m, CTL and AT1R mice (Figure 5). Data shows that the sarcolemmal PKC α levels were increased in AT1R mice at both ages whereas none of the other PKC isoforms translocated. To establish the involvement of PKC α in the ANGII-induced I_{Na} reduction, hiPSC-CM were used. Figure 6 shows that treatment with

ANGII (100 nM) for 48 h produced a reduction in INa density in hiPSC-CM as observed in ventricular myocytes from AT1R mice. To determine the role of PKC α in this reduction, cells were incubated concomitantly with ANGII and α V5-3, a selective PKC α translocation inhibitor. Data on Figure 6 shows that α V5-3 was able to prevent the reduction in INa induced by ANGII thereby implicating PKC α in this regulation. Furthermore, this finding also demonstrated that, similarly to the AT1R mice, a chronic pathophysiologically relevant concentration of ANGII affects INa in hiPSC-CM thereby validating the AT1R mouse in a human cardiomyocyte model.

DISCUSSION

In order to determine how ANGII contributes to detrimental cardiac electrical remodeling, we used mice with cardiac specific AT1R overexpression. Our *in vivo* data shows that AT1R overexpression causes a widening of the QRS complex. This observation was correlated with a slower V_{\max} attributable to a 60% reduction in the density of the ventricular I_{Na} . Interestingly, we found that I_{Na} was reduced similarly at 50d and 6m suggesting that the observed electrical remodeling is independent of hypertrophy and attributable to direct AT1R stimulation. This reduction in I_{Na} could not be explained by a transcriptional regulation of its corresponding Na^+ channel $\text{Nav}1.5$ as opposed to what was previously observed in these mice for Ca^{2+} and K^+ currents^{6, 13}. However, we were able to show an increase in PKC α translocation, suggesting greater activation of PKC α that was evident at 50d and maintained at 6m. The involvement of PKC α in the regulation of I_{Na} was subsequently demonstrated in hiPSC-CM exposed to a pathophysiological concentration of ANGII (100 nmol/L). In hiPSC-CM, ANGII caused a reduction in the density of I_{Na} , similarly to AT1R mice and the addition a PKC α translocation inhibitor prevented the effects of ANGII on I_{Na} . Our data in hiPSC-CM therefore, provides results that are applicable to human cardiac physiology in addition to validating the relevance of our mouse model to study the role of ANGII in modulating the cardiac I_{Na} .

Electrical disturbances associated with ANGII

AT1R mice provide one way of studying the effects of the ANGII/AT1R cascade in heart disease; however, in order to gain further insight into the role of RAS pathway activation in cardiac hypertrophy and electrical remodeling accompanying HF, several mouse models have been created including a transgenic mouse with cardiac specific overexpression of the angiotensin-converting-enzyme (ACE8/8)^{9, 23}. Nevertheless, unlike the AT1R, it was shown that ACE8/8 mice developed decreased systolic pressure, no ventricular hypertrophy, neither differences in QRS duration nor I_{Na} alterations^{9, 23}. Possible reasons for these

phenotypic differences might be a lower direct cardiac AT1R stimulation occurring in the ACE8/8 because a local increase in ACE and ANGII production could cause a downregulation of the AT1R. Furthermore, feedback from hemodynamic alterations could also affect differently the heart.

In regards to cellular models used to understand the effects of ANGII, it was shown that in H9C2 cells treated with ANGII (100nM) for 48 h that I_{Na} was reduced through downregulation of SCN5A mRNA expression²⁴. More recent studies on hiPSC-CM and hESC-CM have shown that ANGII was responsible for a decrease in I_{Na} that was caused by an alternative splicing mechanism of the SCN5A^{25, 26}. However the implication of hypertrophy and PKC α was not determined in these studies. Here, we show that hypertrophy plays a major role in regulating mRNA expression of Na_v1.5 since conversely to 50d AT1R; 6m AT1R mice exhibited decreased Na_v1.5 mRNA expression levels in comparison to CTL. Nevertheless, this reduction in Na⁺ channel expression did not further decrease the current density. PKC α on the other hand, appeared to be activated early on following AT1R stimulation and remained active throughout the development of hypertrophy suggesting it might have a key regulator role of I_{Na} . Overall, only a few studies have examined the mechanisms underlying the ANGII modulation of I_{Na} and, to our knowledge, none have discriminated between direct effects of AT1R versus the alterations that occur secondary to AT1R-induced hypertrophy. By discerning these two phenotypes, we were able to demonstrate using transgenic approach and human iPSC-CM that AT1R stimulation reduces I_{Na} independently of hypertrophy through sustained PKC α activation therefore providing new insight on the regulation of cardiac arrhythmias associated with ANGII.

Protein Kinase C signaling downstream of AT1R

AT1R signaling has been associated with activation of multiple PKC isozymes. Previously, it was shown that membrane translation of PKC ϵ was increased in AT1R overexpressing mice, but when the AT1R receptor lacked the G $_{\alpha q}$ /G $_{\alpha i}$ underlying subunits, the translocation disappeared suggesting that PKC ϵ was associated with direct AT1R signaling and G $_q$ activation⁸. However, in that study

it was not tested whether other isoforms of PKC were modulated. In our hands, PKC ϵ was not affected by AT1R overexpression. Furthermore, in our study, we probed for various PKC isoforms in sarcolemma-enriched and not particulate fractions therefore avoiding multiple subcellular membranes. We only found a stable and increase in PKC α translocation suggesting it may have an important role in modulating sarcolemma-bound targets such as ion channels, including Nav1.5.

It has previously been shown that the activation of PKC plays an important role in heart disease²⁷. Indeed, it was suggested by several authors that each PKC isoform might have a distinct role under specific pathological stimuli^{27, 28}. For example, many associations have been reported between PKC α and the development of cardiac hypertrophy²⁹⁻³². Furthermore, PKC α/ϵ are activated in pressure overload-induced HF in rats and the treatment with an ACE inhibitor reduces PKC activation³³. Another study showed PKC β was increased with hypertension-induced HF and that AT1R blockade could reverse this activation³⁴. In our model, hypertrophy but not hypertension is present suggesting in accordance with other studies that PKC α acts as a hypertrophy-related isoform while PKC ϵ and β activation seem to be following hypertension or increase in pressure overload. Interestingly, PKC α , PKC β , PKC ϵ and PKC δ translocation to the particulate fraction were increased in human hearts with dilated cardiomyopathy. Indeed, in human HF where several pathological stimuli are likely to be present at once, an increased activation of various PKC isoforms is therefore not surprising, whereas in animal models, HF is often induced through one particular stimulus.

Nav1.5-PKC interaction

Interactions between PKC and Nav1.5 have been previously demonstrated²⁰. However, the role of each PKC isoforms in the regulation of Nav1.5 requires further elucidation. For instance, in chromaffin and HEK cells, the activation of the conventional PKCs decreases I_{Na} by promoting channel internalization^{19, 35}. In HEK cells, this internalization was blunted by reactive oxygen species (ROS)

inhibition using apocyanin. Thus, it is likely that the I_{Na} reduction observed in our study could be the consequence of PKC α mediated channel internalization. While PKC α activation could also cause a decrease channel open probability, it remains to be elucidated which of these mechanisms is at play.

In conclusion, this study shows that chronic AT1R activation in mice leads to decreased I_{Na} density consistent with QRS prolongation and reduced ventricular conduction. These changes occur independently of cardiac hypertrophy suggesting a direct role for ANGII/AT1R in inducing electrical remodeling. The reduction in I_{Na} appeared to implicate PKC α activation and inhibition of its translocation restored I_{Na} density suggesting a potential interaction with Nav1.5. Of note, these findings were shown in hiPSC-CM which allowed us to extend the mechanism of ANGII regulation of I_{Na} to a human cardiomyocyte context. Our findings provide mechanistic insights on the role of ANGII-PKC α in ventricular arrhythmia associated with cardiovascular diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thanks N. Ethier and M.A. Gillis for excellent technical assistance; Drs. J. Rioux, P. Goyette and R. Gélinas for their help with the hiPSC-CM; Axiogenesis for providing Cor.4U® human cardiomyocytes and Dr. S. Nattel and Dr. A. Tadevosyan for producing ANGII.

FOOTNOTES

This work was supported by operating grants to C. Fiset from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR-MOP-89934) and Quebec Heart and Stroke Foundation. S. Mathieu was a recipient of a PhD studentship from the Montreal Heart Institute and N. El Khoury held a PhD studentship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS).

DISCLOSURES

None

Table 1. Action potential parameters related to Na⁺ current in ventricular myocytes from control and AT1R mice in absence (50d) or presence (6m) of hypertrophy.

	50d		6m	
	CTL	AT1R	CTL	AT1R
APA (mV)	129.5±1.6 (19)	123.4±2.0 (21)	129.9±4.0 (12)	119.8±3.8 (15)
V_{max} (mV/ms)	107.7±4.2 (19)	76.1±4.3* (21)	110.7±5.9 (12)	71.7±5.6* (15)
RMP (mV)	-76.0±0.5 (25)	-76.1±0.6 (25)	-77.1±0.5 (18)	-76.0±0.7 (16)

Action potential amplitude (APA), Maximal velocity of the action potential upstroke (V_{max}), Resting membrane potential (RMP). Numbers of cells are shown in parenthesis (*p<0.05 versus age-matched CTL).

References

1. Goldberger JJ, Basu A, Boineau R, et al. Risk Stratification for Sudden Cardiac Death: A Plan for the Future. *Circulation* 2014;129:516-526.
2. Antzelevitch C. Brugada Syndrome. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 2006;29:1130-1159.
3. Amiya E, Tanabe K, Ikari Y, Nakajima Y, Hara K. Prolonged QRS Duration and Severity of Mitral Regurgitation are Unfavorable Prognostic Markers of Heart Failure in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Journal* 2006;70:57-62.
4. Wilde AAM, Brugada R. Phenotypical Manifestations of Mutations in the Genes Encoding Subunits of the Cardiac Sodium Channel. *Circulation Research* 2011;108:884-897.
5. Marionneau C, Abriel H. Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2015;82:36-47.
6. Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovascular Research* 2008;78:53-62.
7. Huggins CE, Domenighetti AA, Pedrazzini T, Pepe S, Delbridge LM. Elevated intracardiac angiotensin II leads to cardiac hypertrophy and mechanical dysfunction in normotensive mice. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* September 1, 2003 2003;4:186-190.
8. Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, et al. Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking Gαq/Gαi coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:3045-3056.
9. Kasi VS, Xiao HD, Shang LL, Iravanian S, Langberg J, Witham EA, Jiao Z, Gallego CJ, Bernstein KE, Dudley SC. Cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme overexpression causes conduction defects and connexin dysregulation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H182-H192.
10. Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cellular Signalling* 2014;26:2147-2160.
11. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BMW. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *The Lancet*;369:1208-1219.
12. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FoW, Thibault Gt, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:931-936.

13. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2011;301:H2018-H2027.
14. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-Based Differences in Cardiac Repolarization in Mouse Ventricle. *Circulation Research* August 31, 2001 2001;89:437-444.
15. Kim J, Thorne SH, Sun L, Huang B, Mochly-Rosen D. Sustained inhibition of PKC[alpha] reduces intravasation and lung seeding during mammary tumor metastasis in an in vivo mouse model. *Oncogene* 01/20/print 2011;30:323-333.
16. Grandy SA, Brouillette JUDI, Fiset C. Reduction of Ventricular Sodium Current in a Mouse Model of HIV. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2010;21:916-922.
17. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical Biochemistry* 2005;345:47-54.
18. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Molecular Endocrinology* 2006;20:953-970.
19. Hallaq H, Wang DW, Kunic JD, George AL, Wells KS, Murray KT. Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2012;302:H782-H789.
20. Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994;91:3289-3293.
21. Valdivia CR, Ueda K, Ackerman MJ, Makielski JC. GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2009;297:H1446-H1452.
22. Ferreira JCB, Mochly-Rosen D, Boutjdir M. Regulation of Cardiac Excitability Protein Kinase C Isozymes. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 01/01 2012;4:532-546.
23. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley Jr SC, Kasi VS, Hoit BD, Keshelava G, Zhao H, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice with Cardiac-Restricted Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Have Atrial Enlargement, Cardiac Arrhythmia, and Sudden Death. *The American Journal of Pathology* 2004;165:1019-1032.

24. Shang LL, Sanyal S, Pfahnl AE, Jiao Z, Allen J, Liu H, Dudley SC, Jr. NF-kappaB-dependent transcriptional regulation of the cardiac *scn5a* sodium channel by angiotensin II. *American journal of physiology Cell physiology* Jan 2008;294:C372-379.
25. Gao G, Xie A, Huang SC, et al. Role of RBM25/LUC7L3 in Abnormal Cardiac Sodium Channel Splicing Regulation in Human Heart Failure. *Circulation* 2011;124:1124-1131.
26. Gao G, Xie A, Zhang J, Herman AM, Jeong EM, Gu L, Liu M, Yang KC, Kamp TJ, Dudley SC. Unfolded Protein Response Regulates Cardiac Sodium Current in Systolic Human Heart Failure. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2013;6:1018-1024.
27. Sag CM, Wagner S, Maier LS. Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 2013;63:338-349.
28. Koide Y, Tamura K, Suzuki A, Kitamura K, Yokoyama K, Hashimoto T, Hirawa N, Kihara M, Ohno S, Umemura S. Differential Induction of Protein Kinase C Isoforms at the Cardiac Hypertrophy Stage and Congestive Heart Failure Stage in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertension Research* 2003;26:421-426.
29. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented Protein Kinase C- α -Induced Myofilament Protein Phosphorylation Contributes to Myofilament Dysfunction in Experimental Congestive Heart Failure. *Circulation Research* 2007;101:195-204.
30. Braz JC, Gregory K, Pathak A, et al. PKC-[alpha] regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 2004;10:248-254.
31. Liu Q, Chen X, MacDonnell SM, Kranias EG, Lorenz JN, Leitges M, Houser SR, Molkentin JD. Protein Kinase C α , but Not PKC β or PKC γ , Regulates Contractility and Heart Failure Susceptibility: Implications for Ruboxistaurin as a Novel Therapeutic Approach. *Circulation Research* 2009;105:194-200.
32. Hambleton M, Hahn H, Pleger ST, Kuhn MC, Klevitsky R, Carr AN, Kimball TF, Hewett TE, Dorn GW, Koch WJ, Molkentin JD. Pharmacological- and Gene Therapy-Based Inhibition of Protein Kinase C α/β Enhances Cardiac Contractility and Attenuates Heart Failure. *Circulation* 2006;114:574-582.
33. Takeishi Y, Bhagwat A, Ball NA, Kirkpatrick DL, Periasamy M, Walsh RA. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR proteins in heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1999;276:H53-H62.

34. Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y. Tissue Angiotensin II During Progression of Ventricular Hypertrophy to Heart Failure in Hypertensive Rats; Differential Effects on PKC ϵ and PKC β . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002;34:1377-1385.
35. Yanagita T, Kobayashi H, Yamamoto R, Kataoka H, Yokoo H, Shiraishi S, Minami Si, Koono M, Wada A. Protein Kinase C- α and - ϵ Down-Regulate Cell Surface Sodium Channels via Differential Mechanisms in Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry* 2000;74:1674-1684.

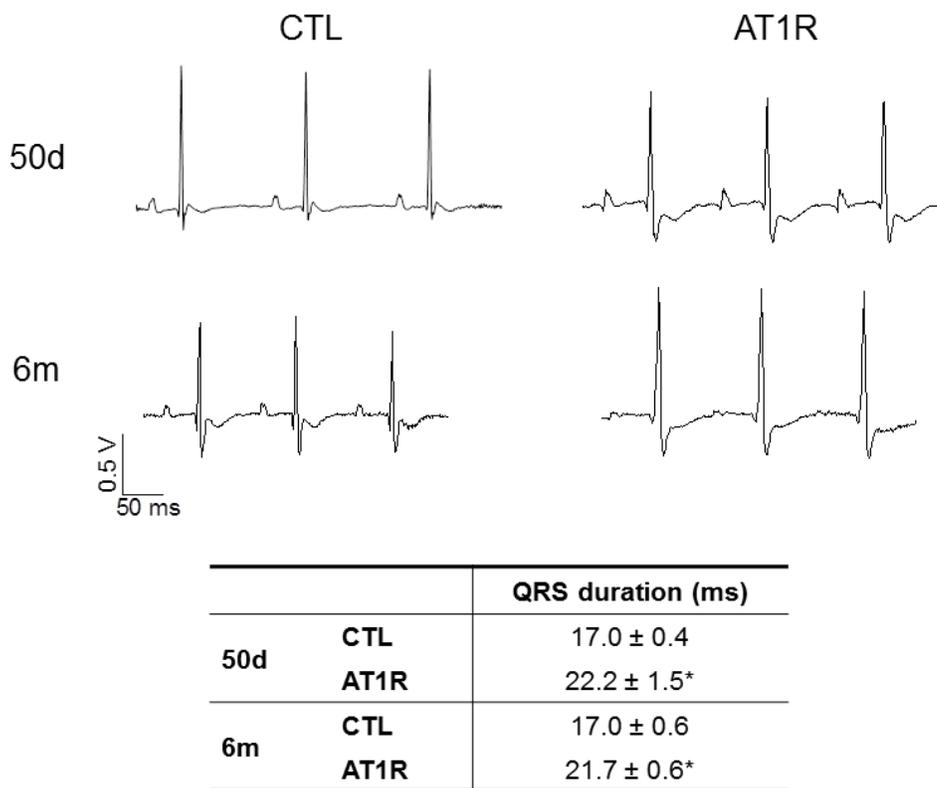


Figure 1. QRS complex is prolonged in AT1R mice. A) Representative ECG traces in lead I configuration from 50-day (50d) control (CTL, n=11) and AT1R (no hypertrophy, n=7) mice showing a widening of the QRS complex. B) The prolongation of the QRS duration is also observed in 6m mice without showing further alteration with hypertrophy development (CTL n=9, AT1R n=9). C) Mean data showing a 30% prolongation of the QRS complex are presented in bar graph (*p<0.05 versus age-matched CTL).

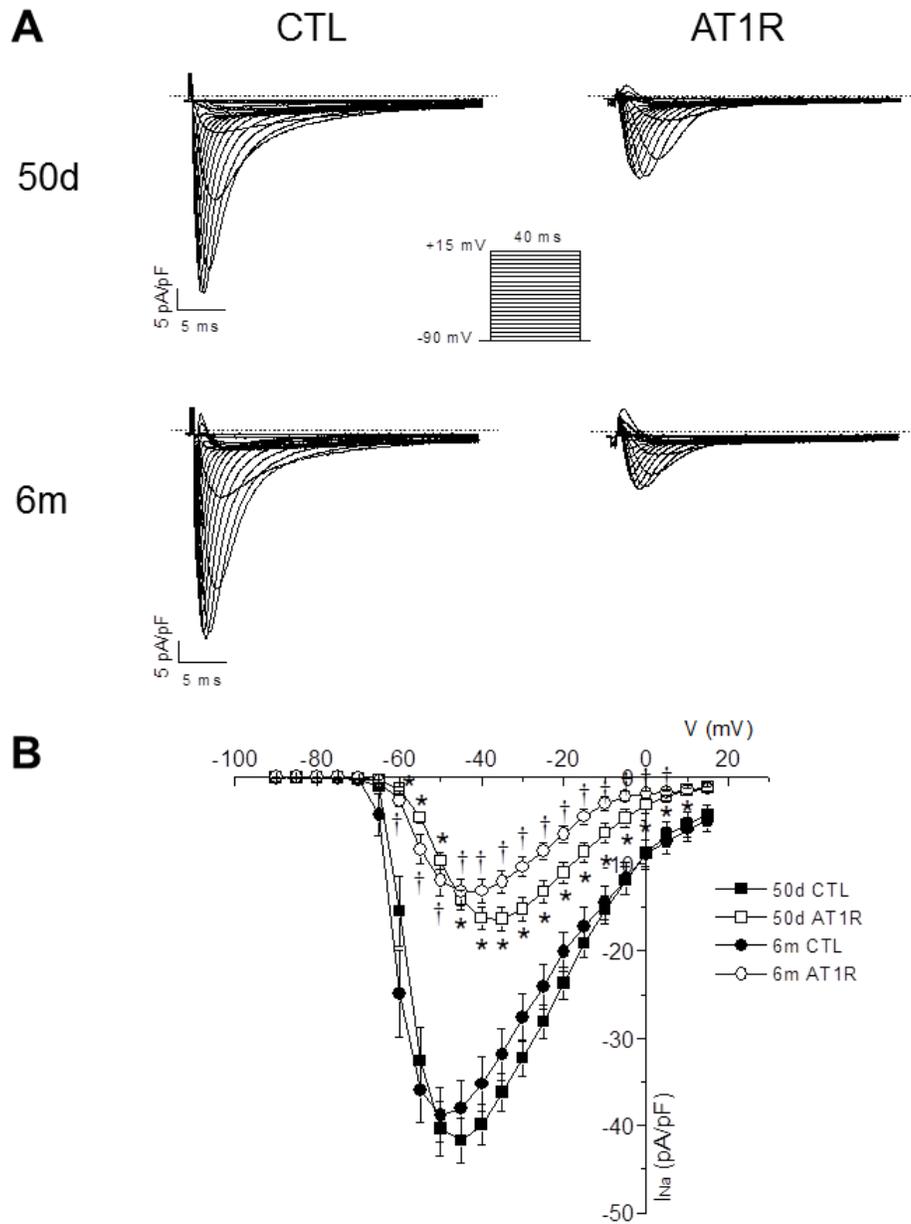


Figure 2. I_{Na} is reduced in AT1R mice in comparison to CTL. A) Typical I_{Na} recordings on freshly isolated ventricular myocytes of CTL and AT1R mice before (50d) and after (6m) the development of hypertrophy. Protocol is shown in inset. B) Mean data are represented in the IV curves where I_{Na} density is decreased by 60% in AT1R (50d: n=23, 6m: n=16) mice compared to CTL (50d: n=26, 6m: n=13) (* p <0.05 versus 50d CTL, † p <0.05 versus 6m CTL).

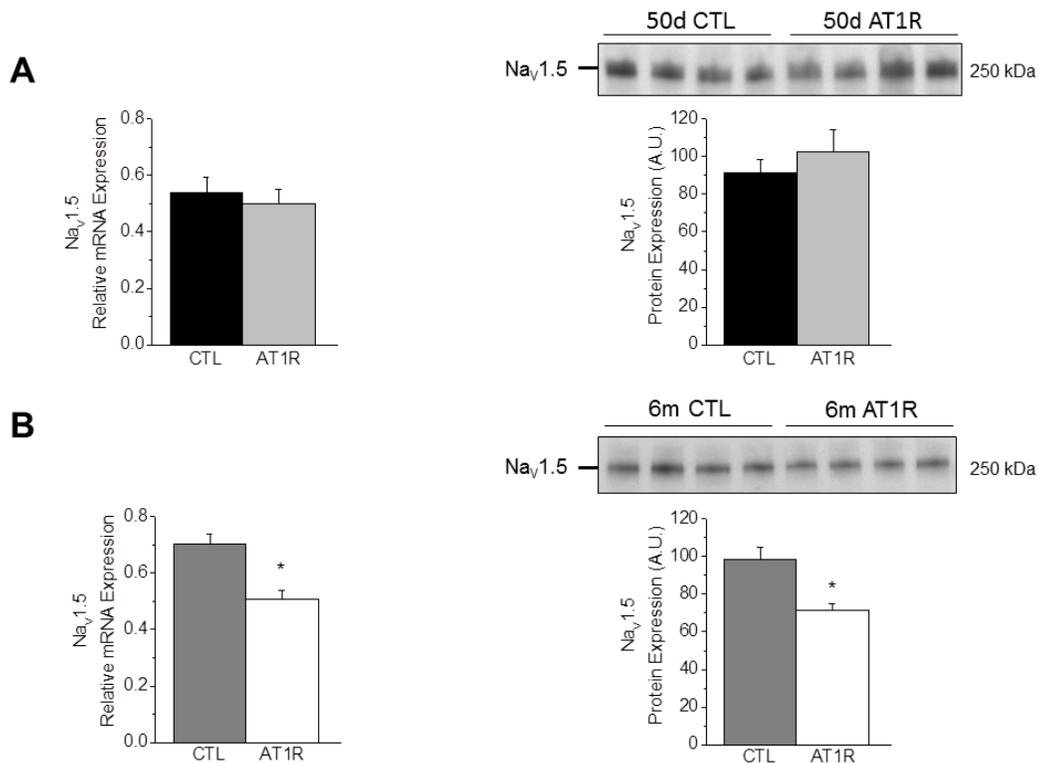


Figure 3. mRNA and protein $\text{Na}_V1.5$ expression is only reduced with hypertrophy. A) Mean qPCR data showed that without hypertrophy (50d) ventricular $\text{Na}_V1.5$ mRNA level is similar between CTL and AT1R mice while the expression is reduced with the development of hypertrophy (6m) (B). Cyclophillin and Lamin C were used as housekeeping genes (50d CTL: n=9, 50d AT1R: n=6, 6m CTL: n=8, 6m AT1R: n=6). C-D) Western blots for $\text{Na}_V1.5$ were loaded with enriched-sarcolemmal protein fraction from CTL and AT1R ventricles from 50d and 6m mice. Mean data show that protein $\text{Na}_V1.5$ expression is unchanged between 50d CTL and AT1R mice whereas its expression is decreased in 6m AT1R mice (A.U. Arbitrary unit) (n=4 in each group; *p<0.05 versus age-matched CTL).

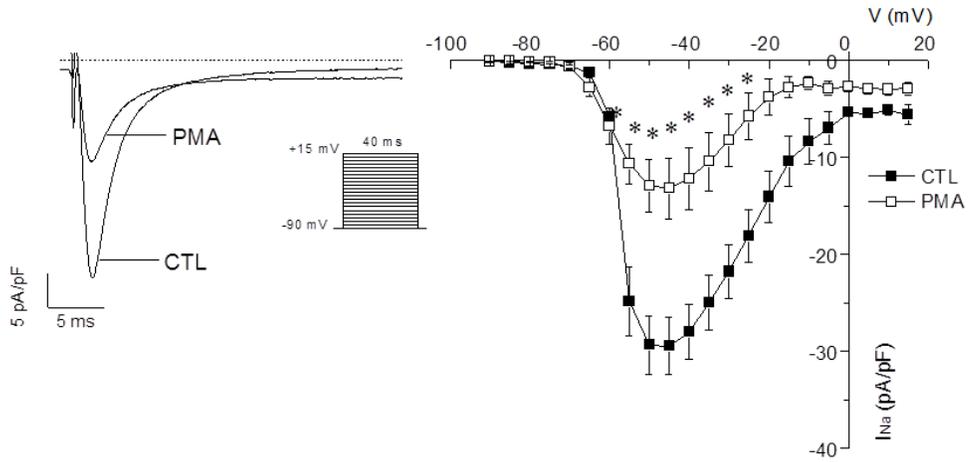


Figure 4. PMA decreases I_{Na} density. *Left-* Typical examples of superimposed I_{Na} recordings at maximal peak density showing a reduction of I_{Na} with PMA treatment (100nM X 15min). *Right-* IV curve showing the mean data of recorded currents from CTL (n=6) and PMA-treated cells (n=4) (*p<0.05 versus CTL).

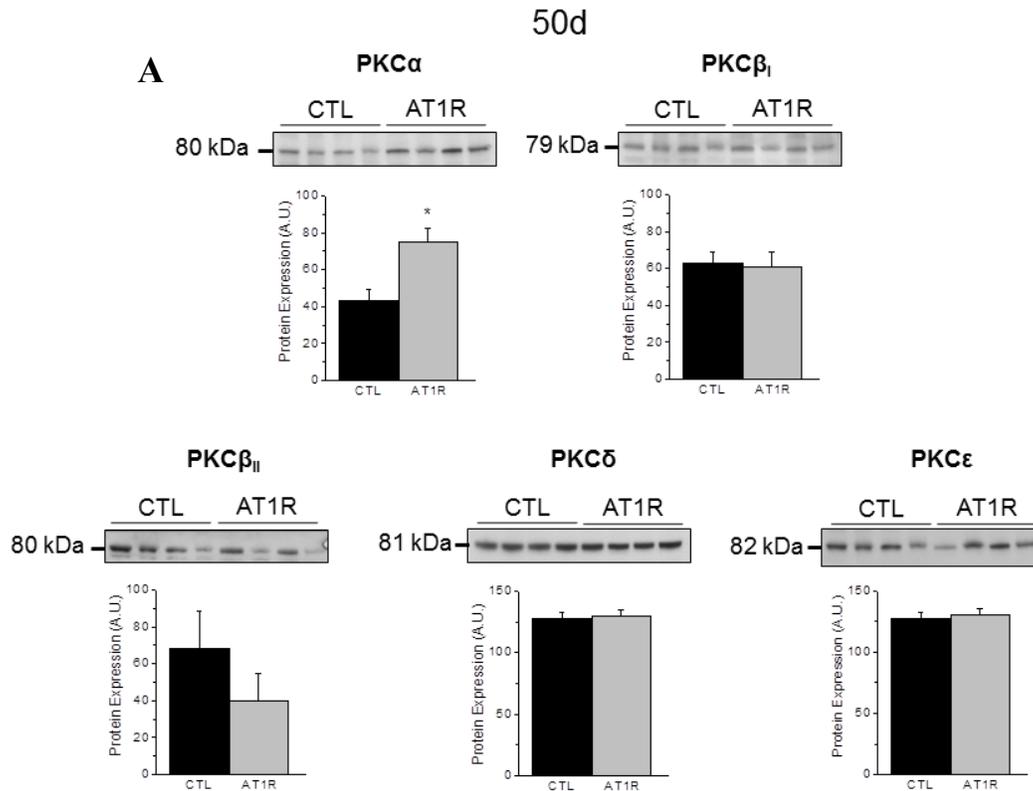


Figure 5A. PKC α expression is increased at the sarcolemmal level in AT1R mice of both ages. Western blots from 50d (5A) and 6m (5B) CTL and AT1R mice for various PKC isoforms (α , β_I , β_{II} , δ , ϵ). PKC activation was assessed by loading the enriched-sarcolemmal protein fraction on the gel which presents the amount of protein translocated to the membrane. Mean data are presented in bar graphs, only PKC α is increased at the membrane under AT1R overexpression (n=4 for each group, *p<0.05 versus age-matched CTL).

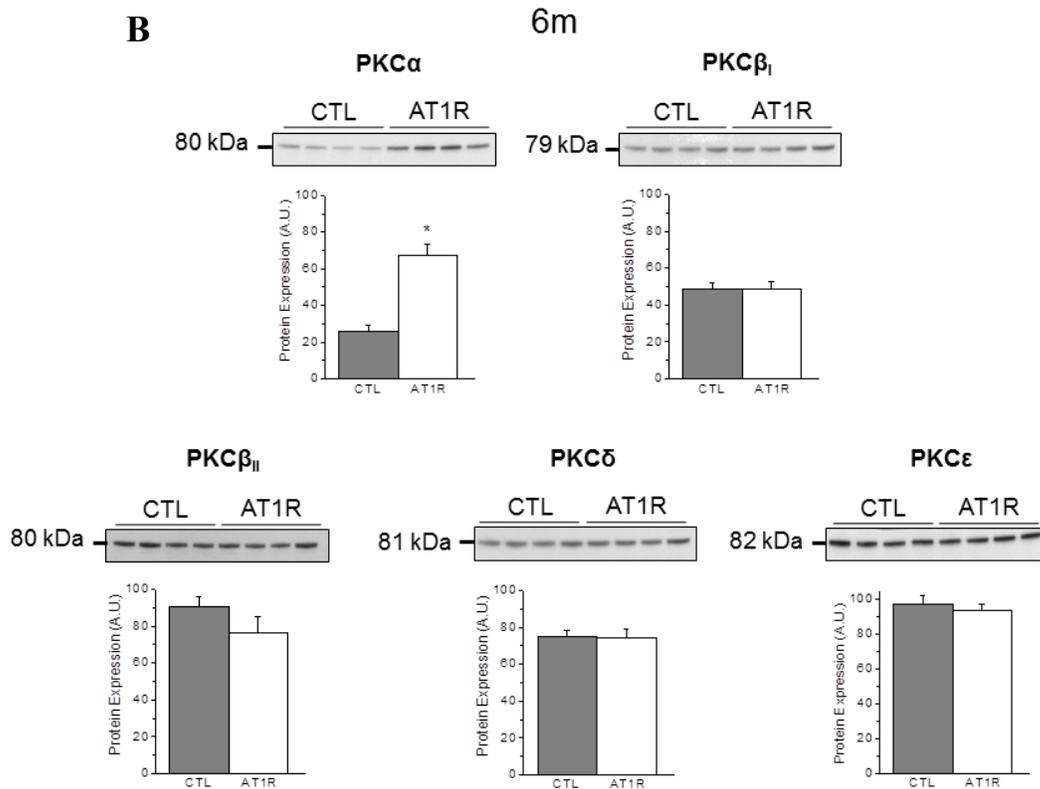


Figure 5B. PKC α expression is increased at the sarcolemmal level in AT1R mice of both ages. Western blots from 50d (5A) and 6m (5B) CTL and AT1R mice for various PKC isoforms (α , β_I , β_{II} , δ , ϵ). PKC activation was assessed by loading the enriched-sarcolemmal protein fraction on the gel which presents the amount of protein translocated to the membrane. Mean data are presented in bar graphs, only PKC α is increased at the membrane under AT1R overexpression (n=4 for each group, *p<0.05 versus age-matched CTL).

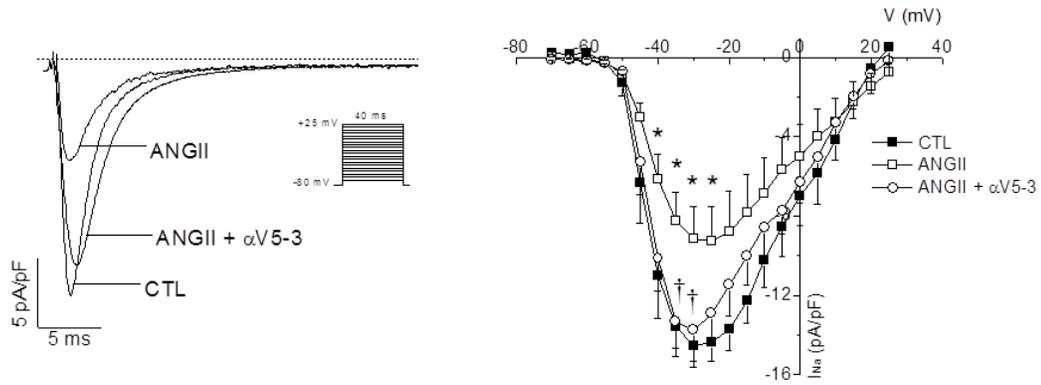


Figure 6. PKC α is involved in I_{Na} density reduction induced by ANGII in hiPSC-CM. Using the α V5-3 inhibitor peptide, the role of PKC α in the ANGII-reduction of I_{Na} was assessed. A) Following one week of quiescent culture, hiPSC-CM was paced until patched between day 21st-23rd of culture. Cells were treated with 100 nM ANGII or 100 nM ANGII + 15 μ M α V5-3 for 48 h. *Left-* Superimposed I_{Na} recordings at peak density are shown and were obtained using the protocol in inset. *Right-* Mean data are shown in the IV curve. I_{Na} is reduced by 37% in hiPSC-CM cells treated with ANGII (n=8) compared to controls (CTL n=6) and α V5-3 co-treatment with ANGII restored the current (n=7) (*p<0.05 versus CTL, †p<0.05 versus ANGII).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Reduction in Na⁺ Current by Angiotensin II is Mediated by PKC α in Mouse and Human Cardiomyocytes

MATHIEU S. *et al.*

METHODS

Animals

We performed our study using heterozygous male C57BL/6 AT1R (angiotensin II type 1 receptor) mice aged either 50 \pm 5 days old (50d; no hypertrophy) or 6–8 months old (6m; presence of hypertrophy) and age-matched wild-type littermate male controls (CTL). Generation of the AT1R mice with cardiac specific overexpression of the human AT1R has been previously published ¹. Briefly, cardiomyocyte overexpression was achieved by expression of the human AT1R (*AGTR1*) under the control of the α myosin heavy chain (*Myh6*) promoter. All animal protocols were conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The Montreal Heart Institute Animal Care Committee has also approved the animal procedures used in this study (reference number 2014-08-01).

Ventricular mouse myocyte isolation

Briefly, to avoid blood coagulation, heparin (1 u/kg, i.p.) was administered i.p. in mice 15 minutes prior to anesthesia by isoflurane and sacrifice by cervical dislocation. Then, the heart was rapidly excised, hung on a modified Langendorff apparatus and retrogradely perfused (2 mL/min) with four different solutions at 37°C. First, a HEPES-buffered Tyrode's solution containing (in mmol/L): 130

NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 HEPES, 5.5 glucose (pH was adjusted to 7.4 with NaOH) was perfused. After, Ca²⁺ was washed out by changing to a Ca²⁺ free HEPES-buffered Tyrode's solution. Thirdly, the heart was digested for 21-26 minutes with the Ca²⁺ free HEPES-buffered Tyrode's solution in which was added (in mmol/L) 0.03 CaCl₂, 20 taurine and 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Co., St Louis, Mo, USA) and 73.7 U/ml type II collagenase (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA). Finally, the last 5 minutes were perfused with a Kraft-Brühe (KB) solution containing (in mmol/L): 100 K-glutamate, 10 K-aspartate, 25 KCl, 10 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 20 taurine, 5 creatine, 0.5 EGTA, 5 HEPES, 20 glucose, 0.1% BSA (pH to 7.2 with KOH). Next, the heart was removed and the right ventricle free wall was minced into KB solution, isolated ventricular myocytes were obtained by titration and conserved at 4°C in KB until needed. Rod-shaped myocytes were obtained from dissociation and dispersion of the right ventricular free wall to avoid transmural gradient ².

Surface electrocardiogram (ECG)

Mice were anaesthetized with isoflurane (2%). Mouse body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Platinum electrodes were positioned subcutaneously and surface ECG was acquired in lead I configuration at the rate of 2 kHz using the Biopac acquisition System MP100 (EMKA Technologies, Paris, France). The signal was amplified, filtered at 100 Hz (low-pass) and 60 KHz (notch filter). Data were analyzed using ECG auto v2.8.1.18 (EMKA Technologies, Paris, France). Duration of QRS complex was calculated manually by a blinded observer from signal averaged ECG recordings (500-1000 cardiac cycles).

hiPSC-CM culture

Cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells Cor.4U[®] (hiPSC-CM) were obtained from Axiogenesis AG (Cologne, Germany). Cells were thawed and plated following the manufacturer's instructions and after one week of culture, they were transferred into C-dishes (IonOptix, Milton, U.S.A) and

electrically paced (2.5V/cm; 1 Hz) for two weeks using the C-Pace EP culture stimulator (IonOptix, Milton, U.S.A). Following the 2-week pacing protocol, drugs (information can be found under the patch-clamp section) were added to media and treatment was continued for an additional 48 h.

Patch-clamp (current- and voltage-clamp)

Whole-cell current-clamp technique was performed at room temperature as described previously³. Action potential amplitude (APA) was determined by the difference between the baseline and the maximal point of the upstroke of the action potential. V_{max} was obtained with clampfit (Molecular Devices, Foster City, USA) by determining the slope of the depolarizing phase of the AP and resting membrane potential measured. Voltage-clamp experiments were realized in whole-cell configuration using borosilicate glass pipettes (WPI, Sarasota, FL, USA) of maximum 3 M Ω resistance and were filled with internal solution (in mmol/L): 132.5 CsF, 5 NaCl, 5 MgATP, 10 EGTA, 5 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH). Sodium current (I_{Na}) from mouse ventricular myocytes were measured at 22 \pm 1 $^{\circ}$ C with the external solution containing (in mmol/L): 132.5 CsCl, 5 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glucose (pH adjusted to 7.35 with CsOH) as previously reported⁴. During experiments conducted on hiPSC-CM, bath was perfused at 22 \pm 1 $^{\circ}$ C with the following solution (in mmol/L): 102.5 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glucose, 0.1 CdCl₂ (pH adjusted to 7.35 with CsOH). Adult ventricular mouse myocytes were held at -90 mV, I_{Na} was obtained by imposing 40 ms voltage step from -90 mV to +15 mV. The protein kinase C (PKC) activator, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100 nmol/L, Sigma), was added to the external bath solution. Cells were perfused for 10 min before beginning of recordings. hiPSC-CM cells were held at -80 mV and I_{Na} was obtained by imposing 40 ms voltage step from -70 mV to +25 mV. Na⁺ current protocols were performed and data acquired with Clampex 10.2 (Molecular Devices, Foster City, USA). Voltage-clamp recordings were low-pass filtered (1 KHz) and digitized 10 KHz. Series resistance were compensated at 75%. All currents were normalized to cell capacitance. Recordings were performed at day

21-23 post thawing. Additionally, in some experiments cells were exposed to a 48-hour treatment with 100 nmol/L angiotensin II without or with 15 μ mol/L α V5-3, a PKC α inhibitor peptide with a cell-permeable N-terminal tag (YGRKKRRQRRR) (amino acid sequence: QLVIAN, GenScript) ⁵.

Quantitative polymerase-chain-reaction (qPCR)

qPCR for the α -subunit of the Na⁺ channel Na_v1.5 was performed as previously published ⁴. Briefly, total RNA was isolated from the ventricles with a RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and treated with DNase I to prevent contamination by genomic DNA. cDNA was then synthesized with SuperScriptIII first-strand (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Primers specific for Na_v1.5 were used (Fwd: 5'TGCCACCAATGCCTTGTACG3', Rev: 5'ATGGCGGTGAAGGTGTACTC3') and qPCR was performed with Platinum SYBR Green qPCR Supermix (Life Technologies) using real-time PCR system (MX3005P QPCR system, Stratagene). The primers were used at a concentration of 300 nM. The same three-step PCR protocol was used for Na_v1.5 and the two housekeeping genes, DNA double-strand dissociation at 95°C for 30s, annealing at 55°C for 1min and elongation at 72°C for 1min. mRNA expression was normalized by the geometric mean of two housekeeping gene cyclophyllin (Fwd: 5'CCGATGACGAGCCCTTGG3', Rev: 5'GCCGCCAGTGCCATTATG3') and Lamin C (Fwd: 5'GGCTACAGACGCTGAAGGAG3', Rev: 5'CTGTTCCACCTGGTCCTCAT3') as well as adjusted to a calibrator conserved in every plate to assure reproducibility.

Western blots

Sarcolemmal-enriched protein were obtained as previously reported ⁶. Briefly, ventricles were homogenized in an ice-cold buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Preparation was centrifuged at 10 000g for 10 min to remove cell debris. Supernatant was then centrifuged at 200 000g. The following pellet was then resuspended in the homogenizing buffer with 0.6M KCl and incubated for 30 min to dissociate myofibrillar proteins. Samples were

centrifuged at 200 000g, afterwards, pellet was washed three times with the homogenizing buffer and used as sarcolemmal-enriched protein. Samples were kept at -80°C until needed. Protein concentration for all samples was assessed at once using the standard Bradford assay (Bio-Rad). The protein samples (30 µg/lane) were then separated using SDS-PAGE precast gradient gel (5-10%, Biorad) and electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein loading and transfer. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% nonfat dry milk and 1% Tween 20, and then incubated overnight in a fresh aliquot of the same solution to which primary antibodies were added (Nav1.5 1:250 Alomone, PKC α 1:2000 Cell Signaling, PKC β_1 1:1000 Santa Cruz, PKC β_{II} 1:1000 Santa Cruz, PKC δ 1:5000, PKC ϵ 1:2000 Cell Signaling). The membranes were then washed in TBS containing 1% milk and 1% Tween 20. After hybridization with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence reagents (PerkinElmer Life Sciences, Ontario, Canada). Sarcolemmal protein expression was determined by quantifying the intensity (QuantityOne, Bio-Rad, Ontario, Canada) of the bands acquired with VersaDoc imaging system (MP4000, Bio-Rad) and averaging the values for each group.

References

1. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FoW, Thibault Gt, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:931-936.
2. Pandit SV, Clark RB, Giles WR, Demir SS. A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophysical Journal* 2001;81:3029-3051.
3. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-Based Differences in Cardiac Repolarization in Mouse Ventricle. *Circulation Research* August 31, 2001 2001;89:437-444.
4. Grandy SA, Brouillette JUDI, Fiset C. Reduction of Ventricular Sodium Current in a Mouse Model of HIV. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2010;21:916-922.
5. Kim J, Thorne SH, Sun L, Huang B, Mochly-Rosen D. Sustained inhibition of PKC[alpha] reduces intravasation and lung seeding during mammary tumor metastasis in an in vivo mouse model. *Oncogene* 01/20/print 2011;30:323-333.
6. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical Biochemistry* 2005;345:47-54.

4. Article 2

Female Mice with Cardiomyocyte Specific Overexpression of the Angiotensin II Type 1 Receptor are More Susceptible to Dilated Cardiomyopathy and Mortality

Sophie Mathieu, Katy Rivard, Nabil El Khoury, Pierre Paradis, Mona Nemer & Céline Fiset

Soumis à : Circulation Heart Failure

Contribution des auteurs

Sophie Mathieu : Stratégie expérimentale, expérimentation, analyse, rédaction, conceptualisation, discussion et interprétation

Katy Rivard : Expérimentations de patch-clamp (courant K^+), conceptualisation, courbe de survie

Nabil El Khoury : Expérimentation de patch-clamp, interprétation et rédaction

Pierre Paradis : Collaborateur, création du modèle de souris AT1R, échocardiographies, conseils, lecture et commentaires de l'article

Mona Nemer : Collaborateur, création du modèle de souris AT1R

Céline Fiset : Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale

4.1 Avant-propos

Ce deuxième projet porte sur les différences mâles femelles dans l'IC développée en réponse à une surexpression au niveau des cardiomyocytes du récepteur de type 1 de l'ANGII (AT1R).

Peu d'études jusqu'à ce jour ont comparé les effets de l'ANGII entre les sexes dans le remodelage associé à l'IC. L'ANGII est l'un des principaux médiateurs de l'IC et une diminution de sa production chez les patients souffrant d'IC entraîne des effets bénéfiques majeurs. De plus, l'ANGII a un rôle important dans l'hypertension et les femmes qui en souffrent sont plus sujettes que les hommes à développer de l'IC. Conséquemment, il semble pertinent d'étudier la susceptibilité à l'ANGII entre les sexes. Pour ce faire, le modèle de souris AT1R a été utilisé puisque l'effet chronique de l'activation du récepteur AT1 entraîne des arythmies et un remodelage ventriculaires. Les souris ont été étudiées entre six et huit mois puisqu'à cet âge aucun décès n'a été répertorié chez les mâles AT1R alors que la mortalité chez les femelles AT1R est déjà présente. Plusieurs techniques ont été réalisées afin de comparer le remodelage structurel, électrique et contractile entre les sexes telles que l'ECG, le patch-clamp, les transitoires calciques et les étincelles calciques.

RÉSUMÉ

L'IC est responsable d'un taux de mortalité élevé et affecte différemment les hommes et les femmes. Ainsi, les femmes sont plus à risque de développer de l'IC en réponse à l'hypertension artérielle ou le diabète alors que les hommes sont plus susceptibles à la suite d'un infarctus du myocarde. De plus, les femmes développent plus souvent une ICpEF et les hommes une ICrEF. Toutefois, les causes sous-jacentes à ces différences demeurent inconnues et nécessitent des études plus approfondies. Par conséquent, des souris transgéniques des deux sexes surexprimant au niveau des cardiomyocytes le récepteur AT1 (AT1R) ont été comparées. De façon intéressante, les souris AT1R femelles ont un taux de mortalité (21 %) plus important que les mâles AT1R (5,5 %). En comparaison aux mâles AT1R, une augmentation de 57 % de l'index de masse ventriculaire gauche, un élargissement de 18 % de la dimension interne du ventricule gauche et un allongement de 23 % des cardiomyocytes ont été mesurés chez les femelles AT1R. De plus, les femelles CTL présentent une réduction de 54 % du contenu du réticulum sarcoplasmique et une diminution de 30 % du transitoire calcique en comparaison aux mâles CTL ce qui peut contribuer à expliquer leur plus grande sensibilité à l'hypertrophie. Spécifiquement, il a été observé uniquement chez les femelles AT1R que le temps pour atteindre 50 % de déclinaison du transitoire calcique est plus long de 39 % en comparaison aux femelles CTL. La fréquence des étincelles calciques est augmentée de 187 % chez les femelles AT1R, mais n'est pas changée chez les mâles AT1R comparativement à leur CTL respectif. Ces modifications peuvent altérer un fonctionnement adéquat du cœur et favoriser la genèse d'arythmies comme la post-dépolarisation précoce. En résumé, ces résultats suggèrent que les femelles ont une plus grande sensibilité à l'activation chronique du récepteur AT1 qui pourrait entraîner une hypertrophie, une dysfonction systolique et des troubles de l'homéostasie calcique plus sévère chez celles-ci.

Mots-clés : Hypertrophie, Différences entre les sexes, Homéostasie calcique, Angiotensine II, Courants ioniques

ABSTRACT

Heart failure (HF) is associated with high mortality and affects differently men and women. For instance, women are more prone to develop HF following hypertension while men are more at risk following myocardial infarction. Importantly, the underlying mechanisms for these disparities in HF remain largely unexplored and warrant further investigation. Accordingly, transgenic mice with HF due to cardiomyocyte-specific overexpression of the human angiotensin II type I receptor (AT1R) were used. Interestingly, we found that female AT1R mice had a higher mortality (21%) rate than AT1R males (5.5%). In comparison to AT1R males, AT1R females showed a 57% increase in left ventricular mass index, a 18% enlargement in left ventricular internal dimension in diastole and a 23% increase in myocyte length. Furthermore, a 54% reduction in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} load and a 30% decrease in Ca^{2+} transient were measured in CTL females in comparison to CTL males which can contribute to the higher female susceptibility to hypertrophy. Specifically, in AT1R females, but not in AT1R males, Ca^{2+} extrusion duration was 39% longer at time to 50% decay compared to sex-matched CTL. In addition, Ca^{2+} spark frequency was increased by 187% in AT1R females but did not change in AT1R males comparatively to their sex-matched CTL. These modifications could alter function and favour the development of arrhythmias such as delayed afterdepolarizations. Altogether, these results suggest that females have a higher sensitivity to AT1R overexpression that leads to more severe cardiac hypertrophy, dysfunction and compromised Ca^{2+} dynamics.

Keywords: Hypertrophy, Sex differences, Ca^{2+} handling, Angiotensin II, Ionic currents

INTRODUCTION

It is now recognized that hormonal regulation can greatly impact cardiac function. Several years ago, it was shown that menopause can worsen cardiovascular condition, mainly due to estrogen deprivation, thereby explaining why women develop certain cardiac diseases about 7-10 years later than men ¹. Studies have shown that several functional sex steroid receptors are expressed in human and animal hearts ²⁻⁵. Together, these observations support a direct role for sex hormones in regulating cardiac function and expression of various targets during health and disease.

Important sex differences in the manifestation and risk factors associated with heart failure (HF) exist. More women develop HF with preserved ejection fraction (HFpEF) whereas men usually suffer from HF with a reduced ejection fraction (HFrEF) ^{8, 11, 12}. Women are more at risk to develop HF if they suffer from hypertension or diabetes and have a lower survival rate post-MI ^{7, 11, 29}. Furthermore, Gerds *et al.* have shown that before therapy, women had higher prevalence of left ventricular hypertrophy than men suggesting that they may be more susceptible to cardiac remodeling ¹³. Indeed, left ventricular hypertrophy is an important risk factor of cardiac mortality and sudden cardiac death (SCD) and it remains unknown why women are more prone to develop a more severe hypertrophic phenotype ^{14, 15}. Indeed in 2008, according to the American Heart Association, HF was responsible for the deaths of 124,598 men vs. 156,839 women ³¹. Besides, congestive HF in women represented 62.5% of all deaths attributed to HF. Furthermore, hospitalization in the US for HF between 1980 and 2006 was higher in women than men, suggesting that women show a worse prognosis ³⁰. The reasons underlying this worse HF prognosis and higher sensitivity to the effects of hypertension remain largely unexplored and there is a need to understand the cellular and molecular underpinnings of these sex differences in order to treat women more appropriately and develop more effective therapies.

Previously, it has been shown that angiotensin II (ANGII), the main effector of the renin-angiotensin system (RAS), is a major mediator of HF and hypertension¹⁶. Indeed, the development of HF is associated with a chronic activation of the RAS where chronic ANGII results in structural and electrical remodeling of the heart¹⁶. Previously, we showed that cardiomyocyte specific overexpression of the human ANGII type 1 receptor (AT1R) induces cardiac systolic dysfunction, hypertrophy and electrical remodeling¹⁷⁻¹⁹. Unfortunately, it remains incompletely understood how various processes implicated in the development of HF, such as cardiac dysfunction, hypertrophy and ion channel remodelling differ between males and females as a result of chronic ANGII stimulation. Since women are more susceptible to develop HF in response to hypertension compared to men^{7, 11}, we hypothesized that females are more sensitive to ANGII which would contribute to the worsening of the pathology compared to males. Thus, in this study, we sought to address these questions by studying the direct impact of cardiomyocyte specific AT1R overexpression on survival rate, cardiac systolic dysfunction, hypertrophy and electrical remodeling in male and female mice.

Here, we report that the female AT1R exhibit a higher mortality rate compared to their male counterparts. This was associated with a greater ventricular excentric hypertrophy, an increase in Ca^{2+} sparks frequency, smaller Ca^{2+} transients and slower Ca^{2+} reuptake in AT1R females compared to AT1R males. Together, these findings may contribute to the higher mortality rate in females with AT1R overexpression.

METHODS

A detailed description of the methods can be found in the online data supplement.

Animals

Heterozygous male and female C57BL/6 transgenic mice with a cardiomyocyte specific overexpression of *AGTIR*¹⁷ (AT1R mice) and their sex-matched wild-type littermates (CTL) were used at the age of 6-8 months to study cardiac systolic dysfunction, hypertrophy and electrical remodeling. AT1R mice colony was followed from birth to 15 months of age and deaths were counted for the entire duration of the survival study. All animal protocols were conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The Montreal Heart Institute Animal Care Committee has also approved the animal procedures of this study (reference number 2014-08-01).

Surface ECG

As previously described, surface electrocardiogram (ECG) in lead I configuration were recorded at a rate of 2 kHz for 5 minutes in mice anaesthetized with 2% isoflurane¹⁸.

Ventricular myocytes isolation

The ventricular myocytes isolation protocol was performed as previously described²⁰. Briefly, each mouse was anesthetized with isoflurane, injected IP with 100 U heparine (1000 U/mL), heart was removed rapidly and hung on a modified Langendorff apparatus. Single myocytes were obtained following enzymatic digestion and dissociation of the right ventricle using Worthington collagenase type 2 (73.7 U/ml, Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA).

Cellular electrophysiology

Recordings of Na^+ current (I_{Na}) and K^+ currents were obtained using the voltage-clamp technique in whole-cell configuration at room temperature (20-22°C) whereas L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) was recorded at 37°C. The voltage-clamp protocols, recording methods and data acquisition have already been described elsewhere²¹⁻²³.

Echocardiography

Short axis view two-dimensional guided M-mode echocardiography was performed in mice under conscious sedation with 15 $\mu\text{L/g}$ i.p. of a 1:1 mixture of fentanyl (5 $\mu\text{g/ml}$) and droperidol (250 $\mu\text{g/ml}$) as previously described to determine cardiac systolic function and left ventricle morphological parameters^{18, 24}.

Ca^{2+} transients

Myocytes were preincubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2AM (Molecular Probes). Then, Ca^{2+} transients were recorded on field stimulated myocytes at a frequency of 2 Hz at 37°C. The myocyte sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} content was measured following fast perfusion (1 s) of 10 mmol/L caffeine on a quiescent cell. Recordings were acquired using Felix 4.1.0 (Photon Technologies International (PTI), Birmingham, NJ) and analyzed using Clampfit 10.2 (Molecular Devices, Foster City, USA).

Ca^{2+} sparks

Ventricular myocytes were preincubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4AM and Ca^{2+} sparks on quiescent ventricular myocytes were acquired using a Zeiss LSM 710 laser scanning microscope in linear scan mode. Ca^{2+} sparks parameters were measured using Image J plugin sparkmaster.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M, “N” indicate the number of mice and “n”, the number of cells. An Anova followed by a Fisher’s post hoc test for comparison of the groups was performed using Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA). Survival rate was analyzed using Cox regression model. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Early and higher mortality rate is observed in female AT1R

During the first 15 months following birth, all deaths from the AT1R colony were collected and reported into a Kaplan-Meier survival curve (Figure 1). During the monitored period, the survival rate of female AT1R mice decreased by 21% vs. 5.5% in AT1R males compared to sex- and age-matched CTL. Importantly, the data also showed that female AT1R mice began to die around the age of 3 months whereas male AT1R mortality did not begin before the age of 9 months. Together, these observations suggest that females are more affected by cardiomyocyte specific AT1R overexpression and may present more severe cardiac alterations promoting their premature death. Since the two main causes of death from heart failure are considered to be SCD and myocardial stunning^{25, 26}, in the next series of experiments, we compared the cardiac electrical and mechanical remodeling of both male and female AT1R mice in order to provide functional evidence explaining the higher female mortality.

Ventricular electrical remodeling is similar between male and female AT1R mice

We first examined ventricular electrical properties between male and female *AT1R* mice in order to determine whether the higher mortality in females could be attributable to alterations in electrical remodeling associated with an increased risk of ventricular arrhythmias. Accordingly, surface ECG recordings show that the QRS complex, a measure of ventricular depolarization, was similarly reduced in AT1R mice of both sexes (in ms, M CTL: 17.0±0.6 N=9, M AT1R: 21.7±0.6* N=9, F CTL: 16.0±0.8 N=9, F AT1R: 21.2±1.9* N=6; * $p < 0.05$ compared to sex-matched CTL; male data is reported from Mathieu *et al.* in revision for Heart Rhythm). Furthermore, ventricular repolarization assessed by measuring QTc interval ($QTc = QT \text{ interval} / (RR \text{ interval} - 100)^{1/2}$) was similarly prolonged in AT1R mice of both sexes (in ms, M CTL: 44.5±1.0 N=9, M AT1R: 49.2±0.9* N=9, F CTL: 43.0±1.0 N=9, F AT1R: 49.7±0.7* N=5; * $p < 0.05$ compared to sex-

matched CTL). Consistent with these findings, the density of the individual ventricular ionic currents: the sodium current (I_{Na}), the L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) and the total K^+ current (I_{peak}) were all similarly reduced in AT1R male and female ventricular myocytes (Figure 2). Overall, these electrical modifications, albeit severe, are comparable between the sexes and cannot account on their own for the higher mortality in female AT1R mice.

Female AT1R mice suffer from more severe ventricular excentric hypertrophy

Since no major differences in ventricular electrical properties were noted, we then evaluated critical components of HF related to systolic function and morphologic remodeling in these mice. At the cellular level, we found that cell capacitance was larger in both AT1R groups and that female AT1R myocytes were longer in comparison to their sex-matched CTL and to the AT1R male myocytes (Figure 3A-B). In line with this finding, data obtained by echocardiography from AT1R mice of both sexes showed that the left ventricular mass index (LV Mi) was increased in female AT1R mice in comparison to AT1R males and female CTL (Figure 3C). Left ventricular fractional shortening (an index of systolic function) was similarly decreased in both AT1R groups compared to CTL (Figure 3D). However, morphological echocardiographic measurements in diastole revealed that female AT1R mice had larger increased left ventricular internal dimension (LVIDd) (Figure 3E) and more pronounced thinning of the left ventricular posterior wall thickness (LVPWd) but similar decrease in inter-ventricular septal thickness at end diastole (IVSd) compared to AT1R males (Figure 3F-G). Furthermore, the relative wall thickness was decreased to a greater extent in female than male AT1R mice (Figure 3H). Overall, these results suggest that the cardiac systolic function of female AT1R mice might be severely compromised due to more pronounced left ventricular dilation resulting in excentric hypertrophy. Therefore, AT1R female are more likely to progress towards a decompensated state more rapidly than AT1R males.

Ca²⁺ transients are altered differently between male and female AT1R mice

Considering that Ca²⁺ handling is intrinsically linked to cardiomyocyte function and that AT1R female hearts show a more pronounced dilation, we sought to determine whether a poorer Ca²⁺ handling in AT1R females could be associated with their higher mortality. Our results show that in CTL, the amplitude of the Ca²⁺ transient was smaller in female mice in comparison to males (Figure 4A-B). In male AT1R mice, the amplitude of the Ca²⁺ transients was reduced in comparison to male CTL and reached the same level as CTL and AT1R females. Furthermore, when estimating SR Ca²⁺ load by application of caffeine, the amplitude of the caffeine-induced Ca²⁺ transient was dramatically reduced in AT1R male but not in AT1R female cardiomyocytes in comparison to their sex-matched CTL (Figure 5A-B). Of note, the amplitude of the caffeine-induced transient was already small in female CTL compared to male CTL and the overexpression of AT1R did not further affect its amplitude in females. Consequently, the fractional release (Figure 5C), the amount of Ca²⁺ released (Ca²⁺ transient) divided by the total amount of Ca²⁺ available (SR load, caffeine-induced Ca²⁺ transient), was increased in female CTL in comparison to CTL males. Altogether, these findings suggest that at baseline females have a lower SR Ca²⁺ load than males and that this lower Ca²⁺ reserve was not further decreased by AT1R overexpression. Concurrently, it was also observed that diastolic Ca²⁺ concentration (Figure 4C) was lower in female AT1R myocytes which implies that myofilament contraction following Ca²⁺ release could be compromised leading to a systolic dysfunction.

When evaluating cytosolic Ca²⁺ extrusion through analysis of the times to 50%, 90% decay and the Ca²⁺ transient decay (tau), we found that time to 90% decay and tau were prolonged to a similar extent in AT1R mice of both sexes in comparison to their respective controls (Figure 4E-F and Figure 5E). However, compared to AT1R males, the time to 50% decay was slower in AT1R female myocytes suggesting they suffer from a greater defect in Ca²⁺ reuptake (Figure 4D). This phenomenon was even more evident when measuring the time to 50%

decay on the caffeine-induced Ca^{2+} transient (Figure 5D). Indeed, only female AT1R mice showed a slower time to 50% decay supporting a poorer Ca^{2+} extrusion mechanism in female AT1R mice. Since more than 90 % of the Ca^{2+} extrusion is mediated by SERCA2a (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) in rodents ²⁷, this result suggests that female AT1R mice may have more severe alteration in the function and expression of SERCA2a and/or phospholamban (PLB), a negative regulator of SERCA2a activity. Overall, these results suggest that AT1R females have a low SR Ca^{2+} content along with a larger dysfunction in SERCA2a activity making them more susceptible to the effects of AT1R overexpression-induced eccentric hypertrophy.

Ca^{2+} sparks are more frequent in female AT1R mice

During the acquisition and analysis of Ca^{2+} transient data we observed different incidence of spontaneous Ca^{2+} release between the groups. These events were quantified and are reported in Table 1. These spontaneously triggered Ca^{2+} events suggested greater SR Ca^{2+} leak. Specifically, female CTL have a lesser number of cells with spontaneous activity compared to CTL males as expected since a smaller SR Ca^{2+} load was measured in CTL females. However, the number of cells with spontaneous Ca^{2+} activity was higher in AT1R females suggesting that in females, AT1R stimulation promotes SR Ca^{2+} leak. Accordingly, in order to better assess these spontaneous events, we performed rapid line-scan confocal microscopy using the Fluo-4AM Ca^{2+} dye, adapted from Fares *et al.* ²⁸ to evaluate spark amplitude and frequency in quiescent cells of the different groups. Figure 6A shows that the number of sparks per 100 μm per second is dramatically increased in female AT1R (2.4 ± 0.6 sparks/100 $\mu\text{m}/\text{sec}$) mice compared to female CTL (0.85 ± 0.3 sparks/100 $\mu\text{m}/\text{sec}$) suggesting that there is more SR leak in AT1R females. Interestingly, in AT1R males ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$: 0.38 ± 0.04) there is a reduction in the amplitude of Ca^{2+} sparks compared to CTL males ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$: 0.53 ± 0.21) (Figure 5B). Along with a similar spark frequency between AT1R and CTL males, this reduction in amplitude would help lower arrhythmogenesis in AT1R males in comparison to AT1R females. Of note, neither the Tau nor the full width at half

maximum (FWHM) were changed by AT1R overexpression or sex (Figure 6C-D). Overall, the findings from these Ca^{2+} handling experiments show that females at baseline have smaller Ca^{2+} transients and SR Ca^{2+} load. This reduced function gives females a smaller regulatory window rendering them more susceptible to the effects of AT1R stimulation. The AT1R stimulation in females also resulted in an additional defect in SERCA2a function and the promotion of diastolic SR Ca^{2+} leak which could increase the risk of triggered arrhythmias and delayed afterdepolarization.

DISCUSSION

Since ANGII is a main effector in the progression of HF and hypertension, we sought to determine how the ANGII/AT1R cascade directly affect cardiac function in males and females and whether it could contribute to sex differences in the manifestation of HF. Using a mouse model which develops HF independently of hypertension through a cardiomyocyte-specific overexpression of the AT1R, we explored the direct role of AT1R stimulation on the heart of mice from both sexes. Interestingly, we observed that female AT1R mice have a lower survival rate and die at an earlier age than their male counterparts suggesting female sex can be associated with a higher susceptibility to AT1R activation. Furthermore, we found that female AT1R mice exhibit larger ventricular hypertrophy and dilation as well as altered Ca^{2+} homeostasis. Specifically, no major differences in electrophysiological parameters were measured between males and females. However, we observed that at baseline, CTL females had a decreased SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} transient thereby increasing their susceptibility to AT1R overexpression deleterious effects. Accordingly, in AT1R females, we observed that there was a dramatic hypertrophy associated with a dysfunction in Ca^{2+} reuptake, an increased in Ca^{2+} sparks and an evidence of SR Ca^{2+} leak. These results could be associated with triggered ventricular arrhythmias. Overall, these parameters suggest that AT1R overexpression leads to a more severe phenotype in females contributing to their higher mortality rate.

Arrhythmias and occurrence of sudden cardiac death between the sexes

Clinical studies have shown that women tend to have a lower incidence of SCD than men although this difference is abrogated with age³². In survivors of cardiac arrest, structural heart disease was studied, and the majority of men manifested coronary artery disease whereas women suffered mostly from non-ischemic disease such as dilated cardiomyopathy and ventricular heart disease^{32, 33}. Furthermore, ventricular fibrillation is not the only electrical disturbance that can lead to SCD. As a fact, pulseless electrical activity (PEA) and asystole have also

been associated with SCD³⁴. It was shown that women more often display PEA, for which therapy does not exist³⁵. Indeed, defibrillation is useful for ventricular fibrillation to restore rhythm but is not for PEA, thus, women with implantable cardioverter defibrillator (ICD) were not as much protected as men from SCD as demonstrated in the MUSTT study³⁶. Our experimental data shows interesting parallels with these clinical observations. First, the presence of exacerbated dilated cardiomyopathy in females compared to males and a similar electrical remodeling support the notion that the higher mortality in female AT1R mice is not associated with alteration in ionic currents but rather from a mechanical dysfunction and more severe hypertrophy compatible with a PEA.

Cardiac remodeling and hypertrophy

Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) and ANGII receptor antagonist (ARA) are two important therapies used for the treatment of HF³⁷. Interestingly, in one study, after treatment with losartan, an ARA, for 4.8 years, women were still suffering from more important residual eccentric hypertrophy compared to men despite a similar reduced in blood pressure¹³. Here, we observed that under AT1R overexpression both sexes display a similar reduction in fractional shortening, female mice also develop more important eccentric hypertrophy. Data showed that LVIDd was larger and that at the cellular level, there was a significant lengthening of ventricular myocytes. Altogether, this finding suggests that females are more sensitive to chronic ANGII/AT1R activation which favours the development of a severe eccentric hypertrophy converging towards dilation.

EC coupling alterations between sexes in the context of ANGII

In this study, we were able to evaluate sex differences under CTL conditions and then analyze how heart disease induced by AT1R overexpression in cardiomyocytes manifested itself in males and females. The first step of excitation-contraction coupling involves activation of I_{CaL} . We observed that I_{CaL} peak density was similar between CTL mice of both sexes but, consistent with previous reports, Ca^{2+} transients were smaller in females^{20, 38, 39}. Overexpression of AT1R

reduced I_{CaL} and Ca^{2+} transients to a similar extent. Importantly, female AT1R had a smaller SR Ca^{2+} load, with a dramatically increased Ca^{2+} sparks and compromised SERCA2a function compared to the males. These modifications in Ca^{2+} handling parameters, along with the eccentric hypertrophy, could result in weaker ventricular contraction and increase the risk of delayed afterdepolarization.

We have previously shown that SERCA2a expression is significantly reduced in male AT1R mice¹⁹. Based on the longer time to 50% decay, it is very likely that female AT1R suffer from a more pronounced SERCA2a dysfunction or additional dysfunction in SERCA2a regulatory protein PLB. Indeed, it was shown in human and animal models of heart failure that PLB could be hypophosphorylated and thus exert a higher repression of SERCA2a activity⁴⁰. Together with an increase in Ca^{2+} sparks, these alterations would suggest that less SR Ca^{2+} is released during systole resulting in altered contraction efficiency.

In conclusion, our study shows that there are clear sex differences in the development of hypertrophy and heart failure. Indeed, both sexes of AT1R mice model develop HF_rEF even though women are more associated with HF_pEF which leads to suggest that a worse prognosis may be associated to female with HF_rEF. We found that the weaker Ca^{2+} dynamics in female mice render them much more susceptible to the effects of a greater hypertrophy thereby, worsening their prognosis. These findings along with other reports on sex differences help raise awareness to a clinically important issue and highlight the importance of better understanding the mechanisms underlying sex differences in cardiovascular diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank N. Ethier, M.A. Gillis, and L. Villeneuve for excellent technical assistance. We are also thankful to M. Laprise for the echocardiography measurements.

FOOTNOTES

This work was supported by operating grants to C. Fiset from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR-MOP-89934) and Quebec Heart and Stroke Foundation. S. Mathieu was a recipient of a PhD studentship from the Montreal Heart Institute and N. El Khoury held a PhD studentship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS).

DISCLOSURES

None

Table 1. Spontaneous SR release during Ca²⁺ transients recordings.

	M CTL	M AT1R	F CTL	F AT1R
Incidence (%)	13/18 (72%)	13/28 (46%)	14/28 (50%)	12/18 (67%)

The number of spontaneous SR Ca²⁺ release between the end of the field stimulated Ca²⁺ transient and the caffeine-induced Ca²⁺ transient. Data are presented as the number of cells with spontaneous activity on the total number of cells (incidence) and in %.

References

1. Maas A and Appelman Y. Gender differences in coronary heart disease. *Netherlands Heart Journal*. 2010;18:598-602.
2. Grohé C, Kahlert S, Löbberk K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H and Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors1. *FEBS Letters*. 1997;416:107-112.
3. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE and Schiebinger RJ. Androgen Receptors Mediate Hypertrophy in Cardiac Myocytes. *Circulation*. 1998;98:256-261.
4. Lizotte E, Grandy SA, Tremblay A, Allen BG and Fiset C. Expression, Distribution and Regulation of Sex Steroid Hormone Receptors in Mouse Heart. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2009;23:075-086.
5. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R and Regitz-Zagrosek V. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *The FASEB Journal*. 2006;20:926-934.
6. Roger VL. Epidemiology of Heart Failure. *Circulation Research*. 2013;113:646-659.
7. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ and Levy D. Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106:3068-3072.
8. Maeder MT and Kaye DM. Heart Failure With Normal Left Ventricular Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:905-918.
9. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB and Ho KL. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 1996;275:1557-1562.
10. Regitz-Zagrosek V and Seeland U. Sex and Gender Differences in Clinical Medicine. In: V. Regitz-Zagrosek, ed. *Sex and Gender Differences in Pharmacology*: Springer Berlin Heidelberg; 2012(214): 3-22.
11. Jessup M and Brozena S. Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 2003;348:2007-2018.
12. Yancy CW, Lopatin M, Stevenson LW, De Marco T and Fonarow GC. Clinical Presentation, Management, and In-Hospital Outcomes of Patients Admitted With Acute Decompensated Heart Failure With Preserved Systolic Function: A Report From the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) Database. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:76-84.

13. Gerds E, Okin PM, de Simone G, Cramariuc D, Wachtell K, Boman K and Devereux RB. Gender Differences in Left Ventricular Structure and Function During Antihypertensive Treatment: The Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. *Hypertension*. 2008;51:1109-1114.
14. Kannel WB, McGee DL and Schatzkin A. An epidemiological perspective of sudden death. 26-year follow-up in the Framingham Study. *Drugs*. 1984;28 Suppl 1:1-16.
15. Koplán BA and Stevenson WG. Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009;84:289-297.
16. Kurokawa J and Abriel H. Neurohormonal Regulation of Cardiac Ion Channels in Chronic Heart Failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009;54:98-105.
17. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FoW, Thibault Gt and Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97:931-936.
18. Rivard K, Paradis P, Nemer M and Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovascular Research*. 2008;78:53-62.
19. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG and Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301:H2018-H2027.
20. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A and Fiset C. Gender-Based Differences in Cardiac Repolarization in Mouse Ventricle. *Circulation Research*. 2001;89:437-444.
21. Brouillette J, Clark RB, Giles WR and Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 2004;559:777-798.
22. Grandy SA, Brouillette J and Fiset C. Reduction of Ventricular Sodium Current in a Mouse Model of HIV. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2010;21:916-922.
23. El Khoury N, Mathieu S and Fiset C. Interleukin-1 β Reduces L-type Ca²⁺ Current through Protein Kinase C ϵ Activation in Mouse Heart. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:21896-21908.
24. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ and Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:6975-6980.

25. The Consensus Trial Study Group. Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 1987;316:1429-1435.
26. The SOLVD Investigators. Effect of Enalapril on Survival in Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions and Congestive Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 1991;325:293-302.
27. Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annual Review of Physiology*. 2008;70:23-49.
28. Fares E, Parks RJ, MacDonald JK, Egar JMS and Howlett SE. Ovariectomy enhances SR Ca²⁺ release and increases Ca²⁺ spark amplitudes in isolated ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012;52:32-42.
29. Wenger NK. You've Come a Long Way, Baby: Cardiovascular Health and Disease in Women: Problems and Prospects. *Circulation*. 2004;109:558-560.
30. Liu L. Changes in Cardiovascular Hospitalization and Comorbidity of Heart Failure in the United States: Findings from the National Hospital Discharge Surveys 1980–2006. *International Journal of Cardiology*. 2011;149:39-45.
31. Liu L and Eisen HJ. Epidemiology of Heart Failure and Scope of the Problem. *Cardiology Clinics*. 2014;32:1-8.
32. Deo R and Albert CM. Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circulation*. 2012;125:620-637.
33. Albert CM, McGovern BA, Newell JB and Ruskin JN. Sex Differences in Cardiac Arrest Survivors. *Circulation*. 1996;93:1170-1176.
34. Goldberger JJ, Basu A, Boineau R, Buxton AE, Cain ME, Canty JM, Chen PS, Chugh SS, Costantini O, Exner DV, Kadish AH, Lee B, Lloyd-Jones D, Moss AJ, Myerburg RJ, Olgin JE, Passman R, Stevenson WG, Tomaselli GF, Zareba W, Zipes DP and Zoloth L. Risk Stratification for Sudden Cardiac Death: A Plan for the Future. *Circulation*. 2014;129:516-526.
35. Kim C, Fahrenbruch CE, Cobb LA and Eisenberg MS. Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Men and Women. *Circulation*. 2001;104:2699-2703.
36. Buxton AE, Hafley GE, Lehmann MH, Gold M, O'Toole M, Tang A, Coromilas J, Hook B, Stamato NJ, Lee KL and Investigators ftMUTT. Prediction of Sustained Ventricular Tachycardia Inducible by Programmed Stimulation in Patients With Coronary Artery Disease: Utility of Clinical Variables. *Circulation*. 1999;99:1843-1850.
37. Bashore TM, Granger CB, Jackson K and Patel MR. Heart Disease. In: M. A. Papadakis, S. J. McPhee and M. W. Rabow, eds. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2015* New York, NY: McGraw-Hill Education; 2014.
38. Parks RJ, Ray G, Bienvenu LA, Rose RA and Howlett SE. Sex differences in SR Ca²⁺ release in murine ventricular myocytes are regulated by the

cAMP/PKA pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;75:162-173.

39. Farrell SR, Ross JL and Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299:H36-45.
40. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG and Molkenin JD. PKC-[alpha] regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*. 2004;10:248-254.

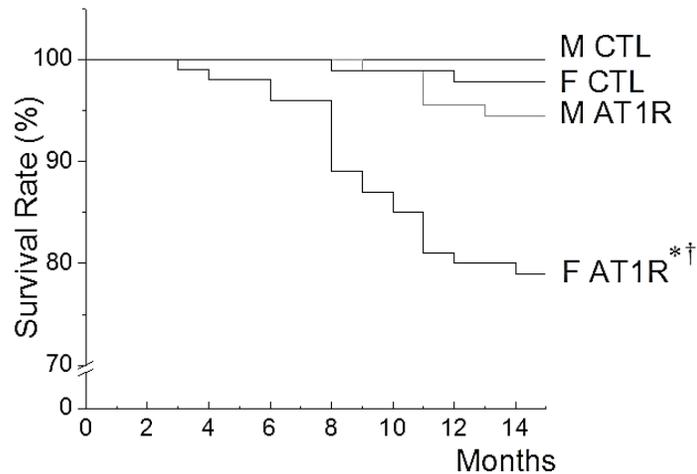


Figure 1. Early onset of mortality along with a higher rate is observed in female AT1R mice compared to males. The graph represents the percentage of survival of CTL and AT1R mice of both sexes (M, F) between 0 and 15 months old. (* $p < 0.05$ vs. sex-matched CTL, † $p < 0.05$ vs. M AT1R; M: CTL N=107, AT1R N=91, F: CTL N=91, AT1R N=100).

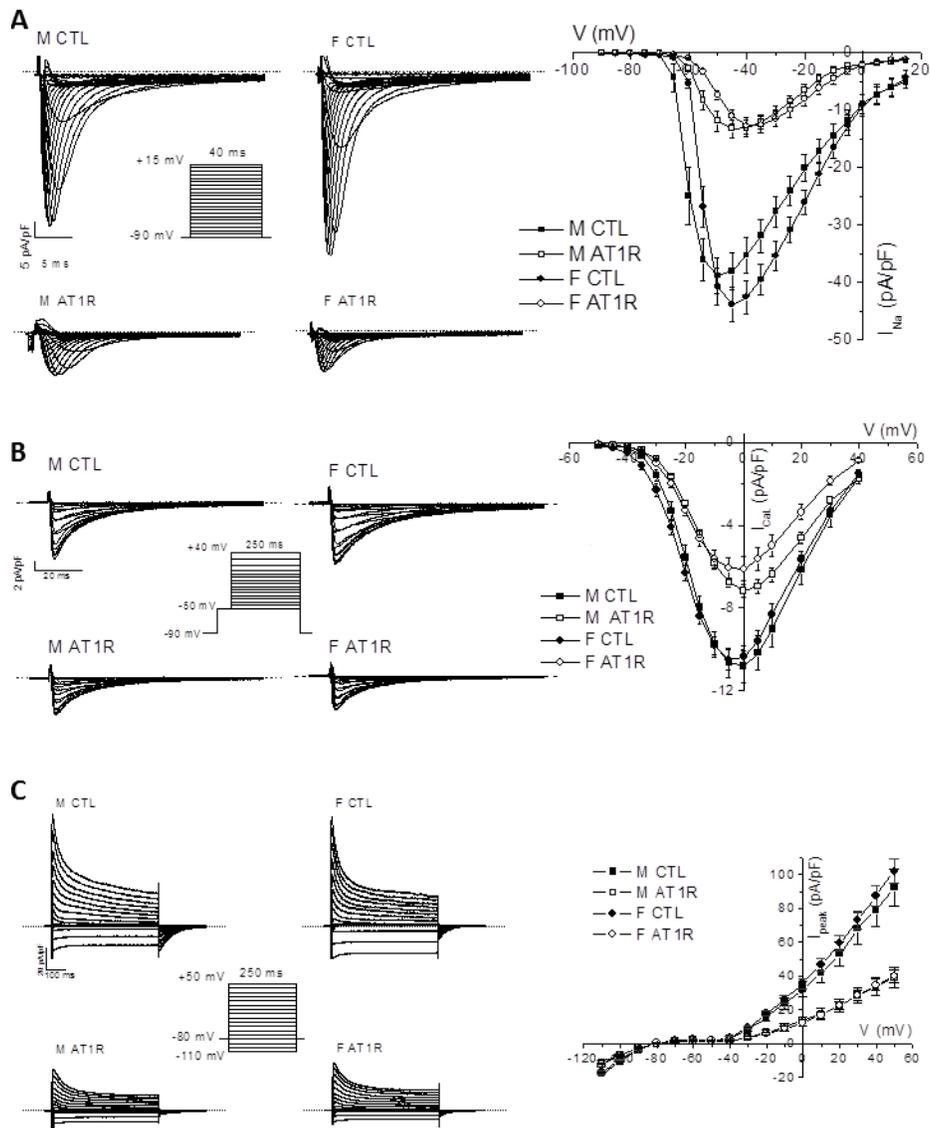


Figure 2. Ventricular myocyte ionic currents are similarly reduced in male and female AT1R mice in comparison to CTL. A) Representative ventricular I_{Na} recorded with the voltage-clamp protocol in the inset in CTL and AT1R myocytes of both sexes. Mean data were plotted in a current-voltage relationships graph demonstrating that the reduction caused by AT1R overexpression is similar in male (M) (CTL: n=13, AT1R: n=16) and female (F) (CTL: n=21, AT1R n=18). B) Typical I_{CaL} traces are presented and mean IV curves show that I_{CaL} is reduced to the same extent in male and female AT1R mice (M: n=8, F: n=10) in comparison to CTL (M: n=6, F: n=21). The voltage protocol used is shown in the inset. C) Representative I_{peak} recordings from all groups as well as the voltage-clamp protocol are displayed. Mean IV curves also demonstrate that AT1R overexpression similarly reduces I_{peak} in males (CTL: n=15, AT1R n=11) and females (CTL n=13, AT1R n=15). Male data for I_{Na} and I_{peak} presented in this figure represent a subset of the data presented in Mathieu S. *et al.* (in revision for Heart Rhythm) and Rivard *et al.*¹⁸, respectively.

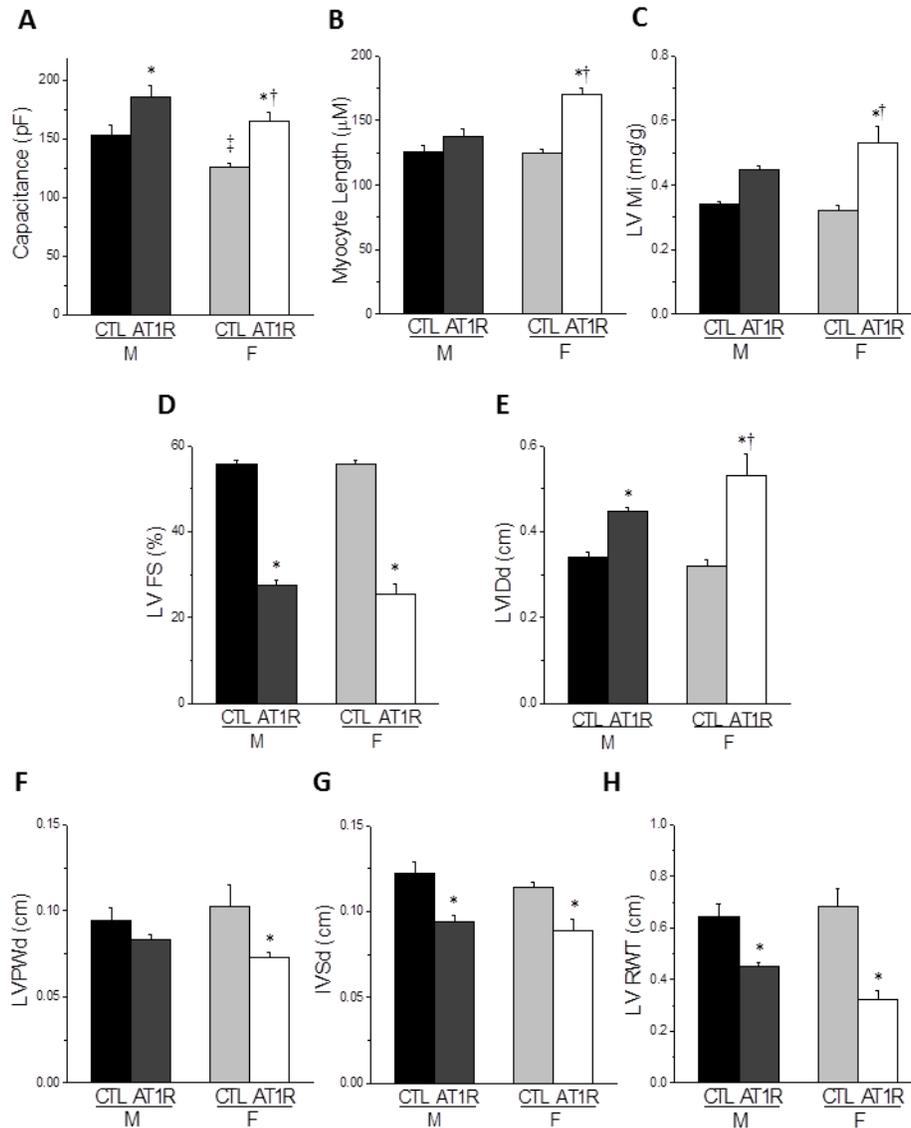


Figure 3. Female AT1R mice develop more severe ventricular hypertrophy than AT1R males. A) The myocyte capacitance of CTL and AT1R mice of both sexes was obtained by patch-clamp technique (M: CTL n=20, AT1R n=24; F: CTL n=41, AT1R n=31). B) The myocyte length of CTL and AT1R myocyte of both sexes is presented. (M: CTL n=19, AT1R n=11; F: CTL n=34, AT1R n=25). LV Short axis view two-dimensional guided M-mode echocardiography was performed in CTL and AT1R mice of both sexes under conscious sedation to determine the left ventricular mass index (LV Mi), the ratio between LV mass and the mouse weight (C), to assess left ventricular fractional shortening (LV FS) representing systolic function (D), the LV internal diameter at end diastole (LVIDd) (E), the LV posterior wall (LVPWd) (F) and the interventricular septum thickness (IVSd) (G) and the LV relative wall thickness (LV RWT) (H) (M: CTL N=7, AT1R N=7; F: CTL N=5, AT1R N=8). Echocardiography values of CTL and AT1R male mice presented in this figure represent a subset of the data published in ^{18,19} (* p <0.05 vs. sex-matched CTL, † p <0.05 versus M AT1R).

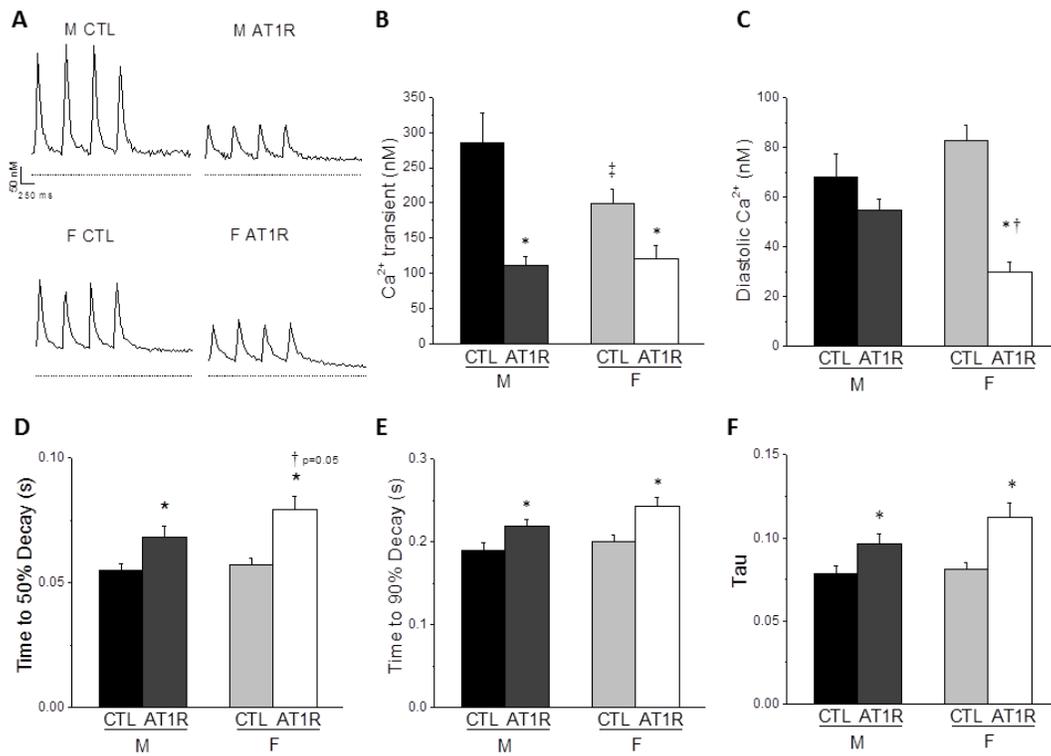


Figure 4. Alterations in Ca²⁺ homeostasis are greater in female than male AT1R myocytes. A) Typical traces of Ca²⁺ transients recorded at 2 Hz in male (M) and female (F) myocytes of AT1R and control (CTL) mice are shown. The dashed line indicates 0 nmol/L Ca²⁺. Ca²⁺ transients (B), diastolic Ca²⁺ (C), time to 50% decay (D), time to 90% decay (E) and tau (F) were measured in control (CTL) and AT1R myocytes of both sexes. (**p*<0.05 vs. sex-matched CTL, † *p*<0.05 versus M AT1R, ‡ *p*<0.05 versus M CTL, M CTL n=18, M AT1R n=28, F CTL n=28, F AT1R, n=18).

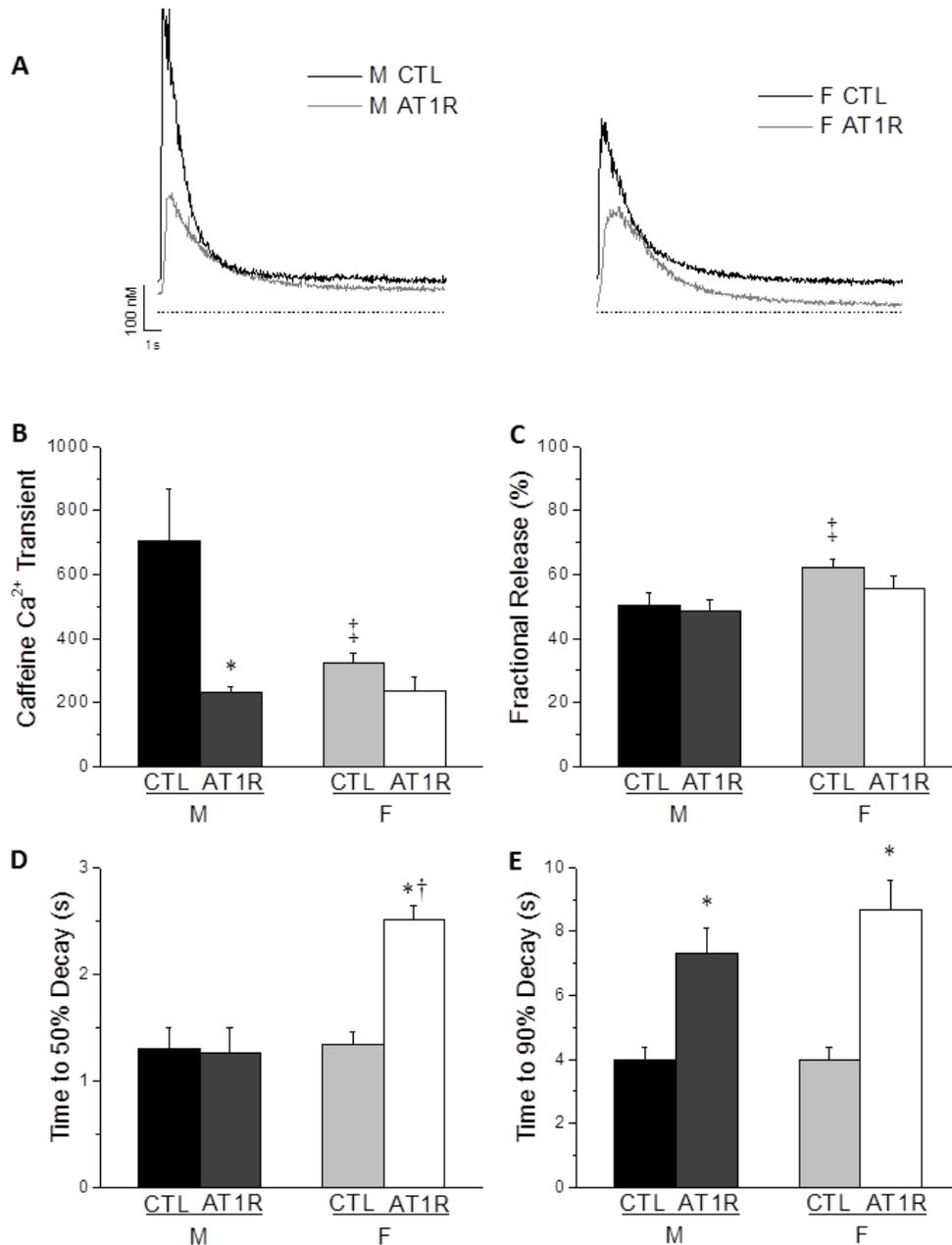


Figure 5. Caffeine-induced Ca²⁺ transients are differently affected in male and female AT1R myocytes. A) Representative recordings of caffeine-induced Ca²⁺ transients in male (M) and female (F) myocytes of CTL and AT1R mice are shown. B) Mean data for caffeine-induced Ca²⁺ transients show that female have lower SR load than male in CTL conditions and that SR load is only reduced in male AT1R myocytes. C) Fractional release defined as the ratio of electrically stimulated Ca²⁺ transient amplitude over the caffeine-induced Ca²⁺ transient is increased in female CTL in comparison to males. Time to 50% decay (D) and time to 90% decay (E) were determined in CTL and ATR1 myocytes of both sexes. (**p*<0.05 vs. sex-matched CTL, † *p*<0.05 versus M AT1R, ‡ *p*<0.05 versus M CTL, M CTL n=18, M AT1R n=22, F CTL n=28, F AT1R n=14).

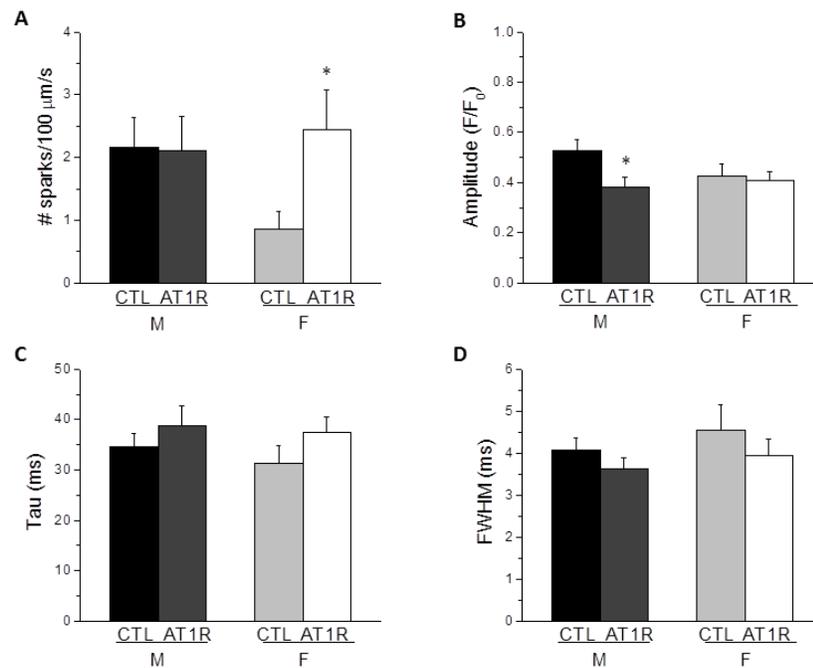


Figure 6. Ca^{2+} sparks frequency is increased in female AT1R myocytes in comparison to CTL females while it remained unchanged in males. A) AT1R overexpressing caused no change in sparks frequency in male myocytes (CTL $n=31$, AT1R $n=13$) whereas the frequency drastically increased in female AT1R in comparison to sex-matched (CTL $n=22$, AT1R $n=20$). B) Sparks amplitude is decreased in male AT1R myocytes in comparison to CTL (CTL $n=24$, AT1R $n=11$) but did not differ between females (CTL $n=12$, AT1R $n=18$). C-D) AT1R overexpression did not affect Tau or FWHM (full width at half maximum) in both sexes. (* $p < 0.05$ vs. sex-matched CTL)

DATA SUPPLEMENT

Female Mice with Human Angiotensin II Type 1 Receptor Overexpression are More Susceptible to Develop Dilated Hypertrophy and Mortality

Mathieu S. *et al.*

METHODS

Animals

Heterozygous male and female C57BL/6 AT1R (human angiotensin II type 1 receptor, *AGTRI*) mice aged of 6–8 months old (presence of hypertrophy) and their sex and age-matched wild-type littermate controls (CTL) were used to study cardiac systolic dysfunction, hypertrophy and electrical remodeling. AT1R mice colony was followed from birth to 15 months of age and deaths were counted for the entire duration of the survival study. Generation of the AT1R mice with cardiac specific overexpression of the human AT1R has been previously published¹. Briefly, cardiomyocyte overexpression was achieved by expression of the human AT1R under the control of the α myosin heavy chain (*Myh6*) promoter. All animal protocols were conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The Montreal Heart Institute Animal Care Committee has also approved the animal procedures used in this study (reference number 2014-08-01).

Ventricular mouse myocytes isolation

Briefly, mice were administered heparin i.p. 15 minutes prior to anesthesia by isoflurane to avoid blood coagulation and were sacrificed by cervical dislocation. Then, their heart was rapidly excised and hung on a modified Langendorff apparatus and retrogradely perfused at 37°C (2 mL/min). The first solution, a HEPES-buffered Tyrode's solution containing (in mmol/L): 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 HEPES, 5.5 glucose (pH was adjusted to 7.4

with NaOH) was perfused. After, Ca^{2+} was washed out by changing to a Ca^{2+} free HEPES-buffered Tyrode's solution. Thirdly, the heart was digested for 21-29 minutes with the Ca^{2+} free HEPES-buffered Tyrode's solution in which was added (in mmol/L) 0.03 CaCl_2 , 20 taurine and 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Co., St Louis, Mo, USA) and 73.7 U/ml type II collagenase (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA). Lastly, Kraft-Brühe (KB) solution containing (in mmol/L): 100 K-glutamate, 10 K-aspartate, 25 KCl, 10 KH_2PO_4 , 2 MgSO_4 , 20 taurine, 5 creatine, 0.5 EGTA, 5 HEPES, 20 glucose, 0.1% BSA (pH to 7.2 with KOH) was perfused for the last 5 minutes. For Ca^{2+} imaging experiments, EGTA was removed from the KB solution. Next, the heart was removed and the right ventricle free wall was minced into the KB solution. Isolated ventricular myocytes were obtained by titration and conserved at 4°C in KB until used on the same day.

Surface electrocardiogram (ECG)

ECG were performed as previously described ². Mice were anaesthetized with isoflurane (2%). Mouse body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Platinum electrodes were positioned subcutaneously and surface ECG was acquired in lead I configuration at the rate of 2 kHz using the Biopac acquisition System MP100 (EMKA Technologies, Paris, France). The signal was amplified, filtered at 100 Hz (low-pass) and 60 KHz (notch filter). Data were analyzed using ECG auto v2.8.1.18 (EMKA Technologies, Paris, France). Duration of QRS complex, QT interval and heart rate was measured by a blinded observer from signal averaged ECG recordings (500-1000 cardiac cycles). The QT intervals were corrected (QTc) for the heart rate using the adapted Bazett's formula in mice ($\text{QTc} = \text{QT} / (\text{RR}/100)^{1/2}$).

Patch-clamp

Voltage-clamp experiments were realized in whole-cell configuration using borosilicate glass pipettes (WPI, Sarasota, FL, USA) of maximum 3 M Ω resistance for I_{Na} recordings and were between 3-5 M Ω for I_{CaL} and I_{peak} . For I_{Na} recordings, the internal solution (in mmol/L): 132.5 CsF, 5 NaCl, 5 MgATP, 10

EGTA, 5 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH). Sodium current (I_{Na}) from mouse ventricular myocytes were measured at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with the external solution containing (in mmol/L): 132.5 CsCl, 5 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glucose (pH adjusted to 7.35 with CsOH) as previously reported³. Adult ventricular mouse myocytes were held at -90 mV, I_{Na} was obtained by imposing 40 ms voltage step from -90 to +15 mV at a frequency of 0.2 Hz. I_{CaL} recordings were performed at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ with the external solution containing (mmol/L): 145 TEACl, 10 CsCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 5 HEPES, 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with CsOH) and the internal solution used was composed of (mmol/L): 100 Aspartic Acid, 70 CsOH, 40 CsCl, 2 MgCl₂, 4 MgATP, 10 EGTA, 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH), currents were corrected for a junction potential of 10 mV. Myocytes were held at -90 mV, a 50ms prepulse at -50mV was performed to inactivate T-type Ca²⁺ currents and I_{CaL} was obtained by imposing a series of voltage steps from -50 mV to +40 mV, each lasting 250 ms at a frequency of 0.1 Hz. Total K⁺ currents were recorded at room temperature using the bath solution (in mmol/L): 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 HEPES, 5.5 glucose (pH was adjusted to 7.4 with NaOH) and the pipette solution (in mmol/L): 110 potassium aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 BAPTA, 4 K₂ATP and 10 Hepes (pH 7.2 with KOH), a junction potential of 10 mV was taken into account during the analysis. Traces were elicited by a 500 ms voltage-clamp step applied in 10 mV increments from -110 to +50 mV, from a holding potential of -80 mV at a frequency rate of 0.1 Hz. All currents protocols were performed and data acquired with Clampex 8.0 and 10.2 (Molecular Devices, Foster City, USA). Voltage-clamp recordings were low-pass filtered (2 kHz (I_{Na} : 2 KHz, I_{CaL} and I_{peak} : 1 KHz) and digitized at (10,000 KHz). Series resistance were compensated at 75%. All currents were normalized to cell capacitance.

Echocardiography

Echocardiography was performed as described previously^{2, 4}. Briefly, the day before echocardiography, the mice were anesthetized (2 % isoflurane, 1 L/min O₂), and their anterior chest was shaved. The following day, echocardiography was

performed using a Hewlett–Packard Sonos 5500 and a 15-MHz linear-array transducer (Agilent, Palo Alto, CA) in mice under conscious sedation with 15 $\mu\text{L/g}$ i.p. of a 1:1 mixture of fentanyl (5 $\mu\text{g/ml}$) and droperidol (250 $\mu\text{g/ml}$). The mice were secured lightly in the left lateral decubitus position on a warming pad to maintain normothermia. To improve the near-field image for visualization of the interventricular septum, a standoff for the transducer tip was used. A 3- to 5-mm-thick 1% agarose pad was inserted between the chest of the mice and the transducer. The montage was sealed acoustically with prewarm acoustic coupling gel. Two-dimensional guided M-mode images were obtained from a short axis view at the papillary muscle level to determine the left ventricle (LV) structure and systolic function. The LV internal diameter in diastole (LVIDd) and systole (LVIDs) and the interventricular septum and LV posterior wall thickness in diastole (IVSd and LVPWd) were measured and the LV mass and fractional shortening calculated as previously described ⁵. LV mass index (LVMI) and relative wall thickness (RWT) were determined as follows: LVMI (mg/g) = LV mass \times 0.8/body weight and LV RWT = (IVSd + LVPWd)/LVIDd.

Ca²⁺ Transients

Experiments were performed accordingly to ⁶ and ⁷. Ventricular myocytes were incubated 15 minutes in the dark with 10 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2AM (Molecular Probes). Bath was previously coated with laminin and perfused at $37\pm 1^\circ\text{C}$ with the HEPES-buffered Tyrode's solution containing (in mmol/L): 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 HEPES, 5.5 glucose (pH was adjusted to 7.4 with NaOH). Myocytes were field stimulated at a frequency of 2 Hz with a pair of bipolar platinum electrodes (Grass SD9 stimulator). Transients were recorded for 10 s before stopping stimulation and perfusing with a HEPES-buffered Tyrode's Ca²⁺ free solution in which was added 10 mmol/L caffeine. Caffeine induced transients were obtained by rapidly perfusing the caffeine solution for 1 s using a stylus perfusion system to estimate the SR load. Values were acquired using the 380/340 nm ratio. Rmin and Rmax values were obtained using Ca²⁺ free Tyrode solution with 5mmol/L EGTA or 10mmol/L ionomycin with 5mmol/L CaCl₂

respectively. Calibration curve assay allows us to obtain the experimental K_d was of 0.433 in order to calculate internal Ca^{2+} concentration. Ca^{2+} concentration were calculated using the formula: $[Ca^{2+} = K_d \left[\frac{(R-R_{min})}{(R_{max}-R)} \right]]$. Data were acquired and converted with Felix4.1.0 (Photon Technologies International (PTI), Birmingham, NJ) and analysis was executed with Clampfit 10.2 (Molecular Devices, Foster City, USA).

Ca²⁺ sparks

The protocol and experimental conditions used were similar to Fares *et al.* ⁶. Myocytes were incubated in the dark for 20 minutes with 10 μ mol/L Fluo-4AM (Molecular Probes) and 0.05% pluronic acid. Cells were placed in the bath on the stage of a Zeiss LSM 710 laser scanning microscope in linear scan mode. Bath was perfused at $35 \pm 1^\circ C$ with the following solution (in mmol/L): 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 HEPES, 5.5 glucose (pH was adjusted to 7.4 with NaOH). Line scan images were acquired at 525nm, pinhole size: 98 μ m, scan speed of 264.55 lines/s, and 512pixels/line, laser intensity of 20% using argon laser (488nm) and LSM software (version 3.2, Carl Zeiss Canada Ltd). Sparks were measured in line scan mode for 6 s in quiescent cells. Ca^{2+} spark frequency was measured using Image J plugin SparkMaster. SparkMaster parameters were set speed 264.55 lines/s, 0.264 μ m pixel size, background fluorescence was measured on each recording, criteria =3.8, number of intervals = 1, output = F/F₀ + sparks, extended kinetics). Extended bright lines were excluded from the analysis. A manual inspection was performed for each recording after the automated analysis to remove false positive.

References

1. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FoW, Thibault Gt and Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97:931-936.
2. Rivard K, Paradis P, Nemer M and Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovascular Research*. 2008;78:53-62.
3. Grandy SA, Brouillette J and Fiset C. Reduction of Ventricular Sodium Current in a Mouse Model of HIV. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2010;21:916-922.
4. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ and Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:6975-6980.
5. Yang X-P, Liu Y-H, Rhaleb N-E, Kurihara N, Kim HE and Carretero OA. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 1999;277:H1967-H1974.
6. Fares E, Parks RJ, MacDonald JK, Egar JMS and Howlett SE. Ovariectomy enhances SR Ca²⁺ release and increases Ca²⁺ spark amplitudes in isolated ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012;52:32-42.
7. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG and Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301:H2018-H2027.

5. Discussion

5.1 Résumé des projets de thèse

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité au monde ¹. L'amélioration des thérapies et le vieillissement de la population ont favorisé l'émergence de l'IC qui est associée à une mortalité importante. Bien que plusieurs thérapies aient été développées dans le but d'améliorer l'IC, elles ne parviennent qu'à freiner son développement. Dans cette perspective, les travaux présentés dans cette thèse se sont penchés sur les effets pathologiques de l'ANGII dans l'activité électrique et contractile entre les sexes. De ces études se sont ensuivies de nouvelles conclusions; la PKC α est impliquée dans la modulation du courant Na⁺ en réponse à l'ANGII et les femelles sont plus susceptibles à la surexpression du récepteur AT1. En somme, ces projets démontrent un potentiel thérapeutique pour la PKC α en plus d'offrir de nouvelles pistes de recherche, d'encourager la poursuite d'étude comparative entre les sexes et l'élaboration de stratégies thérapeutiques personnalisées visant l'amélioration de la santé des hommes et des femmes.

5.1.1 Commentaire et perspectives de l'étude 1

Des études *in vivo* sur les souris AT1R mâles ont permis de mettre en évidence que celles-ci souffraient de troubles de conduction ventriculaire en raison d'une prolongation du complexe QRS sur les ECG de surface et en cœur isolé (données non présentées) avant (50d) comme après (6m) le développement d'hypertrophie. Par la suite, des études réalisées sur les myocytes ventriculaires isolés ont permis de constater un ralentissement de la vitesse de dépolarisation de la phase 0 du potentiel d'action qui survient indépendamment de l'hypertrophie. Puisque ces résultats suggéraient une altération de la conduction, les courants Na⁺, étant les principaux régulateurs de celle-ci, ont été mesurés par technique de patch-clamp. Leur densité était réduite d'au moins 60 % chez les souris AT1R des deux

groupes d'âge, mais cette diminution ne pouvait être expliquée par un changement de l'expression du canal correspondant. En effet, avant le développement d'hypertrophie l'expression d'ARNm et de protéines n'était pas altérée alors qu'en présence d'hypertrophie leurs niveaux étaient réduits d'environ 25 %. Cette réduction en présence d'hypertrophie ne peut pas expliquer à elle seule une réduction de courant de 60 %. De surcroît, le courant Na^+ est réduit de façon similaire chez les souris AT1R des deux âges ce qui suggère qu'un autre mécanisme, indépendant de l'hypertrophie, est responsable de la régulation du courant Na^+ chez ces souris. De ce fait, parmi les seconds messagers de la voie de signalisation du récepteur AT1, les PKC ont été choisies puisqu'elles peuvent moduler le canal Na^+ ^{127, 128, 253-255}. Premièrement, la translocation des PKC à la membrane est un indice de leur activité, ainsi, leur expression au niveau des protéines sarcolemmales a été mesurée. La PKC α était la seule isoforme dont l'activité était augmentée chez les souris AT1R, et ce, indépendamment de l'hypertrophie. La relation entre l'ANGII, la PKC α et le courant Na^+ a été validée avec l'utilisation d'un modèle de hiPSC-CM permettant de conserver les cellules en culture pour la durée totale du traitement. L'ANGII a réduit le courant Na^+ chez les hiPSC-CM et cet effet a été renversé par un peptide inhibiteur de la translocation de la PKC α , confirmant ainsi une relation cause à effet entre ceux-ci.

Plusieurs conclusions découlent de ce premier projet. Tout d'abord, l'activation chronique du récepteur AT1 entraîne des défauts de conduction indépendamment du remodelage hypertrophique. En effet, chez les patients avec une ICrEF, une prolongation du QRS est considérée comme un facteur de risque grave associé au développement d'arythmies ventriculaires, de morts subites cardiaques ^{256, 257} et de dysfonction ventriculaire gauche ²⁵⁸. Si, comme chez la souris AT1R, les altérations du courant Na^+ surviennent avant le développement d'IC chez l'humain, il pourrait être bénéfique de commencer la thérapie plus tôt soit avant l'apparition d'un remodelage hypertrophique. Ainsi, il serait intéressant de vérifier que le traitement avec un ARA dès un jeune âge pourrait prévenir le remodelage ionique, mais aussi devenir un traitement prophylactique au

développement d'hypertrophie. Il est à noter que nos données ont été obtenues uniquement chez les souris mâles et donc de futures études chez les souris femelles sont nécessaires afin de valider cette régulation avant de transiter chez l'homme. Toutefois, les femelles AT1R démontrent une réduction similaire du courant Na^+ et donc, sembleraient pouvoir autant bénéficier d'un ARA. De plus, une réduction du courant Na^+ causée par une mutation du canal correspondant est associée au développement d'une cardiomyopathie dilatée. Ce résultat met en évidence un rôle pour le canal Na^+ dans le remodelage structurel^{259, 260}. Bref, l'allongement du QRS chez un individu sans hypertrophie pourrait indiquer le développement futur d'une IC et que l'administration d'un ARA serait profitable.

Deuxièmement, la réduction du courant Na^+ chez la souris AT1R ne dépend pas d'une régulation de l'expression du canal comme dans le cas des canaux K^+ et Ca^{2+} ^{84, 85}. Cette particularité pourrait corroborer à l'hypothèse de l'existence d'une réserve de canaux Na^+ du côté intracellulaire de la membrane¹¹². Par conséquent, cette régulation du nombre de canaux actifs à la membrane serait indépendante d'un changement des niveaux d'ARNm et contribuerait à expliquer pourquoi autant de protéines sont impliquées dans la régulation du courant Na^+ ²⁶¹.

Troisièmement, la $\text{PKC}\alpha$ a été identifiée comme l'isozyme responsable de la modulation du courant Na^+ en réponse à un traitement à l'ANGII dans des cellules cardiaques humaines. Toutefois, l'interaction directe ou non de la $\text{PKC}\alpha$ avec le canal n'a pas été déterminée au cours de ce projet. En revanche, une interaction directe est possible puisque deux sites de phosphorylation de la PKC existent sur le canal Na^+ ^{127, 261}. La phosphorylation du canal par $\text{PKC}\alpha$ pourrait diminuer sa probabilité d'ouverture ce qui pourrait être mesurée par la technique de patch-clamp en mode canal unitaire. La $\text{PKC}\alpha$ pourrait aussi affecter les cinétiques d'ouverture ou de fermeture en modifiant la sensibilité au voltage du canal. Il a été démontré que la $\text{PKC}\alpha$ déplace l'inactivation vers des voltages plus hyperpolarisés ce qui entraînerait une diminution de la probabilité d'ouverture¹²⁷. Une autre explication provient du fait que l'activation de la $\text{PKC}\alpha$ favoriserait l'internalisation du canal Na^+ puisque les PKC conventionnelles ont été associées

à cette modulation dans des modèles cellulaires (HEK) ¹²⁸. Des expériences futures sur des modèles *in vivo* sont donc nécessaires afin de valider cette possibilité. Également, cette étude de Hallaq *et al.* suggère que les ROS sont aussi impliquées dans la voie de signalisation impliquant les PKC et l'internalisation du canal Na⁺. Nous avons donc cru intéressant de mesurer le niveau des ROS dans les cardiomyocytes puisque l'activation du récepteur AT1 est associée à une élévation des ROS et que les PKC peuvent être modulées par les ROS ^{59, 262}. Selon nos résultats préliminaires dans les cellules hiPSC-CM, le ROS ne semble pas être impliqué dans une interaction directe avec le canal. En effet, en utilisant une sonde fluorescente sensible au ROS (CM-H₂DCFDA), les hiPSC-CM traitées à l'ANGII ont montré une augmentation du ROS qui n'a pas été renversée par le traitement du peptide α V5-3 malgré la récupération de la densité du courant Na⁺. Ce résultat suggère que le ROS agirait en amont de la PKC α ou qu'il ne serait pas impliqué dans cette régulation.

D'autres part, une étude a montré que la PKC α serait principalement localisée aux disques intercalaires des cardiomyocytes suggérant que la diminution du courant Na⁺ ventriculaire des souris AT1R proviendrait d'une perte de la fonction des canaux situés aux disques intercalaires ⁷³. En général, les canaux Na⁺ sont importants dans la conduction et la propagation de l'influx et ceux localisés aux disques intercalaires sembleraient participer principalement à l'initiation de la dépolarisation cellulaire en raison d'une excitabilité plus grande, d'une activation plus précoce et de leur interaction avec les jonctions communicantes comme la connexine 43 (Cx43) majoritairement présente dans les ventricules ^{108, 263, 264}. En raison du rôle important de la Cx43 dans la conduction il pourrait également être intéressant de vérifier son expression. De plus, la diminution de la conduction pourrait également être évaluée par la méthode de cartographie optique (« *optical mapping* »). Ainsi, la diminution du courant Na⁺ par PKC α aux disques intercalaires pourrait expliquer les problèmes de conduction reportés chez la souris AT1R. De ce fait, plusieurs études ont mis en évidence des populations différentes de canaux Na⁺ situées aux disques intercalaires et aux membranes latérales qui

sont modulées différemment^{117, 261, 263}. Ces hypothèses n'excluent pas la possibilité que le courant Na^+ provenant des canaux localisés au niveau de la membrane latérale ou au niveau des tubules transverses par les canaux Na_V neuronaux puisse aussi être diminué. Des études futures seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle physiologique et pathologique de ces diverses populations de canaux Na^+ .

5.1.2 Commentaire et perspectives de l'étude 2

La conceptualisation du deuxième projet a été envisagée à la suite de l'observation que les souris femelles AT1R décèdent en plus grand nombre. En effet, cette constatation a suscité notre intérêt afin de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents à cette différence. En premier lieu, ces mortalités ont été associées à des morts subites puisque les souris ne démontraient pas de signes d'inconfort antérieurement au décès. Les morts subites résultent généralement d'une défaillance cardiaque ce qui suggère que les souris AT1R seraient décédées à la suite d'une mort subite cardiaque. Les deux principales causes de mort subite cardiaque associées à l'IC sont les arythmies et les sidérations ventriculaires ce qui nous a amenés à réaliser des expériences évaluant le remodelage électrique et structurel des ventricules des souris AT1R mâles et femelles. Nous avons trouvé que la conduction et la repolarisation étaient affectées de façon similaire chez les souris AT1R indépendamment de leur sexe (données supplémentaires Annexe II, p.ix). Ensuite, la fonction et l'hypertrophie cardiaque ont été évaluées par échographie et ont démontré une dilatation et une hypertrophie plus sévère du ventricule gauche chez les femelles AT1R comparativement aux mâles AT1R. Il est intéressant de mentionner que chez l'humain, un traitement de losartan (ARA) ou d'aténolol (β -bloquant) ne renverse pas autant l'hypertrophie chez les femmes que chez les hommes pour une même réduction de la pression artérielle. Cette différence peut suggérer une plus grande sensibilité des femmes au SRAA ou bien l'implication d'une voie auxiliaire dans le développement de l'hypertrophie chez celles-ci¹². Subséquemment, les expériences de transitoire calcique ont démontré un Ca^{2+} diastolique plus bas et un ralentissement de l'extrusion plus important

chez les femelles AT1R. De plus, la fréquence d'étincelles calciques chez les femelles AT1R est plus élevée pouvant favoriser des arythmies de type post-dépolarisations tardives. En résumé, les modifications structurales et les altérations de l'homéostasie calcique plus sévères chez les femelles AT1R pourraient contribuer à expliquer leur mortalité plus importante. De plus, cette étude laisse croire que les femelles sont plus sensibles à la surexpression du récepteur AT1. Ces travaux ouvrent la voie à plusieurs pistes de recherche afin d'approfondir les connaissances quant à la régulation de l'ANGII entre les sexes.

En premier lieu, la susceptibilité aux arythmies ventriculaires a été évaluée entre les souris AT1R mâles et femelles. Pour ce faire, des expériences de stimulation électrique programmée (EPS) réalisées à l'aide d'un cathéter intracardiaque ont été tentées. Toutefois, les expériences ont été arrêtées puisque le cœur des femelles AT1R devenait asystolique après l'insertion du cathéter alors que chez les mâles et les femelles contrôles la mise en place du cathéter était tolérée. La mortalité a été répertoriée dans les proportions suivantes : F AT1R : N=3/3, M AT1R : 0/5, F CTL : N=1/5, M CTL : N=0/5 où N : nombre d'animaux. Néanmoins, cette observation non quantitative démontre une sensibilité importante des femelles AT1R à une situation de « stress ».

En second lieu, la régulation entre les sexes des systèmes à l'origine du développement et de l'exacerbation de l'IC, le système sympathique et le SRAA, demeure indéfinie. Ainsi, différentes mesures plasmatiques ont été réalisées afin d'examiner les fluctuations de facteurs neurohumoraux. Il est intéressant de noter que la concentration plasmatique d'épinéphrine chez les femelles AT1R est élevée en comparaison aux autres groupes, mais que les niveaux d'ANGII plasmatique sont similaires entre les souris CTL et AT1R des deux sexes (données non présentées). D'une part, ces résultats indiquent que la surexpression du récepteur AT1 ne conduit pas à une baisse des niveaux systémiques d'ANGII. D'autre part, l'augmentation d'épinéphrine plasmatique chez les femelles AT1R suggère une compensation du système adrénergique chez celles-ci. Des études futures sur la modulation du système adrénergique cardiaque par l'ANGII pourraient être

pertinentes. D'ailleurs, plusieurs études suggèrent que la réponse calcique et contractile des femelles à une stimulation β -adrénergique est inférieure à celle des mâles^{209, 212, 265-267}. Cette différence est renversée par l'ovariectomie ce qui suggère un rôle pour les hormones féminines dans cette régulation. Plusieurs études ont examiné la contribution des récepteurs β -adrénergiques et ont montré des résultats variables soit une expression similaire^{212, 265, 268} ou moindre^{267, 269} chez les femelles. Donc, chez les femelles de type sauvage la réponse β -adrénergique est déjà altérée. En plus, en IC la réponse des récepteurs β -adrénergiques est diminuée^{51, 270}. Par conséquent, l'augmentation de l'adrénaline chez les femelles AT1R semblerait être un mécanisme de compensation à la possible réponse adrénergique diminuée chez celles-ci. Néanmoins, ces altérations pourraient aussi contribuer à la mortalité des femelles AT1R puisque leur capacité de s'adapter à un stress sympathique serait moindre que les mâles AT1R. D'ailleurs, il a été observé au laboratoire que chez les souris surexprimant au niveau des cardiomyocytes le récepteur adrénergique $\alpha_{1\beta}$, les femelles développaient une hypertrophie plus importante que les mâles et mourraient de façon plus importante ainsi qu'à un âge plus jeune. Ces évidences soutiennent une sensibilité plus grande au système adrénergique chez les femelles en IC.

D'autre part, il serait intéressant d'étudier le rôle des hormones sexuelles dans le développement d'un phénotype plus sévère chez les femelles AT1R. Sachant que les œstrogènes et la testostérone peuvent affecter le couplage excitation-contraction et que des différences entre les sexes existent dans la taille du cœur, il serait intéressant de vérifier le rôle des hormones sexuelles dans les effets observés chez les souris AT1R mâles et femelles. La testostérone pourrait diminuer les effets délétères ou l'œstrogène les aggraver. Cependant, la souris AT1R est de lignée C57Bl/6 et les mâles C57Bl/6 ont des niveaux plasmatiques de testostérone et de dihydrotestostérone (DHT, le métabolite principal de la testostérone qui ne peut être transformé en œstrogène) inférieurs aux autres lignées²¹⁵. Pour cette raison, je pense que les altérations observées chez les femelles pourraient être associées aux hormones féminines. Bien sûr, le rôle de ces

hormones doit être évalué en vérifiant si la déficience en œstrogène et progestérone causée respectivement par l'ovariectomie ou l'ovariectomie et la surrénalectomie suffit à récapituler chez la souris femelle AT1R le phénotype retrouvé chez les mâles AT1R. L'œstrogène est connu pour augmenter la concentration d'angiotensinogène en plus de diminuer l'activité de la rénine, de l'ECA et de l'expression du récepteur AT1 ce qui corrèle avec son rôle protecteur avant la ménopause ²⁷¹. Pourtant, cette même étude soutient que la situation clinique pourrait être plus complexe en raison de la difficulté à mesurer les composantes locales du SRAA et de l'existence de multiples facteurs, comme les récepteurs à l'œstrogène, pouvant l'affecter. Ainsi, en comparaison aux mâles AT1R, une augmentation de l'activité du SRAA local pourrait aussi participer au phénotype des femelles AT1R par une élévation des niveaux d'ANGII, par une surexpression plus grande du récepteur AT1 menant à l'exacerbation des effets liés au récepteur AT1. Dans un autre ordre d'idées, les souris AT1R femelles souffrent d'une hypertrophie et d'une dilatation ventriculaire plus importante que les mâles. De façon intéressante, l'hypertrophie chez la femme comparativement aux hommes est plus sévère avant comme après l'administration d'une thérapie inhibant le SRAA ce qui suggère un rôle pour les hormones sexuelles dans la régulation de l'hypertrophie ¹². Des altérations au niveau des protéines sarcomériques pourraient également participer au remodelage structurel plus sévère chez les femelles AT1R. En effet, l'IC a été associée avec une perturbation importante de l'arrangement des sarcomères plus spécifiquement la titine, les troponines C, T et I ²⁷²⁻²⁷⁴. Cependant, d'autres protéines dont la protéine de liaison C de la myosine (MyBP-C), la chaîne de myosine, l'actine, pourraient aussi contribuer à une dysfonction des sarcomères ²⁷⁵. D'ailleurs, une expérience en immunofluorescence a démontré que le récepteur à l'œstrogène α (ER α) présente un patron d'expression strié en alternance avec la troponine T dans des cœurs humains de cardiomyopathie dilatée ²⁷⁶. De plus, le développement de cardiomyopathie dilatée chez l'humain augmentait l'expression cardiaque de ER α et diminuait sa localisation aux disques intercalaires démontrant que ER α peut être modulée avec le remodelage cardiaque ²⁷⁶. D'autres études ont aussi montré une

augmentation des récepteurs à l'œstrogène ER α et ER β dans les ventricules de patients souffrant de sténose aortique²⁷⁷. Une autre étude a évalué l'impact d'un traitement au tamoxifène (un modulateur des ER agissant comme antagoniste dans le cœur) auprès de deux modèles de rates souffrant d'hypertrophie cardiaque²⁷⁸. Le tamoxifène a réduit l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'épaisseur du ventricule gauche et le diamètre des cardiomyocytes chez les deux modèles. Un antagonisme des ER résulte à une amélioration de l'IC. Par ailleurs, cette étude sur le tamoxifène a présumé que ses effets pourraient être médiés par la PKC²⁷⁸. En effet, il serait intéressant de valider l'interaction entre le tamoxifène, l'œstrogène et la PKC en IC. Le rôle des ER dans le développement de l'hypertrophie et de l'IC est encore peu connu; des études futures sont nécessaires afin de clarifier cette relation et de déterminer si le rôle de l'œstrogène y est délétère.

En dernier lieu, lors des expériences, il a aussi été observé que l'activité électrique supraventriculaire des femelles AT1R est plus altérée. En effet, le segment PR des femelles AT1R est prolongé sur les ECG de surface et les ECG sur cœur isolé comparativement à leur contrôle du même sexe alors que la durée de ce segment est inchangée entre les mâles contrôles et AT1R (Annexe II, p.vii et viii). Ces résultats suggèrent que les femelles AT1R souffrent d'altérations intrinsèques au nœud auriculo-ventriculaire qui ralentissent le passage de l'influx électrique entre les oreillettes et les ventricules. Un remodelage des canaux ioniques ou une augmentation de la fibrose pourrait contribuer à expliquer ce changement. Néanmoins, ces modifications pourraient certainement favoriser le développement d'arythmies. En conclusion, plusieurs avenues peuvent être explorées afin de mieux comprendre le phénotype de la souris AT1R femelle, ce qui témoigne de la complexité des études sur les différences entre les sexes dans le développement de diverses pathologies.

5.2 Interrelations entre les projets de recherche sur la souris AT1R

Le modèle de souris AT1R est central dans la réalisation des projets de recherche de cette thèse. La première étude démontre l'implication de la PKC α dans la réduction du courant Na⁺ en réponse à l'ANGII/AT1R alors que la deuxième illustre les différences dans l'hypertrophie et l'homéostasie calcique entre les sexes qui peuvent contribuer à la mortalité plus élevée des souris femelles AT1R. D'autre part, plusieurs études ont établi un rôle pour les PKC classiques préférentiellement PKC α dans la régulation de la contractilité et de l'hypertrophie ventriculaire^{73, 279-282}. Il semble donc intéressant de poursuivre les études afin de vérifier si l'activité de PKC α serait encore plus augmentée chez les souris femelles AT1R et pourrait ainsi contribuer à expliquer la détérioration de leur phénotype. En effet, une hypertrophie et des troubles de l'homéostasie calcique moins importants ont été mesurés chez les mâles AT1R comparativement aux femelles AT1R. Il est déjà connu que l'activité de la PKC α est augmentée chez les mâles AT1R. Ainsi, même si l'implication de la PKC α dans le remodelage structurel et calcique reste à être prouvée chez ceux-ci, l'hypothèse selon laquelle, le remodelage plus sévère observé chez les femelles AT1R pourrait être médié par une augmentation plus grande de l'activité de la PKC α est vraisemblable.

Premièrement, nous avons démontré que la PKC α est responsable de la modulation du courant Na⁺. Cependant, la conduction ventriculaire des femelles AT1R est altérée de façon similaire aux mâles AT1R telle que prouvée par des modifications similaires au niveau du QRS, de l'amplitude et de la vitesse du potentiel d'action (APA et Vmax) ainsi que de la densité du courant Na⁺ (deuxième projet et données non présentées pour APA et Vmax). Ce résultat n'est pas surprenant puisque la relation entre l'activité de la PKC et la modulation du courant Na⁺ ne peut être linéaire en raison du nombre limité de sites de phosphorylation sur celui-ci^{127, 261}. Ainsi, il est possible d'avoir atteint le niveau maximal de phosphorylation du canal Na⁺. En effet, un traitement au PMA, un

agoniste puissant et non-spécifique des PKC, a entraîné une réduction de la densité du courant Na^+ similaire à celle qui a été mesurée chez les souris AT1R. Nous avons également observé ce phénomène de saturation de la diminution du courant par la PKC lors d'une autre étude ¹⁵¹.

Deuxièmement, la fonction de la PKC α sur le remodelage structurel, mécanique et calcique est possiblement différente entre les souris AT1R mâles et femelles. D'une part, la diversité et le grand nombre des protéines responsables du CEC permettent à la PKC α de moduler plusieurs de celles-ci avant d'atteindre un seuil maximal d'altérations. C'est pourquoi une activité plus grande de la PKC α chez les femelles AT1R pourrait contribuer à leur mortalité plus élevée. En effet, une corrélation très forte a été établie entre la PKC α , le développement d'hypertrophie et les problèmes contractiles. Par exemple, la surexpression de PKC α au niveau des cardiomyocytes chez la souris est associée au développement d'une dimension ventriculaire interne plus grande en diastole (LVIDd) et en systole (LVIDs) résultant en une fraction de raccourcissement (FS) réduite ce qui appuie nos données démontrant des modifications similaires chez les souris AT1R ²⁷⁹. De plus tout comme chez la souris AT1R, la souris transgénique avec une surexpression de PKC α spécifiquement dans les cardiomyocytes développe progressivement de l'hypertrophie et un défaut de contractilité associés à une diminution de la fraction de raccourcissement ^{84, 85, 279}. En plus, ces altérations sont clairement apparentes à 6-8mois, mais absentes à 2 mois comme chez la souris AT1R ^{84, 85, 279}. Malheureusement, cette étude de Braz *et al.* n'a pas caractérisé les différences entre les sexes afin d'établir si le phénotype des femelles était plus grave ²⁷⁹. Néanmoins, il semble plausible d'émettre l'hypothèse qu'une plus grande activité de PKC α chez les femelles AT1R causerait un remodelage plus sévère chez celles-ci. D'autant plus que la promotion du développement d'hypertrophie concentrique (TAC) ou dilatée (par une délétion du gène *Csrp3*) chez les souris déficientes en PKC α (PKC $\alpha^{-/-}$) ne conduit pas à une dilatation des ventricules, ni à une diminution de la fraction de raccourcissement ^{279, 280}. Chez les souris déficientes en PKC $\beta\gamma$ (PKC $\beta\gamma^{-/-}$) ayant subi une TAC et reçu un traitement à

la ruboxistaurine, un inhibiteur des PKC conventionnelles, les altérations au niveau de la fraction de raccourcissement, de la fibrose, de l'œdème pulmonaire et de l'hypertrophie étaient renversés suggérant un rôle pour la PKC α dans la modulation de ces paramètres ²⁸⁰. Ces résultats confirment l'apport indispensable de la PKC α dans la fonction ventriculaire et la dilatation du diamètre ventriculaire interne ^{279, 280}. D'autre part, les souris PKC $\alpha^{-/-}$ ayant reçu une TAC ou développant une cardiomyopathie dilatée (Csrp3 $^{-/-}$) survivent en plus grand nombre ²⁷⁹ suggérant qu'une élévation de la PKC α est délétère. Ainsi ces études permettent d'envisager qu'une activité plus grande de la PKC α chez les souris AT1R femelles pourrait expliquer leurs troubles au niveau de l'homéostasie calcique ainsi que leur mortalité plus précoce et en plus grand nombre. Conjointement aux autres études, nos travaux ont démontré une hausse de l'activité sélective de la PKC α permettant d'associer l'ANGII à cette régulation ^{279, 281, 282}. Somme toute, l'élévation de l'activité de la PKC α est conforme avec les problèmes contractiles et la dilatation des ventricules chez les souris AT1R mâles, mais une activité plus grande de la PKC α chez la femelle AT1R soutiendrait aussi une détérioration plus importante de la contractilité et de la dilatation des ventricules chez les femelles AT1R.

5.3 Connaissances et applications cliniques du système rénine-angiotensine-aldostérone

Les études en recherche fondamentale permettent de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement des pathologies observées en clinique. Parmi les principales lignes de traitements actuels de l'IC se trouvent les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) puisqu'ils sont reconnus pour améliorer la survie et diminuer les coûts d'hospitalisation. Chez les personnes intolérantes aux IECA, que les antagonistes du récepteur AT1 (ARA) sont essentiellement utilisés ^{9, 222, 283, 284}. Ce sont les deux classes de médicaments auxquelles le modèle de souris AT1R peut procurer de l'information sur les mécanismes sous-jacents à leurs effets. Leurs avantages communs ont tout d'abord été associés à une baisse de la pression artérielle ainsi qu'à une diminution de

l'hypertrophie ^{221, 222, 284}. En thérapie individuelle, l'efficacité entre un ARA et un IECA n'a pas été départagée pendant longtemps puisque les études ne reportaient pas toujours les causes de mortalité telles que la mortalité cardiovasculaire ou la mort subite cardiaque puisqu'elles ne faisaient pas partie de leurs issues primaires (« *endpoints* »). Ceci a eu comme impact de retarder la compréhension du rôle de l'IECA et de l'ARA dans la genèse d'arythmies ventriculaires ou de sidération myocardique. En effet, jusqu'à récemment, peu d'études cliniques s'étaient intéressées au lien entre la mort subite cardiaque et les ARA, rendant difficile la clarification de leur impact dans la mortalité cardiovasculaire ¹⁴. Une méta-analyse effectuée par la collaboration Cochrane n'a pas trouvé de différences entre les ARA et les IECA quant à la mortalité totale, cardiovasculaire et les événements cardiovasculaires ⁹. Cependant, elle émet une réserve quant à l'utilisation des ARA en raison d'un manque d'étude et d'évidences solides quant à leur efficacité ⁹. En effet, dans une étude sur le risque associé à l'hypertension artérielle ou à l'infarctus du myocarde, les ARA ne diminuent pas le taux de mortalité total ou cardiovasculaire, mais peuvent réduire le risque d'accident vasculaire cérébral, d'IC et de diabète ^{285, 286}. Dans un contexte d'IC, dans les rares études examinant les patients avec une fraction d'éjection préservée (ICpEF), ni les ARA, ni les IECA ne diminuent le risque de mortalité ^{9, 10, 287} alors que si la fraction d'éjection est diminuée (ICrEF), une augmentation de la survie est associée avec la prise des IECA, mais pas avec les ARA ^{9, 54, 221, 222, 288}, hormis le candesartan ^{289, 290}. Même en combinaison, il n'y a pas d'effets additifs sur le taux de mortalité total ou cardiaque ⁹. Ce résultat suggère d'une part que les ARA médient leurs effets par une voie conjointe aux IECA via le récepteur AT1 et, d'autre part, que les IECA ont un effet bénéfique additionnel indépendant de la voie des ARA. En effet, la bradykinine est connue pour avoir des effets cardiaques et vasculaires opposés à ceux de l'ANGII en favorisant la production d'oxyde nitrique (NO) ²⁹¹. Les résultats de ces études cliniques suggèrent que le phénotype des souris AT1R serait exacerbé en réponse à une administration d'ANGII. En effet, l'ajout de minipompe osmotique libérant de l'ANGII de façon chronique dans les souris

AT1R cause une augmentation de l'hypertrophie et un amincissement de la paroi chez celles-ci (données non présentées).

Quant aux rôles de ces deux traitements dans la genèse d'arythmies, les IECA et les ARA semblent avoir des effets bénéfiques dans la réduction de la fibrillation auriculaire, mais ces résultats varient en fonction des pathologies associées à l'émergence de celle-ci ²⁹². De plus, les ARA peuvent réduire l'incidence de la fibrillation auriculaire, l'arythmie soutenue la plus commune, qui, en plus, est connue pour être un facteur de risque contribuant à l'IC ^{293, 294}. Une autre étude a démontré que chez les patients en ICrEF porteurs d'un défibrillateur implantable (ICD), sans un historique d'arythmies ventriculaires et traités avec un ARA ou un IECA, le nombre de défibrillations appropriées était moins fréquent que chez ceux sans une thérapie visant l'inhibition du SRAA. Ces données, contrairement aux autres, montrent que les ARA et les IECA sont efficaces dans la diminution des arythmies ventriculaires ²⁹⁵. En résumé, les ARA semblent bénéfiques pour diminuer les arythmies cardiaques chez l'homme.

Des études fondamentales sur les modèles animaux ont démontré un rôle important de l'ANGII dans le remodelage électrique et l'homéostasie calcique cardiaque ce qui appuie l'usage des ARA et des IECA comme thérapies efficaces afin de prévenir les arythmies et d'améliorer le pronostic des patients ^{84, 85, 292, 296-301}. D'autre part, un antagonisme du récepteur AT1 semble être avantageux puisque la durée de la vie des souris ayant une délétion du récepteur AT1 (AT1R^{-/-}) est prolongée ⁷⁰. En plus, lors de la deuxième étude, nous avons constaté que la surexpression du récepteur AT1 au niveau des cardiomyocytes raccourcit la durée de la vie de la souris, plus particulièrement chez les femelles. L'antagonisation du récepteur AT1 semblerait donc pouvoir être bénéfique, mais comme mentionné plus haut, lors des essais cliniques, parmi les ARA, uniquement le candesartan semble être associé à une amélioration de la survie ^{10, 54, 285-288}. Il est aussi plausible que la grande variabilité existant entre les sujets d'une étude clinique ne permet guère de voir un effet significatif des autres ARA quant à la survie. Par contre, les ARA supportent une amélioration de la qualité de vie en diminuant la

fibrillation auriculaire, l'hypertension artérielle, l'hypertrophie et les symptômes de l'IC.

D'autre part, nos travaux sur les différences mâles et femelles semblent démontrer une plus grande sensibilité chez celles-ci à la suite d'une activation du récepteur AT1. Les femmes développent généralement une ICpEF alors que les souris femelles AT1R présentent une ICrEF. L'infarctus du myocarde est associé préférentiellement au développement d'une ICrEF. Une explication possible du nombre inférieur de femmes souffrant d'ICrEF serait qu'avant 50 ans, les femmes ont un risque trois fois plus grand que les hommes de mourir à la suite d'un infarctus du myocarde ou d'un pontage aortocoronarien par greffe, par conséquent, elles ne peuvent pas développer de l'ICrEF^{302, 303}. Il serait donc pertinent d'analyser le pronostic d'un nombre plus grand de femmes avec une ICrEF puisque la majorité des études sur l'ICrEF recrutent préférentiellement des hommes puisque ceux-ci en sont plus fréquemment atteints. Ainsi, l'efficacité des thérapies simples ou combinées des IECA et des ARA pourrait être supérieure chez la femme en ICrEF. Certes, la compréhension des effets sous-jacents au récepteur AT1 est essentielle pour mieux comprendre la physiopathologie de plusieurs maladies, dont l'IC, ainsi que pour mieux comprendre les mécanismes d'action par lesquels les thérapies agissent.

Récemment, une nouvelle molécule (LCZ696) combinant un ARA (valsartan) et un inhibiteur de la néprilysine (sacubitril), une enzyme impliquée dans la dégradation des peptides natriurétiques et de la bradykinine a été testée chez l'humain. Cette nouvelle molécule est un bel exemple de la complémentarité des études cliniques et de la recherche fondamentale. Ainsi, l'étude clinique de LCZ696 a démontré que cette nouvelle molécule a une efficacité supérieure à l'énalapril (IECA) quant à la mortalité cardiovasculaire, au nombre d'hospitalisations associé à l'IC et à l'amélioration de la capacité physique des participants¹⁴. Cette étude a d'ailleurs été terminée plus tôt en raison de son effet bénéfique supérieur. Antérieurement, des études avaient combiné un IECA avec un inhibiteur de la néprilysine sans prouver une meilleure efficacité et avaient

répertorié des effets secondaires sévères comme des angioedèmes sévères^{304, 305}. En effet, l'IECA favorisant la production de bradykinine et de peptides natriurétiques puis, la néprilysine empêchant leur dégradation mène à une trop grande accumulation de ces peptides causant ainsi des effets secondaires graves. Ainsi, l'accumulation de connaissances sur le SRAA et sur son rôle dans l'IC ont permis de mieux cibler les voies à privilégier afin d'éviter les effets secondaires ce qui a permis de développer la molécule LCZ696 offrant une thérapie prometteuse, efficace et mieux adaptée puisque la majorité des effets délétères de l'ANGII modulés par le récepteur AT1 sont limités et les effets avantageux de la hausse de la bradykinine et de l'ANP sont favorisés.

5.4 Perspectives d'applications cliniques des projets de cette thèse

5.4.1 PKC α comme cible thérapeutique

Plusieurs études ont validé les rôles et implications de la PKC α puisqu'elle semble une cible thérapeutique potentielle. Premièrement, une augmentation de l'activité ou de l'expression de PKC α a été montrée dans plusieurs modèles animaux d'IC^{74, 279, 306, 307}, mais aussi chez l'homme^{279, 281}. Les mécanismes par lesquels les PKC α médient ces effets ont fait l'objet de plusieurs recherches. Dans l'étude de Braz *et al.*, mentionnée précédemment, la surexpression de la PKC α diminue la contractilité cardiaque. Le mécanisme établi a été associé à une augmentation de l'activité de la PKC α qui diminue le complexe I-1 (molécule liant PP-1) et PP-1 (une phosphatase) ce qui augmente le nombre de PP-1 libre et entraîne une activité phosphatase plus grande²⁷⁹. Cette phosphatase serait responsable de la déphosphorylation de PLB ce qui entraînerait une diminution de l'activité de SERCA2. Ce mécanisme a aussi été validé auprès d'autres modèles cellulaires et *in vivo*²⁷⁹. D'autre part, le développement de cardiomyopathies et la perte de contractilité peuvent aussi être associés à une hyperphosphorylation des myofilaments par PKC α ⁷⁴. Cependant, contrairement à l'étude de Braz *et al.*,

l'expression de la phosphatase PP-1 était inchangée et l'ajout de PP-1 permettait un retour de la contractilité. D'un autre côté, les PKC, dont la PKC α , sont connues pour interagir avec les diverses protéines du sarcomère, dont la troponine I, la troponine T et la protéine de liaison à la myosine C³⁰⁸⁻³¹⁰. Dans le modèle AT1R, l'implication de la PKC α dans les troubles contractiles est fort probable, mais le rôle de PP-1 et la régulation des sarcomères demeurent inconnus. Plusieurs études affluent pour établir PKC α comme une protéine régulatrice importante dans l'IC. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin de clarifier les voies de signalisation impliquées.

L'inhibition de la PKC α résulterait en un effet bénéfique sur la fonction cardiaque puisqu'elle permettrait un remplissage du réticulum sarcoplasmique plus efficace ainsi qu'une amélioration de la fonction des myofilaments assurant une meilleure contraction^{74, 279}. Ces principes ont été démontrés dans des modèles de rats et de souris. Une étude récente sur le porc a été réalisée afin de déterminer si la relation entre les isoformes des PKC et la contractilité était maintenue chez les grands mammifères. À la suite d'un traitement de trois mois à la ruboxistaurine, un inhibiteur des PKC α et β , une amélioration de la contractilité, de la fraction d'éjection et du débit cardiaque a été démontrée chez le porc ayant subi une cannulation de l'artère descendante antérieure gauche (LAD)³¹¹. La ruboxistaurine a été utilisée puisque la PKC α étant l'isoforme majoritaire au niveau cardiaque et donc les effets observés ont donc été associés à cette isoforme. Néanmoins, il serait plus que pertinent de poursuivre les études avec un peptide inhibiteur de la translocation spécifique à PKC α .

Les voies d'administration et de livraison d'un médicament sont des facteurs importants à considérer. En effet, lors de cette étude chez le porc, la ruboxistaurine a été administrée avec la nourriture. Il pourrait être préférable en raison de l'activité constitutive ainsi que de l'expression ubiquitaire et multi-tissulaire des PKC d'avoir recours à une méthode d'administration plus spécifique au cœur par l'intermédiaire de la thérapie génique afin d'éviter des effets secondaires périphériques indésirables³¹². En fait, dans un modèle de rat

cryoinfarcté, des adénovirus dominants négatifs pour PKC α ont été administrés ce qui a permis de rétablir la contractilité et la pression ventriculaire ²⁸¹. L'innocuité et l'efficacité de la thérapie génique sur une autre cible (SERCA2) ont déjà été démontrées chez l'humain lors d'essais cliniques ³¹³⁻³¹⁵. De ce fait, une thérapie basée sur PKC α pourrait conférer certains avantages en comparaison aux différents traitements utilisés dans l'IC. Par exemple, l'effet inotropique et chronotropique négatif des β -bloquants, utilisés dans le traitement de l'IC, entraîne une réponse contractile encore plus faible en plus de nuire à la réponse sympathique induite par les stimuli de stress ou d'effort physique. Conséquemment, le fait de cibler les PKC α améliorerait la fonction contractile sans inhiber la régulation sympathique ce qui serait plus bénéfique dans les cas d'ICrEF afin de rétablir leur fraction d'éjection. La réduction de l'activité de la PKC α ralentirait tout de même le développement de l'hypertrophie en IC que la fraction d'éjection soit préservée ou non. PKC α pourrait aussi avoir certains avantages en raison de son rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique et la conduction. Certes, au lieu de développer des drogues ciblant individuellement PLB, SERCA2 ou I_{Na}, une thérapie génique ciblant la PKC α permettrait de regrouper les effets de différentes cibles et de majorer l'amélioration de l'IC.

Malgré les possibilités offertes par la PKC α et les autres isoformes, aucune thérapie ciblant les PKC n'a pu réussir les trois phases des essais cliniques permettant l'accès au marché. Pourtant les applications des PKC sont vastes tant au niveau du diabète, du cancer, des maladies cardiaques ischémiques, de l'IC, des maladies auto-immunes, de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer et des problèmes bipolaires. Plusieurs molécules prometteuses ont été testées en études cliniques, mais la plupart ont été arrêtées lors de la phase II en raison du développement d'effets secondaires graves tels que la mort ou en raison d'un manque d'efficacité. Les raisons sous-jacentes à ces échecs sont multiples. Premièrement, lors des études précliniques, les modèles animaux utilisés ne parviennent pas à reproduire la pathogenèse observée chez l'homme. En effet, souvent la méthode de constriction transaortique (TAC) est utilisée pour avoir une

surcharge de pression et créer l'IC. C'est une technique induisant un remodelage très sévère et rapide qui ne ressemble pas au stress continu et chronique induit par le développement progressif l'hypertension chez l'homme ⁷⁷. Cette différence dans les stimuli ou l'évolution de la pathologie peut contribuer aux disparités retrouvées dans la littérature quant à l'activation de différents isozymes des PKC et à l'identification de fausses cibles. De plus, l'hétérogénéité retrouvée chez l'homme ne peut être testée dans les modèles animaux ce qui complexifie la médecine translationnelle. Ce concept repose sur un flux bidirectionnel des résultats entre la recherche fondamentale et la recherche clinique afin d'améliorer la condition du patient ³¹⁶. De même, la voie d'administration utilisée varie souvent entre le modèle animal et l'homme, ce qui peut affecter l'action du médicament. Dans le cas des peptides inhibiteurs de translocation des PKC, cela peut s'avérer encore plus problématique en raison des problèmes de dégradation avant que la molécule rejoigne l'organe cible. De plus, les peptides ne sont pas perméables aux membranes cellulaires ce qui requiert un peptide porteur ou un complexe cargo porteur qui augmentera leur hydrophobicité. En outre, un problème plus important est le manque de reproductibilité des études fondamentales. En effet, la compagnie AMGEN a tenté de reproduire les résultats de diverses études et seulement 11 % des données ont pu être reproduites ³¹⁷. Un changement de mentalité valorisant autant les données négatives comme positives pourrait aider à éviter ce problème. De plus, la valorisation de la recherche de qualité est essentielle. Les molécules actuelles ciblant les isozymes des PKC entraînent trop souvent des effets indésirables en raison de leur manque de spécificité d'action puisqu'ils sont impliqués dans la phosphorylation de multiples protéines. C'est pourquoi plusieurs équipes ont entamé des recherches sur le développement des peptides inhibiteurs de fonction, i.e. il est possible de favoriser l'inhibition d'une des fonctions de l'isoforme, par exemple, en empêchant la phosphorylation d'un substrat tout en laissant les autres actives ³¹⁸⁻³²⁰. De futures études vont permettre d'étudier leur efficacité au niveau des pathologies et chez l'humain. Dans l'intention d'améliorer les thérapies des PKC, il semble pertinent d'optimiser les futurs essais cliniques en se référant aux résultats positifs ou négatifs des autres études. Pour ce faire, une

nouvelle base de données regroupant les résultats des études cliniques dans le monde a été créée par le NIH ³¹⁸.

5.5 Limitations des modèles utilisés

5.5.1 Modèle de souris AT1R

Premièrement, la souris est un modèle animal privilégié en raison de l'existence de divers modèles modifiés génétiquement et de son faible coût. Bien évidemment, il existe un long chemin entre la transposition des résultats de la souris à l'homme. Néanmoins, la souris est un animal de « première ligne » qui permet de trouver des voies de signalisation et des mécanismes avant de poursuivre la validation auprès des animaux de grande taille. Chacun de ses modèles a des avantages et des inconvénients, il est donc important de contextualiser nos résultats et de les valider dans plus d'un modèle.

Le modèle de souris AT1R (C57Bl/6) est un modèle transgénique de surexpression. La lignée de souris C57Bl/6 est la plus utilisée en recherche fondamentale et permet donc de comparer facilement les résultats obtenus entre diverses études ³²¹. Elle est également la lignée privilégiée pour la création de modèles transgéniques, probablement puisqu'elle est la première dont le génome ait été entièrement séquencé ³²¹. La lignée C57Bl/6 possède cependant quelques limitations. En effet, lors de nos études certains résultats non-attendus sont survenus. Par exemple, il est connu que l'ANGII par l'activation du récepteur AT1 est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires ³²². Cependant des analyses au niveau plasmatique et tissulaire n'ont pas démontré d'élévation de TNF α , d'IL-1 β , d'IL-6 ou d'IFN γ . Ce résultat peut être expliqué par l'usage de la lignée de souris C57Bl/6 puisqu'il a été démontré qu'elles sont plus résistantes aux processus inflammatoires cardiaques en comparaison aux autres lignées ³²³. Une autre différence pertinente à connaître est que les souris C57Bl/6 ont un niveau basal d'activité plus faible de la NADPH oxydase ³²⁴. D'autre part, même si le transgène n'est présent que sur un des deux allèles afin d'éviter des effets non-

spécifiques indésirables, les modèles transgéniques de surexpression font l'objet de plusieurs critiques en raison de la production abondante du récepteur AT1. Cette surproduction peut affecter les processus physiologiques de la cellule, possiblement en activant des voies de signalisation accessoires qui normalement ne sont pas touchées. Néanmoins, la souris AT1R développe une hypertrophie cardiaque qui mène à l'IC ce qui simule un développement chronique et progressif de la pathologie comme chez l'homme. De plus, lors des travaux sur la régulation du courant Na^+ par la PKC α , nos données chez la souris ont été validées dans un modèle de cardiomyocytes humains. En résumé, il est important de pouvoir reproduire ou comparer ses résultats dans divers modèles afin de valider que l'effet n'est pas spécifique à l'espèce.

5.5.2 Cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines

L'avènement des hiPSC-CM dans le domaine cardiovasculaire offre un accès à des cardiomyocytes humains et la possibilité de valider des résultats dans un modèle comparable à l'humain. Les hiPSC-CM, comme tous les modèles, ne sont pas parfaits. Premièrement, la conversion des cellules somatiques en cellules souches requiert l'exposition à différents facteurs embryonnaires ce qui mène à deux principales limitations. La première est que différents types cellulaires sont retrouvés soit les cellules sinusales, auriculaires et ventriculaires³²⁵. En revanche, il est possible de distinguer les cellules automatiques des cellules musculaires en fonction de la morphologie distincte de leur potentiel d'action^{236, 238, 325}. En plus, il est généralement rapporté que la majorité des cellules sont de type ventriculaire^{236, 238, 325, 326}.

Deuxièmement, présentement, les hiPSC-CM ressemblent plutôt à des cardiomyocytes de type embryonnaire ou fœtal qu'à des cardiomyocytes adultes et devraient plutôt être perçus comme des cardiomyocytes immatures^{326, 327}. Autrement dit, les mêmes canaux sont présents, mais leur expression diffère. Par exemple, la densité des canaux Na^+ et Ca^{2+} des hiPSC-CM est moindre que dans

les cardiomyocytes adultes ³²⁸. D'autre part, au niveau du cœur entier, l'expression des canaux ou des protéines de l'homéostasie calcique peut varier en fonction des couches épicrodiques, endocrodiques et myocrodiques ou de leur emplacement à l'apex ou à la base du cœur ainsi qu'entre le ventricule gauche et le ventricule droit ^{99, 134, 232-234}. Ainsi, cette complexité structurelle ne peut être intégrée aux études réalisées avec les hiPSC-CM. En ce qui a trait à la machinerie du couplage excitation-contraction, elle est présente et fonctionnelle, mais peu d'études l'ont caractérisée jusqu'à présent dans des cellules saines ²³⁸. Une première étude a démontré que 50 % du transitoire calcique semble provenir d'une relâche par le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3) ³²⁹. Ce mécanisme par l'IP3 n'est généralement pas retrouvé chez l'adulte ³³⁰ ce qui remet en question la validité ou nécessite de nuancer l'interprétation des données utilisant les hiPSC-CM. Cependant, récemment, les protocoles de différenciation ont évolué et sont devenus plus efficaces et moins variables ²³⁷. Lors d'une étude récente, l'homéostasie calcique a été comparée dans des hiPSC-CM provenant de divers patients sains et des cellules fraîchement isolées de lapin et de souris. Les résultats obtenus démontrent que l'amplitude des transitoires, la concentration de Ca²⁺ diastolique et le contenu calcique du réticulum sarcoplasmique des hiPSC-CM sont similaires à ceux des myocytes de lapins, dont les propriétés se rapprochent de celles de l'homme ²³⁷. Toutefois, l'extrusion du Ca²⁺ par SERCA2 et NCX ainsi que le temps pour atteindre l'amplitude maximale (TTP) sont ralentis dans les hiPSC-CM comparativement aux cellules ventriculaires de lapin ²³⁷. Ces différences pourraient être expliquées par une maturation incomplète des cellules se traduisant par un système de tubules transverses incomplet et une fonction des protéines de l'homéostasie calcique différente ²³⁷. Malheureusement, cette étude n'a pas évalué la contribution de l'IP3 au transitoire calcique afin d'établir si les nouvelles méthodes de différenciation permettent d'obtenir des hiPSC-CM moins immatures. En somme, la caractérisation et les connaissances sur les hiPSC-CM nécessitent encore plusieurs études afin de mieux comprendre leur phénotype basal et de promouvoir leur différenciation. Jusqu'à maintenant, les recherches utilisant les hiPSC-CM ont majoritairement étudié les composantes électriques afin de

mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux arythmies associées au syndrome du QT long. Les résultats ont démontré que les hiPSC-CM répondaient de façon similaire aux observations faites dans d'autres modèles animaux ou humains²³⁸. L'étude présentée sur la modulation du courant Na^+ par l'ANGII se joint à celles-ci afin de confirmer la validité des hiPSC-CM. En conclusion, malgré leur phénotype immature, les hiPSC-CM présentent, je crois, une avenue intéressante et pertinente à l'étude de la régulation des canaux ioniques et de l'homéostasie calcique cardiaques.

5.5.3 Effets de l'angiotensine II dans divers modèles

La souris AT1R a été utilisée afin de trouver les mécanismes par lesquels l'ANGII peut être impliquée dans le remodelage cardiaque associé aux arythmies. D'autres modèles ont été utilisés afin de valider et de compléter l'étude. En premier lieu, le modèle de souris néonatales avait été choisi puisque contrairement aux cellules adultes, ces cellules natives conservent leur propriété lorsqu'elles sont en culture ce qui permet l'administration d'un traitement chronique¹⁵¹. Il nous a semblé important d'étudier l'effet chronique de l'ANGII afin de reproduire l'effet de la surexpression du récepteur AT1. Dans une première expérience, nous avons voulu étudier l'effet de l'ANGII sur les courants Ca^{2+} . Après 48 heures de traitement à l'ANGII, le I_{CaL} était réduit et cet effet a pu être renversé par un traitement concomitant de candesartan (ARA) démontrant que l'effet résulte bel et bien de l'activation du récepteur AT1. Ensuite, nous avons voulu étudier l'effet de l'ANGII sur le I_{Na} . Cependant, l'ANGII n'a pas diminué le courant tel qu'il a été observé chez la souris AT1R et son effet était variable ce qui nous a amenés à nous questionner sur la qualité et la stabilité de l'ANGII. Cette hypothèse a été vérifiée en évaluant la translocation de la PKC α suite à un traitement à l'ANGII. Les cardiomyocytes néonataux ont été traités 48 heures avec de l'ANGII (1 μM) en provenance du fournisseur Sigma ou avec de l'ANGII (100 nM) synthétisée par Dr A. Tadevoysyan du laboratoire du Dr Nattel. Par la suite, les protéines membranaires ont été extraites et un immunobuvardage de type Western réalisé. À l'inverse de ce qui a été observé chez la souris AT1R, la translocation de PKC α

était diminuée en présence d'ANGII. De plus, même avec une concentration 1000 fois plus élevée l'ANGII de Sigma ne produisait qu'une faible diminution de l'expression membranaire comparativement à l'ANGII de Dr A. Tadevosyan (données non présentées). Ces résultats suggèrent que lors du développement, la régulation entre l'ANGII et le courant Na^+ change ou que la régulation entre ANGII et $\text{PKC}\alpha$ est modifiée. Antérieurement, le courant Na^+ des cellules de souris néonatales était présumé sous-jacent à l'isoforme $\text{Nav}1.5$, l'isoforme cardiaque prédominante³³¹. Des études plus récentes ont démontré qu'un nouveau transcrite d'épissage de $\text{Nav}1.5$ nommé $\text{Nav}1.5$ néonatal ($\text{nNav}1.5$) est prépondérant dans le cœur des souris néonatales. L'expression de l'isoforme $\text{nNav}1.5$ diminue avec le développement et n'est plus détectable à l'âge adulte³³² indiquant possiblement pourquoi l'ANGII exerce des effets différents entre les deux types cellulaires. Les expériences subséquentes ont donc été réalisées avec les hiPSC-CM. Nos résultats suggèrent que l'ANGII réduit le courant Na^+ en présence d'une stimulation électrosystolique alors qu'en absence, aucun effet n'a été observé. Ainsi, il semble nécessaire de contracter les cardiomyocytes afin de stabiliser les effets de l'ANGII.

5.5.3.1 Projet sur les courants Ca^{2+} de type T

Lors de mes études doctorales, j'ai aussi réalisé d'autres études afin de mieux comprendre le rôle du récepteur AT1 dans les perturbations électrophysiologiques. Plusieurs évidences dans la littérature ont démontré qu'en conditions hypertrophiques, les canaux Ca^{2+} de types T sont réexprimés en réponse à une constriction aortique^{139, 140, 333, 334}, un infarctus du myocarde³³⁵, l'exposition chronique à l'endothéline³³⁶ ou à l'ANGII^{138, 139, 337}. Une augmentation des canaux Ca^{2+} de type T pourrait contribuer à perturber l'homéostasie calcique, favoriser l'automatisme et le développement d'arythmies. Les expériences de patch-clamp ont démontré qu'en conditions contrôles la densité de I_{CaT} est minime, environ 1-2 pA/pF, et n'a probablement aucune pertinence physiologique. Chez les souris AT1R même après le développement de l'hypertrophie, les densités demeuraient minimales. Une différence importante entre notre modèle et ceux des

autres études est que nous n'avons pas l'influence d'un stress hémodynamique ou de l'augmentation de la postcharge. Ces stimuli sembleraient donc être importants dans la réexpression des canaux Ca^{2+} de type T. Toutefois, la réexpression ventriculaire des canaux de type T en conditions hypertrophiques n'a jamais été confirmée chez l'homme³³⁸. De plus, en conditions physiologiques ce courant n'a jamais été enregistré chez l'homme^{236, 339}. Des études à ce sujet seraient essentielles afin d'établir la pertinence de poursuivre ces projets.

5.6 Les femmes et les maladies cardiovasculaires

Il est souvent perçu que les femmes contrairement aux hommes sont protégées contre les maladies cardiovasculaires. Cette perception est basée sur l'observation passée que leur risque cardiovasculaire est retardé de 10 ans en comparaison aux hommes. Cette augmentation du risque est associée à une déficience à long terme de l'œstrogène consécutive à la ménopause⁴². Avec les années, le taux de mortalité cardiovasculaire a diminué excepté pour les femmes préménoposées^{340, 341}. De surcroît, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité chez les femmes³⁴²⁻³⁴⁴. Différents facteurs peuvent contribuer à expliquer cette différence. D'une part, l'intégration des sujets de sexe féminin dans les études cliniques et fondamentales a été encouragée seulement à partir de 1993 par l'Institut National de la Santé (NIH) aux États-Unis par la mise en place de l'acte de revitalisation. Au Canada, depuis 2010 aux Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et depuis 2015 aux Fondations des Maladies du Cœur une question incitative fait partie du formulaire d'application afin de favoriser l'intégration des sexes et du genre dans les perspectives de recherche. Malgré tout, l'intégration des femmes/femelles n'est pas encore acquise même si elles représentent 50 % de la population et qu'il est connu que des différences existent entre elles et les hommes. D'ailleurs, une étude publiée en 2008 a rapporté que la proportion de femmes participantes aux essais cliniques cardiovasculaires en phase III ou IV ne reflétait pas la prévalence de la maladie dans la population et qu'ils incluaient en moyenne 27 % de femmes alors que 53 %

sont atteintes de maladies cardiovasculaires ^{220, 345}. L'intégration des femmes aurait un impact considérable et permettrait de mieux cibler les besoins et thérapies appropriés pour celles-ci puisque le développement, le diagnostic, le traitement d'une pathologie diffèrent souvent entre les sexes ^{220, 346, 347}. Il semble donc essentiel, d'une part, de favoriser la recherche chez les animaux mâles et femelles. Une meilleure compréhension du fonctionnement cellulaire permet d'améliorer nos connaissances et de mieux comprendre les phénomènes cliniques.

Diverses causes peuvent contribuer à la mortalité cardiovasculaire plus élevée chez la femme ^{220, 346, 347}. Une autre possibilité provient des différences entre les genres puisque la perception du médecin diffère lors des soins prodigués aux hommes et aux femmes. En effet, le résultat d'un sondage réalisé en 2005 aux États-Unis a révélé que seulement un médecin sur cinq savait que les femmes avaient une mortalité cardiovasculaire plus importante que les hommes ³⁴⁸. Ce phénomène s'explique par le fait que les maladies cardiovasculaires sont encore perçues, comme étant une maladie d'homme et que les femmes présentent des signes et des symptômes différents ce qui amène le médecin à poser un diagnostic inadéquat ^{302, 347, 349, 350}. Cette mauvaise perception ou ce manque de sensibilisation aux particularités des femmes peut expliquer pourquoi les femmes ont plus souvent un diagnostic erroné, un traitement différent ou moins agressif conjointement à leur risque d'effets indésirables de 1,5 fois plus élevé à la suite de la prise d'un médicament d'ordonnance entraînant des répercussions négatives pour la femme ^{220, 346, 351}. Ceci démontre l'importance de valider les cibles thérapeutiques chez la femme et de vérifier si l'efficacité d'un médicament est la même entre les sexes lors des études cliniques ³⁴⁶. Par exemple, l'IC avec fraction d'éjection conservée est une maladie touchant plus les femmes pour laquelle aucun traitement efficace n'existe ³⁵²⁻³⁵⁴ ce qui entraîne des taux de morbidité et de mortalité plus élevés chez celles-ci ^{33, 34}. Les dernières années, les études se sont concentrées à trouver des traitements pour l'ICrEF qui ont amélioré la survie et diminuer l'hospitalisation ^{9, 54, 221, 222}. Il a été suggéré que le manque d'étude sur l'ICpEF était causé par une absence de définitions claires pour l'émission d'un

diagnostic ce qui complexifie la mise en place de critères d'inclusion dans les études. Maintenant, ce problème est désormais résolu et plusieurs études ont démontré divers paramètres facilitant la classification des patients^{350, 355}. Cet avancement permettra d'encourager les études sur l'ICpEF et de mieux comprendre pourquoi les femmes en sont plus atteintes.

5.7 Commentaire final

Les études présentées dans cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances dans plusieurs domaines. D'une part, le rôle de l'ANGII et de son récepteur AT1 a été exploré dans la modulation des canaux ioniques. L'ANGII favorise une instabilité électrique ventriculaire importante puisque les trois principales conductances contribuant au potentiel d'action sont altérées soit les courants Na^+ , Ca^{2+} et K^+ . Les mécanismes sous-jacents à ces réductions de courants retrouvés chez la souris AT1R ont été établis dans le laboratoire^{84, 85}. Plus précisément, la suite des travaux a mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation des courants Na^+ suite à un stimulus chronique délétère de l'ANGII. En effet, l'activité de la PKC α est significativement augmentée par la surexpression du récepteur AT1. Cette modulation du courant Na^+ par la PKC α a été confirmée dans des cardiomyocytes humains traités à l'ANGII. Ce projet contribue à valider la PKC α comme une cible thérapeutique potentielle. En second lieu, le remodelage électrique des souris AT1R était altéré de façon similaire entre les sexes. D'ailleurs, le couplage excitation-contraction semble être modifié plus sévèrement chez les femelles AT1R. L'augmentation des étincelles Ca^{2+} , le ralentissement de l'activité de SERCA2 et la faible concentration de Ca^{2+} diastolique observée chez les femelles AT1R peuvent mener à des troubles contractiles. Des études futures sur la rigidité du cœur ainsi que sur la fonction des sarcomères seraient des pistes intéressantes à explorer puisque des études *in vivo* ont démontré que les femelles AT1R souffraient d'hypertrophie et d'une dilation du ventricule gauche de façon plus importante que les mâles AT1R. L'IC demeure l'une des maladies cardiovasculaires qui affecte le plus la qualité de vie des patients. En mesure de

diminuer la mortalité, réduire le nombre et les frais liés à leurs hospitalisations, le milieu de la recherche académique doit continuer de découvrir et de comprendre les nouveaux mécanismes afin de promouvoir la recherche translationnelle.

Bibliographie

1. World Health Organisation. *Improving the quality and use of birth, death and cause-of-death information : guidance for a standards-based review of country practices*. 2010:92.
2. Statistics Canada. *Mortality, summary list of causes 2008*. 2011.
3. Heart and Stroke Foundation Canada. *Statistics*. 2015.
4. Jessup, M. and Brozena, S., *Heart Failure*. New England Journal of Medicine. 2003;348:2007-2018.
5. Roger, V. L., *Epidemiology of Heart Failure*. Circulation Research. 2013;113:646-659.
6. Members, W. G., Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Kissela, B. M., Kittner, S. J., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Makuc, D. M., Marcus, G. M., Marelli, A., Matchar, D. B., Moy, C. S., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nichol, G., Paynter, N. P., Soliman, E. Z., Sorlie, P. D., Sotoodehnia, N., Turan, T. N., Virani, S. S., Wong, N. D., Woo, D. and Turner, M. B., *Heart Disease and Stroke Statistics—2012 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation. 2012;125:e2-e220.
7. Chen, J., Normand, S. T., Wang, Y. and Krumholz, H. M., *National and regional trends in heart failure hospitalization and mortality rates for medicare beneficiaries, 1998-2008*. JAMA. 2011;306:1669-1678.
8. Agarwal, S. K., Chambless, L. E., Ballantyne, C. M., Astor, B., Bertoni, A. G., Chang, P. P., Folsom, A. R., He, M., Hoogeveen, R. C., Ni, H., Quibrera, P. M., Rosamond, W. D., Russell, S. D., Shahar, E. and Heiss, G., *Prediction of Incident Heart Failure in General Practice: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Circulation: Heart Failure. 2012;5:422-429.
9. Li, E. C., Heran, B. S. and Wright, J. M., *Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors versus angiotensin receptor blockers for primary hypertension*. The Cochrane database of systematic reviews. 2014;8:Cd009096.

10. Meune, C., Wahbi, K., Duboc, D. and Weber, S., *Meta-Analysis of Renin-Angiotensin-Aldosterone Blockade for Heart Failure in Presence of Preserved Left Ventricular Function*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. 2011;16:368-375.
11. Kurokawa, J. and Abriel, H., *Neurohormonal Regulation of Cardiac Ion Channels in Chronic Heart Failure*. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2009;54:98-105.
12. Gerds, E., Okin, P. M., de Simone, G., Cramariuc, D., Wachtell, K., Boman, K. and Devereux, R. B., *Gender Differences in Left Ventricular Structure and Function During Antihypertensive Treatment: The Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study*. Hypertension. 2008;51:1109-1114.
13. Triposkiadis, F., Karayannis, G., Giamouzis, G., Skoularigis, J., Louridas, G. and Butler, J., *The Sympathetic Nervous System in Heart Failure: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications*. Journal of the American College of Cardiology. 2009;54:1747-1762.
14. McMurray, J. J. V., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., Rouleau, J. L., Shi, V. C., Solomon, S. D., Swedberg, K. and Zile, M. R., *Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure*. New England Journal of Medicine. 2014;371:993-1004.
15. Fagard, R. H., Celis, H., Thijs, L. and Wouters, S., *Regression of Left Ventricular Mass by Antihypertensive Treatment: A Meta-Analysis of Randomized Comparative Studies*. Hypertension. 2009;54:1084-1091.
16. American Heart Association. *Classes of Heart Failure*. 2015.
17. Parker, R. B., Nappi, J. M. and Cavallari, L. H. Chapter 4. Chronic Heart Failure. In: J. T. DiPiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells and L. M. Posey, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 9e* New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2014.
18. Bashore, T. M., Granger, C. B., Jackson, K. and Patel, M. R. Heart Disease. In: M. A. Papadakis, S. J. McPhee and M. W. Rabow, eds. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2015* New York, NY: McGraw-Hill Education; 2014.
19. National Heart Lung and Blood Institute. *Types of Cardiomyopathy*. 2011;2015.

20. Gjesdal, O., Bluemke, D. A. and Lima, J. A., *Cardiac remodeling at the population level[risk factors, screening, and outcomes]*. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:673-685.
21. Rodgers, J. E. and Reed, B. N. Chapter 5. Acute Decompensated Heart Failure. In: J. T. DiPiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells and L. M. Posey, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 9e* New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2014.
22. Donohue, D. and Movahed, M.-R., *Clinical Characteristics, Demographics and Prognosis of Transient Left Ventricular Apical Ballooning Syndrome*. *Heart Fail Rev.* 2005;10:311-316.
23. Gianni, M., Dentali, F., Grandi, A. M., Sumner, G., Hiralal, R. and Lonn, E. *Apical ballooning syndrome or takotsubo cardiomyopathy: a systematic review*; 2006.
24. Ernande, L. and Derumeaux, G., *Diabetic cardiomyopathy: Myth or reality?* *Archives of Cardiovascular Diseases.* 2012;105:218-225.
25. Boudina, S. and Abel, E. D., *Diabetic cardiomyopathy, causes and effects*. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2010;11:31-39.
26. Frey, N. and Olson, E. N., *Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly*. *Annual Review of Physiology.* 2003;65:45-79.
27. Molkenstin, J. D. and Dorn II, G. W., *Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy*. *Annual Review of Physiology.* 2001;63:391-426.
28. Zoccali, C., Mallamaci, F., Benedetto, F. A., Tripepi, G., Parlongo, S., Cataliotti, A., Cutrupi, S., Giacone, G., Bellanuova, I., Cottini, E. and Malatino, L. S., *Cardiac natriuretic peptides are related to left ventricular mass and function and predict mortality in dialysis patients*. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2001;12:1508-15.
29. Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T. Y., Ruan, H., Wang, Y., Toro, L. and Stefani, E., *Molecular and Functional Signature of Heart Hypertrophy During Pregnancy*. *Circulation Research.* 2005;96:1208-1216.
30. Braunwald, E. and Bonow, R. O. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: Saunders; 2012.
31. Yancy, C. W., Lopatin, M., Stevenson, L. W., De Marco, T. and Fonarow, G. C., *Clinical Presentation, Management, and In-Hospital Outcomes of*

- Patients Admitted With Acute Decompensated Heart Failure With Preserved Systolic Function: A Report From the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) Database.* Journal of the American College of Cardiology. 2006;47:76-84.
32. Maeder, M. T. and Kaye, D. M., *Heart Failure With Normal Left Ventricular Ejection Fraction.* Journal of the American College of Cardiology. 2009;53:905-918.
 33. Bhatia, R. S., Tu, J. V., Lee, D. S., Austin, P. C., Fang, J., Haouzi, A., Gong, Y. and Liu, P. P., *Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in a Population-Based Study.* New England Journal of Medicine. 2006;355:260-269.
 34. Owan, T. E., Hodge, D. O., Herges, R. M., Jacobsen, S. J., Roger, V. L. and Redfield, M. M., *Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.* New England Journal of Medicine. 2006;355:251-259.
 35. Hernandez, A. F., Hammill, B. G., O'Connor, C. M., Schulman, K. A., Curtis, L. H. and Fonarow, G. C., *Clinical Effectiveness of Beta-Blockers in Heart Failure: Findings From the OPTIMIZE-HF Registry.* Journal of the American College of Cardiology. 2009;53:184-192.
 36. Oghladian, G. O., Sipahi, I. and Fang, J. C., *Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Have We Been Pursuing the Wrong Paradigm?* Mayo Clinic Proceedings. 2011;86:531-539.
 37. Wilkins, K., Campbell, N.R.C., Joffres, M.R., McAlister, F.A., Nichol, M., Quach, S., Johansen H.L., & Tremblay M.S. *Blood pressure in Canadian adults. Health Reports 2010.* 2010;21:37-46.
 38. Maas, A. and Appelman, Y., *Gender differences in coronary heart disease.* Netherlands Heart Journal. 2010;18:598-602.
 39. Saseen, J. J. and MacLaughlin, E. J. Chapter 3. Hypertension. In: J. T. DiPiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells and L. M. Posey, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 9e* New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2014.
 40. Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Leip, E. P., Beiser, A., D'Agostino, R. B., Kannel, W. B., Murabito, J. M., Vasan, R. S., Benjamin, E. J. and Levy, D., *Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study.* Circulation. 2002;106:3068-3072.

41. Liu, L. and Eisen, H. J., *Epidemiology of Heart Failure and Scope of the Problem*. *Cardiology Clinics*. 2014;32:1-8.
42. Regitz-Zagrosek, V. and Seeland, U. Sex and Gender Differences in Clinical Medicine. In: V. Regitz-Zagrosek, ed. *Sex and Gender Differences in Pharmacology*: Springer Berlin Heidelberg; 2012(214): 3-22.
43. Devereux, R. B., Pickering, T. G., Alderman, M. H., Chien, S., Borer, J. S. and Laragh, J. H., *Left ventricular hypertrophy in hypertension. Prevalence and relationship to pathophysiologic variables*. *Hypertension*. 1987;9:ii53-60.
44. Liebson, P. R., Grandits, G., Prineas, R., Dianzumba, S., Flack, J. M., Cutler, J. A., Grimm, R. and Stamler, J., *Echocardiographic correlates of left ventricular structure among 844 mildly hypertensive men and women in the Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS)*. *Circulation*. 1993;87:476-86.
45. Topol, E. J., Traill, T. A. and Fortuin, N. J., *Hypertensive Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly*. *New England Journal of Medicine*. 1985;312:277-283.
46. Sutters, M. Systemic Hypertension. In: M. A. Papadakis, S. J. McPhee and M. W. Rabow, eds. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2015* New York, NY: McGraw-Hill Education; 2014.
47. Cohn, J. N., *Pharmacotherapy: Inhibiting LV remodeling-the need for a targeted approach*. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:248-249.
48. Dostal, D. E. and Watson, L. E., *Understanding Diastolic Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Choosing the Right Model*. *Hypertension*. 2006;47:830-832.
49. Zablocki, D. and Sadoshima, J., *Solving the Cardiac Hypertrophy Riddle: The Angiotensin II-Mechanical Stress Connection*. *Circulation Research*. 2013;113:1192-1195.
50. Brilla, C. G., Funck, R. C. and Rupp, H., *Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease*. *Circulation*. 2000;102:1388-93.
51. Zhu, W., Zeng, X., Zheng, M. and Xiao, R.-P., *The Enigma of β 2-Adrenergic Receptor Gi Signaling in the Heart: The Good, the Bad, and the Ugly*. *Circulation Research*. 2005;97:507-509.

52. Major, J. L., Salih, M. and Tuana, B. S., *Interplay between the E2F pathway and β -adrenergic signaling in the pathological hypertrophic response of myocardium*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2015;84:179-190.
53. Benigni, A., Cassis, P. and Remuzzi, G. *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*; 2010.
54. Dézsi, C. A., *Differences in the Clinical Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers: A Critical Review of the Evidence*. American Journal of Cardiovascular Drugs. 2014;14:167-173.
55. Hilal-Dandan, R. Chapter 26. Renin and Angiotensin. In: L. L. Brunton, B. A. Chabner and B. C. Knollmann, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e* New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2011.
56. Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L., *Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells*. Pharmacological Reviews. 2000;52:639-672.
57. Farag, E., Maheshwari, K., Morgan, J., Sakr Esa, W. A. and Doyle, D. J., *An Update of the Role of Renin Angiotensin in Cardiovascular Homeostasis*. Anesthesia & Analgesia. 2015;120:275-292.
58. Tadevosyan, A., Maguy, A., Villeneuve, L. R., Babin, J., Bonnefoy, A., Allen, B. G. and Nattel, S., *Nuclear-delimited Angiotensin Receptor-mediated Signaling Regulates Cardiomyocyte Gene Expression*. Journal of Biological Chemistry. 2010;285:22338-22349.
59. Balakumar, P. and Jagadeesh, G., *A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology*. Cellular Signalling. 2014;26:2147-2160.
60. Dorn, G. W., II and Force, T., *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. The Journal of Clinical Investigation. 2005;115:527-537.
61. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Lyons, P. R., Lassègue, B. and Griendling, K. K., *Angiotensin II Receptor Coupling to Phospholipase D Is Mediated by the $\beta\gamma$ Subunits of Heterotrimeric G Proteins in Vascular Smooth Muscle Cells*. Molecular Pharmacology. 1999;55:142-149.

62. Iadecola, C. and Gorelick, P. B., *Hypertension, Angiotensin, and Stroke: Beyond Blood Pressure*. Stroke. 2004;35:348-350.
63. Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y. and Griendling, K. K., *Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity: Upstream Mediators*. Circulation Research. 2002;91:406-413.
64. Shirai, H., Takahashi, K., Katada, T. and Inagami, T., *Mapping of G Protein Coupling Sites of the Angiotensin II Type 1 Receptor*. Hypertension. 1995;25:726-730.
65. Zhai, P., Yamamoto, M., Galeotti, J., Liu, J., Masurekar, M., Thaisz, J., Irie, K., Holle, E., Yu, X., Kupersmidt, S., Roden, D. M., Wagner, T., Yatani, A., Vatner, D. E., Vatner, S. F. and Sadoshima, J., *Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking Gαq/Gαi coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice*. The Journal of Clinical Investigation. 2005;115:3045-3056.
66. Wettschureck, N., Rutten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T. M., Chen, J., Chien, K. R. and Offermanns, S., *Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Gαq/Gα11 in cardiomyocytes*. Nat Med. 2001;7:1236-1240.
67. Adams, J. W., Sakata, Y., Davis, M. G., Sah, V. P., Wang, Y., Liggett, S. B., Chien, K. R., Brown, J. H. and Dorn, G. W., *Enhanced Gαq signaling: A common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95:10140-10145.
68. McLaughlin, J. N., Thulin, C. D., Bray, S. M., Martin, M. M., Elton, T. S. and Willardson, B. M., *Regulation of Angiotensin II-induced G Protein Signaling by Phosphoinositide-3-OH Kinase*. Journal of Biological Chemistry. 2002;277:34885-34895.
69. Yasuda, N., Akazawa, H., Ito, K., Shimizu, I., Kudo-Sakamoto, Y., Yabumoto, C., Yano, M., Yamamoto, R., Ozasa, Y., Minamino, T., Naito, A. T., Oka, T., Shiojima, I., Tamura, K., Umemura, S., Paradis, P., Nemer, M. and Komuro, I., *Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice*. Hypertension. 2012;59:627-633.
70. Benigni, A., Corna, D., Zoja, C., Sonzogni, A., Latini, R., Salio, M., Conti, S., Rottoli, D., Longaretti, L., Cassis, P., Morigi, M., Coffman, T. M. and Remuzzi, G., *Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice*. The Journal of Clinical Investigation. 2009;119:524-530.

71. Burnier, M., *Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers*. *Circulation*. 2001;103:904-912.
72. Ferreira, J. C. B., Mochly-Rosen, D. and Boutjdir, M., *Regulation of Cardiac Excitability Protein Kinase C Isozymes*. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2012;4:532-546.
73. Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M. R., Sabbah, H. N., Mizrahi, J. L., Gromo, G., King, G. L. and Vlahos, C. J., *Increased Protein Kinase C Activity and Expression of Ca²⁺-Sensitive Isoforms in the Failing Human Heart*. *Circulation*. 1999;99:384-391.
74. Belin, R. J., Sumandea, M. P., Allen, E. J., Schoenfelt, K., Wang, H., Solaro, R. J. and de Tombe, P. P., *Augmented Protein Kinase C- α -Induced Myofilament Protein Phosphorylation Contributes to Myofilament Dysfunction in Experimental Congestive Heart Failure*. *Circulation Research*. 2007;101:195-204.
75. Zucker, I. H., Xiao, L. and Haack, K. K. V., *The Central RAS and Sympathetic Nerve Activity in Chronic Heart Failure*. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2014;126:695-706.
76. Ichiki, T., *Regulation of angiotensin II receptor expression*. *Current pharmaceutical design*. 2013;19:3013-21.
77. Houser, S. R., Margulies, K. B., Murphy, A. M., Spinale, F. G., Francis, G. S., Prabhu, S. D., Rockman, H. A., Kass, D. A., Molkentin, J. D., Sussman, M. A. and Koch, W. J., *Animal Models of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association*. *Circulation Research*. 2012;111:131-150.
78. Breckenridge, R., *Heart failure and mouse models*. *Disease Models & Mechanisms*. 2010;3:138-143.
79. Clayton, J. A. and Collins, F. S., *Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies*. *Nature*. 2014;509:282-3.
80. Vasan, R. S., Larson, M. G., Leip, E. P., Evans, J. C., O'Donnell, C. J., Kannel, W. B. and Levy, D., *Impact of High-Normal Blood Pressure on the Risk of Cardiovascular Disease*. *New England Journal of Medicine*. 2001;345:1291-1297.
81. Holobotovskyy, V., Manzur, M., Tare, M., Burchell, J., Bolitho, E., Viola, H., Hool, L. C., Arnolda, L. F., McKittrick, D. J. and Ganss, R., *Regulator*

of G-Protein Signaling 5 Controls Blood Pressure Homeostasis and Vessel Wall Remodeling. Circulation Research. 2013;112:781-791.

82. Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price, E., Ichiki, T., Gaffney, F. A. and Inagami, T., *Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II-Induced Hypertension.* Circulation. 2001;104:346-351.
83. Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F. o. W., Thibault, G. t. and Nemer, M., *Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling.* Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97:931-936.
84. Rivard, K., Paradis, P., Nemer, M. and Fiset, C., *Cardiac-specific overexpression of the human type I angiotensin II receptor causes delayed repolarization.* Cardiovascular Research. 2008;78:53-62.
85. Rivard, K., Grandy, S. A., Douillette, A., Paradis, P., Nemer, M., Allen, B. G. and Fiset, C., *Overexpression of type I angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 2011;301:H2018-H2027.
86. Mathieu, S., Rivard, K., El Khoury, N., Paradis, P., Nemer, M. and Fiset, C., *Female Mice with Cardiomyocyte Specific Overexpression of the Angiotensin II Type I Receptor are More Susceptible to Dilated Cardiomyopathy and Mortality.* Circulation Heart failure. 2015;submitted.
87. Narang, R., Cleland, J. G. F., Erhardt, L., Ball, S. G., Coats, A. J. S., Cowley, A. J., Dargie, H. J., Hall, A. S., Hampton, J. R. and Poole-Wilson, A. *Mode of death in chronic heart failure;* 1996.
88. Deo, R. and Albert, C. M., *Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death.* Circulation. 2012;125:620-637.
89. Goldberger, J. J., Basu, A., Boineau, R., Buxton, A. E., Cain, M. E., Canty, J. M., Chen, P. S., Chugh, S. S., Costantini, O., Exner, D. V., Kadish, A. H., Lee, B., Lloyd-Jones, D., Moss, A. J., Myerburg, R. J., Olgin, J. E., Passman, R., Stevenson, W. G., Tomaselli, G. F., Zareba, W., Zipes, D. P. and Zoloth, L., *Risk Stratification for Sudden Cardiac Death: A Plan for the Future.* Circulation. 2014;129:516-526.
90. Sanoski, C. A. and Bauman, J. L. Chapter 8. The Arrhythmias. In: J. T. DiPiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells and L. M. Posey, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 9e* New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2014.

91. Beaumont, J.-L. *Les arythmies cardiaques-Un guide clinique et thérapeutique*. 5th ed. Montreal: Gaëtan Morin; 2006.
92. Kennedy, H. L., Whitlock, J. A., Sprague, M. K., Kennedy, L. J., Buckingham, T. A. and Goldberg, R. J., *Long-Term Follow-up of Asymptomatic Healthy Subjects with Frequent and Complex Ventricular Ectopy*. *New England Journal of Medicine*. 1985;312:193-197.
93. Bigger, J. T., Jr., Dresdale, F. J., Heissenbuttel, R. H., Weld, F. M. and Wit, A. L., *Ventricular arrhythmias in ischemic heart disease: mechanism, prevalence, significance, and management*. *Progress in cardiovascular diseases*. 1977;19:255-300.
94. Moss, A. J., Davis, H. T., DeCamilla, J. and Bayer, L. W., *Ventricular ectopic beats and their relation to sudden and nonsudden cardiac death after myocardial infarction*. *Circulation*. 1979;60:998-1003.
95. Dagres, N. and Hindricks, G. *Risk stratification after myocardial infarction: is left ventricular ejection fraction enough to prevent sudden cardiac death?*; 2013.
96. Taboulet, P. *L'ECG de A à Z*. 1st ed. Paris: Maloine; 2010.
97. Kim, C., Fahrenbruch, C. E., Cobb, L. A. and Eisenberg, M. S., *Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Men and Women*. *Circulation*. 2001;104:2699-2703.
98. Koplán, B. A. and Stevenson, W. G., *Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death*. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009;84:289-297.
99. Antzelevitch, C., *Tpeak–Tend interval as an index of transmural dispersion of repolarization*. *European Journal of Clinical Investigation*. 2001;31:555-557.
100. Kaese, S. and Verheule, S., *Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size*. *Frontiers in Physiology*. 2012;3.
101. Boukens, B. J., Rivaud, M. R., Rentschler, S. and Coronel, R., *Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of Mus musculus'*. *The Journal of Physiology*. 2014;592:4613-4626.
102. Chen-Izu, Y., Shaw, R. M., Pitt, G. S., Yarov-Yarovoy, V., Sack, J. T., Abriel, H., Aldrich, R. W., Belardinelli, L., Cannell, M. B., Catterall, W. A., Chazin, W. J., Chiamvimonvat, N., Deschenes, I., Grandi, E., Hund, T. J., Izu, L. T., Maier, L. S., Maltsev, V. A., Marionneau, C., Mohler, P. J., Rajamani, S., Rasmusson, R. L., Sobie, E. A., Clancy, C. E. and Bers, D.

- M., *Na⁺ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration*. *The Journal of Physiology*. 2015;593:1347-1360.
103. Abi-Gerges, N., Philp, K., Pollard, C., Wakefield, I., Hammond, T. G. and Valentin, J.-P., *Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2004;18:139-151.
 104. Antzelevitch, C. and Sicouri, S., *Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations: Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes*. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;23:259-277.
 105. Iwasaki, Y.-K., Nishida, K., Kato, T. and Nattel, S., *Atrial Fibrillation Pathophysiology: Implications for Management*. *Circulation*. 2011;124:2264-2274.
 106. Noujaim, S. F., Kaur, K., Milstein, M., Jones, J. M., Furspan, P., Jiang, D., Auerbach, D. S., Herron, T., Meisler, M. H. and Jalife, J., *A null mutation of the neuronal sodium channel NaV1.6 disrupts action potential propagation and excitation-contraction coupling in the mouse heart*. *The FASEB Journal*. 2012;26:63-72.
 107. Liu, M., Yang, K. C. and Dudley Jr, S. C., *Cardiac sodium channel mutations: why so many phenotypes?* *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:607-615.
 108. Kucera, J. P., Rohr, S. and Rudy, Y., *Localization of Sodium Channels in Intercalated Disks Modulates Cardiac Conduction*. *Circulation Research*. 2002;91:1176-1182.
 109. Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., van Ginneken, A. C. G., van Brunschot, S., Belterman, C. N. W., Wilders, R., van Roon, M. A., Tan, H. L., Wilde, A. A. M., Carmeliet, P., de Bakker, J. M. T., Veldkamp, M. W. and Bezzina, C. R., *Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD*. *Circulation*. 2006;114:2584-2594.
 110. Remme, C. A., Wilde, A. A. M. and Bezzina, C. R., *Cardiac Sodium Channel Overlap Syndromes: Different Faces of SCN5A Mutations*. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2008;18:78-87.
 111. Zhang, T., Yong, S. L., Tian, X. L. and Wang, Q. K., *Cardiac-specific overexpression of SCN5A gene leads to shorter P wave duration and PR interval in transgenic mice*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;355:444-450.

112. Abriel, H., *Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies*. Cardiovascular Research. 2008;76:381-389.
113. Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M. R., Head, C. E. G., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., Saumarez, R. C., Trezise, A. E. O., Huang, C. L. H., Vandenberg, J. I., Colledge, W. H. and Grace, A. A., *Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99:6210-6215.
114. Meadows, L. S. and Isom, L. L., *Sodium channels as macromolecular complexes: Implications for inherited arrhythmia syndromes*. Cardiovascular Research. 2005;67:448-458.
115. Malhotra, J. D., Thyagarajan, V., Chen, C. and Isom, L. L., *Tyrosine-phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel β 1 Subunits Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes*. Journal of Biological Chemistry. 2004;279:40748-40754.
116. Milstein, M. L., Musa, H., Balbuena, D. P., Anumonwo, J. M. B., Auerbach, D. S., Furspan, P. B., Hou, L., Hu, B., Schumacher, S. M., Vaidyanathan, R., Martens, J. R. and Jalife, J., *Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109:E2134-E2143.
117. Shy, D., Gillet, L., Ogrodnik, J., Albesa, M., Verkerk, A. O., Wolswinkel, R., Rougier, J.-S., Barc, J., Essers, M. C., Syam, N., Marsman, R. F., van Mil, A. M., Rotman, S., Redon, R., Bezzina, C. R., Remme, C. A. and Abriel, H., *PDZ Domain-Binding Motif Regulates Cardiomyocyte Compartment-Specific Nav1.5 Channel Expression and Function*. Circulation. 2014;130:147-160.
118. Petitprez, S., Zmoos, A.-F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S. E., Hatem, S. N., Coulombe, A. and Abriel, H., *SAP97 and Dystrophin Macromolecular Complexes Determine Two Pools of Cardiac Sodium Channels Nav1.5 in Cardiomyocytes*. Circulation Research. 2011;108:294-304.
119. Hund, T. J., Decker, K. F., Kanter, E., Mohler, P. J., Boyden, P. A., Schuessler, R. B., Yamada, K. A. and Rudy, Y., *Role of activated CaMKII in abnormal calcium homeostasis and INa remodeling after myocardial infarction: Insights from mathematical modeling*. Journal of molecular and cellular cardiology. 2008;45:420-428.

120. Marionneau, C. and Abriel, H., *Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology.
121. Arakel, E. C., Brandenburg, S., Uchida, K., Zhang, H., Lin, Y. W., Kohl, T., Schrul, B., Sulkin, M. S., Efimov, I. R., Nichols, C. G., Lehnart, S. E. and Schwappach, B., *Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of KATP ion channel complexes*. Journal of Cell Science. 2014;127:2106-2119.
122. Johnson, D., Montpetit, M. L., Stocker, P. J. and Bennett, E. S., *The Sialic Acid Component of the β 1 Subunit Modulates Voltage-gated Sodium Channel Function*. Journal of Biological Chemistry. 2004;279:44303-44310.
123. Lin, X., O'Malley, H., Chen, C., Auerbach, D., Foster, M., Shekhar, A., Zhang, M., Coetzee, W., Jalife, J., Fishman, G. I., Isom, L. and Delmar, M., *Scn1b deletion leads to increased tetrodotoxin-sensitive sodium current, altered intracellular calcium homeostasis and arrhythmias in murine hearts*. The Journal of Physiology. 2015;593:1389-1407.
124. Gintant, G. A. and Liu, D. W., *Beta-adrenergic modulation of fast inward sodium current in canine myocardium. Syncytial preparations versus isolated myocytes*. Circulation Research. 1992;70:844-50.
125. Ono, K., Kiyosue, T. and Arita, M., *Isoproterenol, DBcAMP, and forskolin inhibit cardiac sodium current*. Am J Physiol. 1989;256:C1131-7.
126. Baba, S., Dun, W. and Boyden, P. A., *Can PKA activators rescue Na⁺ channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart?* Cardiovasc Res. 2004;64:260-7.
127. Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T. and Catterall, W. A., *Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994;91:3289-3293.
128. Hallaq, H., Wang, D. W., Kunic, J. D., George, A. L., Wells, K. S. and Murray, K. T., *Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 2012;302:H782-H789.
129. Toischer, K., Hartmann, N., Wagner, S., Fischer, T. H., Herting, J., Danner, B. C., Sag, C. M., Hund, T. J., Mohler, P. J., Belardinelli, L., Hasenfuss, G., Maier, L. S. and Sossalla, S., *Role of late sodium current as a potential*

- arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2013;61:111-122.
130. Ma, J., Luo, A., Wu, L., Wan, W., Zhang, P., Ren, Z., Zhang, S., Qian, C., Shryock, J. C. and Belardinelli, L., *Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late sodium current in rabbit ventricular myocytes*. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2012;302:C1141-C1151.
 131. Maltsev, V. A., Reznikov, V., Undrovinas, N. A., Sabbah, H. N. and Undrovinas, A. *Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences*; 2008.
 132. Catterall, W. A., *Voltage-Gated Calcium Channels*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2011;3.
 133. Shaw, R. M. and Colecraft, H. M., *L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes*. Cardiovascular Research. 2013;98:177-186.
 134. Nerbonne, J. M. and Kass, R. S. *Molecular Physiology of Cardiac Repolarization*; 2005.
 135. Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J. and Nargeot, J., *Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100:5543-5548.
 136. Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H. and Striessnig, J., *Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca²⁺ Channels*. Cell. 2000;102:89-97.
 137. Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A.-L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H.-S., Escande, D., Charpentier, F., Nargeot, J. and Lory, P., *Bradycardia and Slowing of the Atrioventricular Conduction in Mice Lacking CaV3.1/ α 1G T-Type Calcium Channels*. Circulation Research. 2006;98:1422-1430.
 138. Ferron, L., Capuano, V., Ruchon, Y., Deroubaix, E., Coulombe, A. and Renaud, J.-F., *Angiotensin II Signaling Pathways Mediate Expression of Cardiac T-Type Calcium Channels*. Circulation Research. 2003;93:1241-1248.

139. Chiang, C.-S., Huang, C.-H., Chieng, H., Chang, Y.-T., Chang, D., Chen, J.-J., Chen, Y.-C., Chen, Y.-H., Shin, H.-S., Campbell, K. P. and Chen, C.-C., *The CaV3.2 T-Type Ca²⁺ Channel Is Required for Pressure Overload–Induced Cardiac Hypertrophy in Mice*. *Circulation Research*. 2009;104:522-530.
140. Martinez, M. L., Heredia, M. a. P. and Delgado, C., *Expression of T-type Ca²⁺Channels in Ventricular Cells from Hypertrophied Rat Hearts*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1999;31:1617-1625.
141. Bers, D. M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*. 2002;415:198-205.
142. Seki, S., Nagashima, M., Yamada, Y., Tsutsuura, M., Kobayashi, T., Namiki, A. and Tohse, N. *Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes*; 2003.
143. Leach, R. N., Desai, J. C. and Orchard, C. H., *Effect of cytoskeleton disruptors on L-type Ca channel distribution in rat ventricular myocytes*. *Cell Calcium*. 2005;38:515-526.
144. Lyon, A. R., MacLeod, K. T., Zhang, Y., Garcia, E., Kanda, G. K., Lab, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E. and Gorelik, J., *Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106:6854-6859.
145. Heinzl, F. R., Bitto, V., Biesmans, L., Wu, M., Detre, E., von Wegner, F., Claus, P., Dymarkowski, S., Maes, F., Bogaert, J., Rademakers, F., D’hooge, J. and Sipido, K., *Remodeling of T-Tubules and Reduced Synchrony of Ca²⁺ Release in Myocytes From Chronically Ischemic Myocardium*. *Circulation Research*. 2008;102:338-346.
146. Nichols, C. B., Rossow, C. F., Navedo, M. F., Westenbroek, R. E., Catterall, W. A., Santana, L. F. and McKnight, G. S., *Sympathetic Stimulation of Adult Cardiomyocytes Requires Association of AKAP5 With a Subpopulation of L-Type Calcium Channels*. *Circulation Research*. 2010;107:747-756.
147. Calaghan, S. and White, E. *Caveolae modulate excitation–contraction coupling and β 2-adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes*; 2006.
148. Makarewich, C. A., Correll, R. N., Gao, H., Zhang, H., Yang, B., Berretta, R. M., Rizzo, V., Molkenin, J. D. and Houser, S. R., *A Caveolae-Targeted*

- L-Type Ca²⁺ Channel Antagonist Inhibits Hypertrophic Signaling Without Reducing Cardiac Contractility*. *Circulation Research*. 2012;110:669-674.
149. Antzelevitch, C., *Genetic basis of Brugada syndrome*. *Heart Rhythm*. 2007;4:756-757.
150. Bers, D. M., *Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes*. *Annual Review of Physiology*. 2008;70:23-49.
151. El Khoury, N., Mathieu, S. and Fiset, C., *Interleukin-1 β Reduces L-type Ca²⁺ Current through Protein Kinase C ϵ Activation in Mouse Heart*. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:21896-21908.
152. Grizel, A. V., Glukhov, G. S. and Sokolova, O. S., *Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels*. *Acta Naturae*. 2014;6:10-26.
153. Trépanier-Boulay, V., St-Michel, C., Tremblay, A. and Fiset, C., *Gender-Based Differences in Cardiac Repolarization in Mouse Ventricle*. *Circulation Research*. 2001;89:437-444.
154. Fiset, C., Clark, R. B., Shimoni, Y. and Giles, W. R., *Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle*. *The Journal of Physiology*. 1997;500:51-64.
155. Kääh, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Näbauer, M., Beuckelmann, D. J., Steinbeck, G., McKinnon, D. and Tomaselli, G. F., *Molecular Basis of Transient Outward Potassium Current Downregulation in Human Heart Failure: A Decrease in Kv4.3 mRNA Correlates With a Reduction in Current Density*. *Circulation*. 1998;98:1383-1393.
156. Raab-Graham, K. F., Radeke, C. M. and Vandenberg, C. A., *Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel*. *Neuroreport*. 1994;5:2501-5.
157. Ashen, M. D., O'Rourke, B., Kluge, K. A., Johns, D. C. and Tomaselli, G. F. *Inward rectifier K⁺ channel from human heart and brain: cloning and stable expression in a human cell line*; 1995.
158. Wible, B. A., De Biasi, M., Majumder, K., Taglialatela, M. and Brown, A. M., *Cloning and Functional Expression of an Inwardly Rectifying K⁺ Channel From Human Atrium*. *Circulation Research*. 1995;76:343-350.
159. Wood, L. S., Tsai, T. D., Lee, K. S. and Vogeli, G., *Cloning and functional expression of a human gene, hIRK1, encoding the heart inward rectifier K⁺-channel*. *Gene*. 1995;163:313-7.

160. Zaritsky, J. J., Redell, J. B., Tempel, B. L. and Schwarz, T. L., *The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (IK1) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes.* The Journal of Physiology. 2001;533:697-710.
161. Giudicessi, J. R. and Ackerman, M. J., *Genotype- and Phenotype-Guided Management of Congenital Long QT Syndrome.* Current Problems in Cardiology. 2013;38:417-455.
162. Tristani-Firouzi, M., Jensen, J. L., Donaldson, M. R., Sansone, V., Meola, G., Hahn, A., Bendahhou, S., Kwiecinski, H., Fidzianska, A., Plaster, N., Fu, Y.-H., Ptacek, L. J. and Tawil, R., *Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome).* The Journal of Clinical Investigation. 2002;110:381-388.
163. Plaster, N. M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S. d., Tsunoda, A., Donaldson, M. R., Iannaccone, S. T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George Jr, A. L., Fish, F. A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S. H., Wolfe, G., Fu, Y.-H. and Ptáček, L. J., *Mutations in Kir2.1 Cause the Developmental and Episodic Electrical Phenotypes of Andersen's Syndrome.* Cell. 2001;105:511-519.
164. Zhang, L., Benson, D. W., Tristani-Firouzi, M., Ptacek, L. J., Tawil, R., Schwartz, P. J., George, A. L., Horie, M., Andelfinger, G., Snow, G. L., Fu, Y.-H., Ackerman, M. J. and Vincent, G. M., *Electrocardiographic Features in Andersen-Tawil Syndrome Patients With KCNJ2 Mutations: Characteristic T-U-Wave Patterns Predict the KCNJ2 Genotype.* Circulation. 2005;111:2720-2726.
165. Knollmann, B. C. and Roden, D. M., *A genetic framework for improving arrhythmia therapy.* Nature. 2008;451:929-936.
166. Cheng, H., Lederer, W. J. and Cannell, M. B., *Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle.* Science (New York, NY). 1993;262:740-4.
167. Cheng, H., Lederer, M. R., Lederer, W. J. and Cannell, M. B., *Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes.* The American journal of physiology. 1996;270:148-59.
168. Korzick, D. H., *Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update.* Advances in physiology education. 2003;27:192-200.
169. Huke, S. and Bers, D. M., *Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2007;42:590-599.

170. Shannon, T. R., Ginsburg, K. S. and Bers, D. M., *Potential of Fractional Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release by Total and Free Intra-Sarcoplasmic Reticulum Calcium Concentration*. Biophysical Journal. 2000;78:334-343.
171. Shannon, T. R., Ginsburg, K. S. and Bers, D. M., *Quantitative Assessment of the SR Ca²⁺ Leak-Load Relationship*. Circulation Research. 2002;91:594-600.
172. Satoh, H., Blatter, L. and Bers, D., *Effects of [Ca²⁺]_i, SR Ca²⁺ load, and rest on Ca²⁺ spark frequency in ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1997;272:H657.
173. Li, Y., Kranias, E. G., Mignery, G. A. and Bers, D. M., *Protein Kinase A Phosphorylation of the Ryanodine Receptor Does Not Affect Calcium Sparks in Mouse Ventricular Myocytes*. Circulation Research. 2002;90:309-316.
174. Weber, C., Piacentino, V., Houser, S. and Bers, D., *Dynamic regulation of Na/Ca exchange function in human heart failure*. Circulation. 2003;108:2224.
175. Fiset, C., Clark, R. B., Larsen, T. S. and Giles, W. R., *A rapidly activating sustained K⁺ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle*. The Journal of Physiology. 1997;504:557-563.
176. Parks, R. and Howlett, S., *Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2013;465:747-763.
177. Surawicz, B. and Parikh, S. R., *Prevalence of male and female patterns of early ventricular repolarization in the normal ECG of males and females from childhood to old age*. Journal of the American College of Cardiology. 2002;40:1870-1876.
178. Ayaz, O. and Howlett, S. E., *Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms*. Biology of Sex Differences. 2015;6:9.
179. Bidoggia, H., Maciel, J. P., Capalozza, N., Mosca, S., Blaksley, E. J., Valverde, E., Bertran, G., Arini, P., Biagetti, M. O. and Quinteiro, R. A., *Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: Possible role of testosterone*. American Heart Journal. 2000;140:678-683.

180. Burke, J. H., Ehlert, F. A., Kruse, J. T., Parker, M. A., Goldberger, J. J. and Kadish, A. H., *Gender-Specific Differences in the QT Interval and the Effect of Autonomic Tone and Menstrual Cycle in Healthy Adults*. The American Journal of Cardiology. 1997;79:178-181.
181. Larsen, J. A., Tung, R. H., Sadananda, R., Goldberger, J. J., Horvath, G., Parker, M. A. and Kadish, A. H., *Effects of hormone replacement therapy on QT interval*. The American Journal of Cardiology. 1998;82:993-995.
182. Hulot, J. S., Demolis, J. L., Riviere, R., Strabach, S., Christin-Maitre, S. and Funck-Brentano, C., *Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration*. Eur Heart J. 2003;24:1663-7.
183. Burke, J. H., Goldberger, J. J., Ehlert, F. A., Kruse, J. T., Parker, M. A. and Kadish, A. H., *Gender differences in heart rate before and after autonomic blockade: Evidence against an intrinsic gender effect*. The American Journal of Medicine. 1996;100:537-543.
184. Burkart, T. and Conti, J., *Cardiac Arrhythmias During Pregnancy*. Curr Treat Options Cardio Med. 2010;12:457-471.
185. Rashba, E. J., Zareba, W., Moss, A. J., Hall, W. J., Robinson, J., Locati, E. H., Schwartz, P. J., Andrews, M. and Investigators, f. t. L., *Influence of Pregnancy on the Risk for Cardiac Events in Patients With Hereditary Long QT Syndrome*. Circulation. 1998;97:451-456.
186. Elkayam, U. *Pregnancy and cardiovascular disease In: Braunwald EG, ed. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1992.
187. Merz, C. N., Moriel, M., Rozanski, A., Klein, J. and Berman, D. S., *Gender-related differences in exercise ventricular function among healthy subjects and patients*. Am Heart J. 1996;131:704-9.
188. Hanley, P. C., Zinsmeister, A. R., Clements, I. P., Bove, A. A., Brown, M. L. and Gibbons, R. J., *Gender-related differences in cardiac response to supine exercise assessed by radionuclide angiography*. Journal of the American College of Cardiology. 1989;13:624-629.
189. Adams, K. F., Vincent, L. M., McAllister, S. M., el-Ashmawy, H. and Sheps, D. S., *The influence of age and gender on left ventricular response to supine exercise in asymptomatic normal subjects*. Am Heart J. 1987;113:732-42.
190. Locati, E. H., Zareba, W., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., Lehmann, M. H., Towbin, J. A., Priori, S. G., Napolitano, C., Robinson, J.

- L., Andrews, M., Timothy, K. and Hall, W. J., *Age- and Sex-Related Differences in Clinical Manifestations in Patients With Congenital Long-QT Syndrome: Findings From the International LQTS Registry*. *Circulation*. 1998;97:2237-2244.
191. Lehmann, M. H., Hardy, S., Archibald, D. and MacNeil, D. J., *JTc prolongation with d,l-sotalol in women versus men*. *The American Journal of Cardiology*. 1999;83:354-359.
192. Tadros, R., Ton, A.-T., Fiset, C. and Nattel, S., *Sex Differences in Cardiac Electrophysiology and Clinical Arrhythmias: Epidemiology, Therapeutics, and Mechanisms*. *Canadian Journal of Cardiology*. 2014;30:783-792.
193. Zareba, W., Moss, A. J., Locati, E. H., Lehmann, M. H., Peterson, D. R., Hall, W. J., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., Priori, S. G., Benhorin, J., Towbin, J. A., Robinson, J. L., Andrews, M. L., Napolitano, C., Timothy, K., Zhang, L. and Medina, A., *Modulating effects of age and gender on the clinical course of long QT syndrome by genotype*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:103-109.
194. Peters, R. W. and Gold, M. R., *The Influence of Gender on Arrhythmias*. *Cardiology in Review*. 2004;12:97-105.
195. Wolbrette, D., Naccarelli, G., Curtis, A., Lehmann, M. and Kadish, A., *Gender differences in arrhythmias*. *Clinical cardiology*. 2002;25:49-56.
196. Brouillette, J., Trépanier-Boulay, V. and Fiset, C., *Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization*. *The Journal of Physiology*. 2003;546:403-413.
197. Fülöp, L., Bányász, T., Szabó, G., Tóth, I. B., Bíró, T., Lőrincz, I., Balogh, Á., Petô, K., Mikó, I. and Nánási, P. P., *Effects of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs*. *Acta Physiologica*. 2006;188:163-171.
198. Brouillette, J., Lupien, M.-A., St-Michel, C. and Fiset, C., *Characterization of ventricular repolarization in male and female guinea pigs*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;42:357-366.
199. James, A., Arberry, L. and Hancox, J., *Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig*. *Basic Res Cardiol*. 2004;99:183-192.
200. Leblanc, N., Chartier, D., Gosselin, H. and Rouleau, J.-L., *Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle*. *The Journal of Physiology*. 1998;511:533-548.

201. Farrell, S. R., Ross, J. L. and Howlett, S. E., *Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes*. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2010;299:H36-45.
202. MacDonald, J. K., Pyle, W. G., Reitz, C. J. and Howlett, S. E. *Cardiac contraction, calcium transients, and myofilament calcium sensitivity fluctuate with the estrous cycle in young adult female mice*; 2014.
203. Lizotte, E., Grandy, S. A., Tremblay, A., Allen, B. G. and Fiset, C., *Expression, Distribution and Regulation of Sex Steroid Hormone Receptors in Mouse Heart*. Cellular Physiology and Biochemistry. 2009;23:075-086.
204. Tanabe, S., Hata, T. and Hiraoka, M., *Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes*. Am J Physiol. 1999;277:H826-33.
205. El Gebeily, G. and Fiset, C., *Upregulation of ventricular potassium channels by chronic tamoxifen treatment*. Cardiovascular Research. 2011;90:68-76.
206. El Gebeily, G., El Khoury, N., Mathieu, S., Brouillette, J. and Fiset, C., *Estrogen regulation of the transient outward K⁺ current involves estrogen receptor α in mouse heart*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2015;86:85-94.
207. Saito, T., Ciobotaru, A., Bopassa, J. C., Toro, L., Stefani, E. and Eghbali, M., *Estrogen Contributes to Gender Differences in Mouse Ventricular Repolarization*. Circulation Research. 2009;105:343-352.
208. El Khoury, N., Mathieu, S., Marger, L., Ross, J., El Gebeily, G., Ethier, N. and Fiset, C., *Upregulation of the Hyperpolarization-Activated Current Increases Pacemaker Activity of the Sinoatrial Node and Heart Rate During Pregnancy in Mice*. Circulation. 2013;127:2009-2020.
209. Curl, C. L., Wendt, I. R. and Kotsanas, G., *Effects of gender on intracellular [Ca²⁺] in rat cardiac myocytes*. Pflügers Archiv. 2001;441:709-716.
210. Wasserstrom, J. A., Kapur, S., Jones, S., Faruque, T., Sharma, R., Kelly, J. E., Pappas, A., Ho, W., Kadish, A. H. and Aistrup, G. L., *Characteristics of intracellular Ca²⁺ cycling in intact rat heart: a comparison of sex differences*. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2008;295:H1895-904.

211. Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D. and Herman, B., *Measurement of intracellular calcium*. *Physiological reviews*. 1999;79:1089-125.
212. Chu, S. H., Sutherland, K., Beck, J., Kowalski, J., Goldspink, P. and Schwertz, D., *Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle*. *Life Sciences*. 2005;76:2735-2749.
213. Yaras, N., Tuncay, E., Purali, N., Sahinoglu, B., Vassort, G. and Turan, B., *Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart*. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293:H3584-92.
214. Parks, R. J., Ray, G., Bienvenu, L. A., Rose, R. A. and Howlett, S. E., *Sex differences in SR Ca²⁺ release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;75:162-173.
215. Brouillette, J., Rivard, K., Lizotte, E. and Fiset, C., *Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens*. *Cardiovasc Res*. 2005;65:148-57.
216. Petre, R. E., Quaile, M. P., Rossman, E. I., Ratcliffe, S. J., Bailey, B. A., Houser, S. R. and Margulies, K. B., *Sex-based differences in myocardial contractile reserve*. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292:R810-8.
217. Schwertz, D. W., Beck, J. M., Kowalski, J. M. and Ross, J. D., *Sex Differences in the Response of Rat Heart Ventricle to Calcium*. *Biological Research For Nursing*. 2004;5:286-298.
218. Curl, C. L., Delbridge, L. M., Canny, B. J. and Wendt, I. R., *Testosterone modulates cardiomyocyte Ca(2+) handling and contractile function*. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2009;58:293-7.
219. Bell, J. R., Bernasochi, G. B., Wollermann, A. C., Raaijmakers, A. J. A., Boon, W. C., Simpson, E. R., Curl, C. L., Mellor, K. M. and Delbridge, L. M. D., *Myocardial and Cardiomyocyte Stress Resilience Is Enhanced in Aromatase-Deficient Female Mouse Hearts Through CaMKII δ Activation*. *Endocrinology*. 2015;156:1429-1440.
220. Kim, A. M., Tingen, C. M. and Woodruff, T. K., *Sex bias in trials and treatment must end*. *Nature*. 2010;465:688-689.

221. The Consensus Trial Study Group, *Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure*. New England Journal of Medicine. 1987;316:1429-1435.
222. The SOLVD Investigators, *Effect of Enalapril on Survival in Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions and Congestive Heart Failure*. New England Journal of Medicine. 1991;325:293-302.
223. Mitchell, G. F., Jeron, A. and Koren, G., *Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse*. Am J Physiol. 1998;274:H747-51.
224. Ishii, K., Kuwahara, M., Tsubone, H. and Sugano, S., *Autonomic nervous function in mice and voles (Microtus arvalis): investigation by power spectral analysis of heart rate variability*. Laboratory animals. 1996;30:359-64.
225. Wolska, B. M. and Solaro, R. J., *Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry*. Am J Physiol. 1996;271:H1250-5.
226. Louch, W. E., Sheehan, K. A. and Wolska, B. M., *Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2011;51:288-298.
227. O'Connell, T., Rodrigo, M. and Simpson, P. Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiac Myocytes. In: F. Vivanco, ed. *Cardiovascular Proteomics: Humana Press*; 2007(357): 271-296.
228. Crevey, B. J., Langer, G. A. and Frank, J. S., *Role of Ca²⁺ in maintenance of rabbit myocardial cell membrane structural and functional integrity*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 1978;10:1081-1100.
229. Frank, J. S., Rich, T. L., Beydler, S. and Kreman, M., *Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox*. Circulation Research. 1982;51:117-30.
230. Piper, H. M., *The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value*. Cardiovasc Res. 2000;45:123-7.
231. Aggarwal, R., Shorofsky, S. R., Goldman, L. and Balke, C. W., *Tetrodotoxin-blockable calcium currents in rat ventricular myocytes; a third type of cardiac cell sodium current*. The Journal of Physiology. 1997;505:353-369.

232. Clark, R. B., Bouchard, R. A., Salinas-Stefanon, E., Sanchez-Chapula, J. and Giles, W. R., *Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle*. Cardiovasc Res. 1993;27:1795-9.
233. Dilly, K. W., Rossow, C. F., Votaw, V. S., Meabon, J. S., Cabarrus, J. L. and Santana, L. F., *Mechanisms underlying variations in excitation-contraction coupling across the mouse left ventricular free wall*. The Journal of Physiology. 2006;572:227-241.
234. Pandit, S. V., Clark, R. B., Giles, W. R. and Demir, S. S., *A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes*. Biophysical Journal. 2001;81:3029-3051.
235. Louch, W. E., Bito, V., Heinzel, F. R., Macianskiene, R., Vanhaecke, J., Flameng, W., Mubagwa, K. and Sipido, K. R., *Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules-a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes*. Cardiovasc Res. 2004;62:63-73.
236. Hoekstra, M., Mummery, C. L., Wilde, A. A. M., Bezzina, C. R. and Verkerk, A. O., *Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias*. Frontiers in Physiology. 2012;3:346.
237. Hwang, H. S., Kryshtal, D. O., Feaster, T. K., Sánchez-Freire, V., Zhang, J., Kamp, T. J., Hong, C. C., Wu, J. C. and Knollmann, B. C., *Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2015;85:79-88.
238. Knollmann, B. C., *Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Boutique Science or Valuable Arrhythmia Model?* Circulation Research. 2013;112:969-976.
239. Neher, E. and Sakmann, B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature. 1976;260:799-802.
240. Neher, E. and Sakmann, B., *Voltage-dependence of drug-induced conductance in frog neuromuscular junction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1975;72:2140-2144.
241. Li, C., *A reliable whole cell clamp technique*. Advances in physiology education. 2008;32:209-11.
242. Neher, E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. In: R. Bernardo, ed. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 1992(Volume 207): 123-131.

243. Brouillette, J., Clark, R. B., Giles, W. R. and Fiset, C., *Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes*. The Journal of Physiology. 2004;559:777-798.
244. Prasad, A. and Inesi, G. Analysis of Calcium Transients in Cardiac Myocytes and Assessment of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Contribution. In: J. X. DiMario, ed. *Myogenesis*: Humana Press; 2012(798): 411-421.
245. Cavagna, M., O'Donnell, J. M., Sumbilla, C., Inesi, G. and Klein, M. G., *Exogenous Ca²⁺-ATPase isoform effects on Ca²⁺ transients of embryonic chicken and neonatal rat cardiac myocytes*. The Journal of Physiology. 2000;528:53-63.
246. SO, M., S, R., Y, H., T, J. and D, B., *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. Cell. 2000;101:365.
247. J, C., KH, B., DJ, S., S, P., DM, B. and TR, S., *Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II*. J Mol Cell Cardiol. 2010;49:25.
248. X, A., JW, C., TR, S., DM, B. and SM, P., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure*. Circ Res. 2005;97:1314.
249. Picht, E., Zima, A. V., Blatter, L. A. and Bers, D. M., *SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ*. American journal of physiology Cell physiology. 2007;293:C1073-81.
250. Bartlett, J. S. and Stirling, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: J. S. Bartlett and D. Stirling, eds. *PCR Protocols*: Humana Press; 2003(226): 3-6.
251. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. and Wittwer, C. T., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clinical chemistry. 2009;55:611-22.
252. Lizotte, E., Tremblay, A., Allen, B. G. and Fiset, C., *Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart*. Analytical Biochemistry. 2005;345:47-54.

253. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T., *International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors*. Pharmacological Reviews. 2000;52:415-472.
254. Hunyady, L. and Catt, K. J., *Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II*. Molecular Endocrinology. 2006;20:953-970.
255. Valdivia, C. R., Ueda, K., Ackerman, M. J. and Makielski, J. C., *GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 2009;297:H1446-H1452.
256. Amiya, E., Tanabe, K., Ikari, Y., Nakajima, Y. and Hara, K., *Prolonged QRS Duration and Severity of Mitral Regurgitation are Unfavorable Prognostic Markers of Heart Failure in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy*. Circulation Journal. 2006;70:57-62.
257. Kalahasti, V., Nambi, V., Martin, D. O., Lam, C. T., Yamada, D., Wilkoff, B. L., Niebauer, M. J., Jaeger, F. J., Tchou, P. J. and Chung, M. K., *QRS duration and prediction of mortality in patients undergoing risk stratification for ventricular arrhythmias*. The American Journal of Cardiology. 2003;92:798-803.
258. Murkofsky, R. L., Dangas, G., Diamond, J. A., Mehta, D., Schaffer, A. and Ambrose, J. A., *A prolonged QRS duration on surface electrocardiogram is a specific indicator of left ventricular dysfunction*. Journal of the American College of Cardiology. 1998;32:476-482.
259. Charpentier, F., Derangeon, M., Montnach, J. and Baró, I., *Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias*. Frontiers in Physiology. 2012;3.
260. Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D. M., Lowe, J. S., Harris, L., Atack, T. C., Wang, D. W., Hipkens, S. B., Leake, B., Hall, L., Kupersmidt, S., Chopra, N., Magnuson, M. A., Tanabe, N., Knollmann, B. C., George, A. L. and Roden, D. M., *Striking In Vivo Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation Producing Minimal Changes in Vitro*. Circulation. 2011;124:1001-1011.
261. Shy, D., Gillet, L. and Abriel, H., *Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2013;1833:886-894.
262. Giorgi, C., Agnoletto, C., Baldini, C., Bononi, A., Bonora, M., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., Zavan, B. and Pinton,

- P., *Redox control of protein kinase C: cell- and disease-specific aspects*. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;13:1051-85.
263. Lin, X., Liu, N., Lu, J., Zhang, J., Anumonwo, J., Isom, L. L., Fishman, G. I. and Delmar, M., *Subcellular heterogeneity of sodium current properties in adult cardiac ventricular myocytes*. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2011;8:1923-1930.
264. Jansen, J. A., Noorman, M., Musa, H., Stein, M., de Jong, S., van der Nagel, R., Hund, T. J., Mohler, P. J., Vos, M. A., van Veen, T. A., de Bakker, J. M., Delmar, M. and van Rijen, H. V., *Reduced Heterogeneous Expression Of Cx43 Results In Decreased Nav1.5 Expression And Reduced Sodium Current Which Accounts For Arrhythmia Vulnerability In Conditional Cx43 Knockout Mice*. *Heart Rhythm*. 2012;9:600-607.
265. McIntosh, V. J., Chandrasekera, P. C. and Lasley, R. D. *Sex differences and the effects of ovariectomy on the β -adrenergic contractile response*; 2011.
266. Schwertz, D. W., Vizgirda, V., Solaro, R. J., Piano, M. R. and Ryjewski, C., *Sexual dimorphism in rat left atrial function and response to adrenergic stimulation*. *Mol Cell Biochem*. 1999;200:143-53.
267. Vizgirda, V. M., Wahler, G. M., Sondgeroth, K. L., Ziolo, M. T. and Schwertz, D. W., *Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation*. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282:H256-63.
268. Dent, M. R., Tappia, P. S. and Dhalla, N. S., *Gender differences in β -adrenoceptor system in cardiac hypertrophy due to arteriovenous fistula*. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226:181-186.
269. Bordallo, J., Secades, L., Bordallo, C., Cantabrana, B. and Sánchez, M., *Influence of gender and sex hormones on 5 α -dihydrotestosterone elicited effect in isolated left atria of rats: Role of β -adrenoceptors and ornithine decarboxylase activity*. *European Journal of Pharmacology*. 2009;604:103-110.
270. Mehel, H., Emons, J., Vettel, C., Wittköpper, K., Seppelt, D., Dewenter, M., Lutz, S., Sossalla, S., Maier, L. S., Lechêne, P., Leroy, J., Lefebvre, F., Varin, A., Eschenhagen, T., Nattel, S., Dobrev, D., Zimmermann, W.-H., Nikolaev, V. O., Vandecasteele, G., Fischmeister, R. and El-Armouche, A., *Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts β -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62:1596-1606.

271. Fischer, M., Baessler, A. and Schunkert, H., *Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res. 2002;53:672-7.
272. Hein, S., Scholz, D., Fujitani, N., Rennollet, H., Brand, T., Friedl, A. and Schaper, J., *Altered Expression of Titin and Contractile Proteins in Failing Human Myocardium*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 1994;26:1291-1306.
273. Belin, R. J., Sumandea, M. P., Kobayashi, T., Walker, L. A., Rundell, V. L., Urboniene, D., Yuzhakova, M., Ruch, S. H., Geenen, D. L., Solaro, R. J. and de Tombe, P. P., *Left ventricular myofilament dysfunction in rat experimental hypertrophy and congestive heart failure*. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2006;291:H2344-53.
274. Noguchi, T., Kihara, Y., Begin, K. J., Gorga, J. A., Palmiter, K. A., LeWinter, M. M. and VanBuren, P., *Altered Myocardial Thin-Filament Function in the Failing Dahl Salt-Sensitive Rat Heart: Amelioration by Endothelin Blockade*. Circulation. 2003;107:630-635.
275. Moss, R. L., Fitzsimons, D. P. and Ralphe, J. C., *Cardiac MyBP-C Regulates the Rate and Force of Contraction in Mammalian Myocardium*. Circulation Research. 2015;116:183-192.
276. Mahmoodzadeh, S., Eder, S., Nordmeyer, J., Ehler, E., Huber, O., Martus, P., Weiske, J., Pregla, R., Hetzer, R. and Regitz-Zagrosek, V., *Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure*. The FASEB Journal. 2006;20:926-934.
277. Nordmeyer, J., Eder, S., Mahmoodzadeh, S., Martus, P., Fielitz, J., Bass, J., Bethke, N., Zurbrügg, H. R., Pregla, R., Hetzer, R. and Regitz-Zagrosek, V., *Upregulation of Myocardial Estrogen Receptors in Human Aortic Stenosis*. Circulation. 2004;110:3270-3275.
278. Patel, B. M. and Desai, V. J., *Beneficial role of tamoxifen in experimentally induced cardiac hypertrophy*. Pharmacological Reports. 2014;66:264-272.
279. Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Nairn, A. C., Liggett, S. B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E. G., DePaoli-Roach, A. A., Robbins, J., Hewett, T. E., Bibb, J. A., Westfall, M. V., Kranias, E. G. and Molkentin, J. D., *PKC-[alpha] regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure*. Nat Med. 2004;10:248-254.
280. Liu, Q., Chen, X., MacDonnell, S. M., Kranias, E. G., Lorenz, J. N., Leitges, M., Houser, S. R. and Molkentin, J. D., *Protein Kinase Ca, but*

Not PKC β or PKC γ , Regulates Contractility and Heart Failure Susceptibility: Implications for Ruboxistaurin as a Novel Therapeutic Approach. Circulation Research. 2009;105:194-200.

281. Hambleton, M., Hahn, H., Pleger, S. T., Kuhn, M. C., Klevitsky, R., Carr, A. N., Kimball, T. F., Hewett, T. E., Dorn, G. W., Koch, W. J. and Molkenkin, J. D., *Pharmacological- and Gene Therapy-Based Inhibition of Protein Kinase Ca β Enhances Cardiac Contractility and Attenuates Heart Failure.* Circulation. 2006;114:574-582.
282. Bayer, A. L., Heidkamp, M. C., Patel, N., Porter, M., Engman, S. and Samarel, A. M., *Alterations in protein kinase C isoenzyme expression and autophosphorylation during the progression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy.* Mol Cell Biochem. 2003;242:145-52.
283. Ferrario, C. M., *Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease-Therapeutic Implications of More Than a Century of Research.* Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2006;7:3-14.
284. Dahlöf, B., Devereux, R. B., Kjeldsen, S. E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L. H., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S. and Wedel, H., *Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol.* The Lancet. 2002;359:995-1003.
285. van Vark, L. C., Bertrand, M., Akkerhuis, K. M., Brugts, J. J., Fox, K., Mourad, J.-J. and Boersma, E., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158 998 patients.* European Heart Journal. 2012;33:2088-2097.
286. Bangalore, S., Kumar, S., Wetterslev, J. and Messerli, F. H., *Angiotensin receptor blockers and risk of myocardial infarction: meta-analyses and trial sequential analyses of 147 020 patients from randomised trials.* BMJ : British Medical Journal. 2011;342:d2234.
287. Cleland, J. G. F., Tendera, M., Adamus, J., Freemantle, N., Polonski, L. and Taylor, J., *The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study.* European Heart Journal. 2006;27:2338-2345.
288. Cohn, J. N. and Tognoni, G., *A Randomized Trial of the Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure.* New England Journal of Medicine. 2001;345:1667-1675.

289. Granger, C. B., McMurray, J. J. V., Yusuf, S., Held, P., Michelson, E. L., Olofsson, B., Östergren, J., Pfeffer, M. A. and Swedberg, K., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial*. The Lancet. 2003;362:772-776.
290. Young, J. B., Dunlap, M. E., Pfeffer, M. A., Probstfield, J. L., Cohen-Solal, A., Dietz, R., Granger, C. B., Hradec, J., Kuch, J., McKelvie, R. S., McMurray, J. J., Michelson, E. L., Olofsson, B., Östergren, J., Held, P., Solomon, S. D., Yusuf, S. and Swedberg, K., *Mortality and morbidity reduction with Candesartan in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction: results of the CHARM low-left ventricular ejection fraction trials*. Circulation. 2004;110:2618-26.
291. Dell'Italia, L. J. and Oparil, S., *Bradykinin in the heart: friend or foe?* Circulation. 1999;100:2305-7.
292. Ehrlich, J. R., Hohnloser, S. H. and Nattel, S., *Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence*. Eur Heart J. 2006;27:512-8.
293. Murray, K. T., Rottman, J. N., Arbogast, P. G., Shemanski, L., Primm, R. K., Campbell, W. B., Solomon, A. J., Olgin, J. E., Wilson, M. J., DiMarco, J. P., Beckman, K. J., Dennish, G., Naccarelli, G. V. and Ray, W. A., *Inhibition of angiotensin II signaling and recurrence of atrial fibrillation in AFFIRM*. Heart Rhythm. 2004;1:669-675.
294. Iravanian, S. and Dudley, S. C., *The Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) and Cardiac Arrhythmias*. Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society. 2008;5:s12-s17.
295. Obeyesekere, M. N., Chan, W., Stub, D., Prabhu, S., Teo, E. P., Toogood, G., Mariani, J., Broughton, A. and Kistler, P. M., *Left Ventricular Ejection Fraction and Absence of ACE Inhibitor/Angiotensin II Receptor Blocker Predicts Appropriate Defibrillator Therapy in the Primary Prevention Population*. Pacing and Clinical Electrophysiology. 2010;33:696-704.
296. Gao, G., Xie, A., Zhang, J., Herman, A. M., Jeong, E. M., Gu, L., Liu, M., Yang, K. C., Kamp, T. J. and Dudley, S. C., *Unfolded Protein Response Regulates Cardiac Sodium Current in Systolic Human Heart Failure*. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology. 2013;6:1018-1024.
297. Domenighetti, A. A., Boixel, C., Cefai, D., Abriel, H. and Pedrazzini, T., *Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2007;42:63-70.

298. Fischer, R., Dechend, R., Gapelyuk, A., Shagdarsuren, E., Gruner, K., Gruner, A., Gratze, P., Qadri, F., Wellner, M., Fiebeler, A., Dietz, R., Luft, F. C., Muller, D. N. and Schirdewan, A., *Angiotensin II-induced sudden arrhythmic death and electrical remodeling*. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2007;293:H1242-53.
299. Gusev, K., Domenighetti, A. A., Delbridge, L. M. D., Pedrazzini, T., Niggli, E. and Egger, M., *Angiotensin II-Mediated Adaptive and Maladaptive Remodeling of Cardiomyocyte Excitation-Contraction Coupling*. Circulation Research. 2009;105:42-50.
300. Domenighetti, A. A., Wang, Q., Egger, M., Richards, S. M., Pedrazzini, T. and Delbridge, L. M. D., *Angiotensin II-Mediated Phenotypic Cardiomyocyte Remodeling Leads to Age-Dependent Cardiac Dysfunction and Failure*. Hypertension. 2005;46:426-432.
301. Huggins, C. E., Domenighetti, A. A., Pedrazzini, T., Pepe, S. and Delbridge, L. M., *Elevated intracardiac angiotensin II leads to cardiac hypertrophy and mechanical dysfunction in normotensive mice*. Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2003;4:186-190.
302. Dullum, M. K. C. and Dullum, M. K. D., *Confusion in Revascularization: Are Women Different and Why?* Cardiology in Review. 2008;16:30-35.
303. Wenger, N. K., *You've Come a Long Way, Baby: Cardiovascular Health and Disease in Women: Problems and Prospects*. Circulation. 2004;109:558-560.
304. Kostis, J. B., Packer, M., Black, H. R., Schmieder, R., Henry, D. and Levy, E., *Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial**. American Journal of Hypertension. 2004;17:103-111.
305. Packer, M., Califf, R. M., Konstam, M. A., Krum, H., McMurray, J. J., Rouleau, J.-L., Swedberg, K. and Group, f. t. O. S., *Comparison of Omapatrilat and Enalapril in Patients With Chronic Heart Failure: The Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE)*. Circulation. 2002;106:920-926.
306. Braun, M. U., LaRosee, P., Schon, S., Borst, M. M. and Strasser, R. H., *Differential regulation of cardiac protein kinase C isozyme expression after aortic banding in rat*. Cardiovasc Res. 2002;56:52-63.
307. Mathieu, S., El Khoury, N., Rivard, K., Paradis, P., Nemer, M. and Fiset, C., *Reduction in Na⁺ Current by Angiotensin II is Mediated by PKC α in*

Mouse and Human Cardiomyocytes. Heart Rhythm. 2015;accepted with major revision.

308. Kooij, V., Zhang, P., Piersma, S. R., Sequeira, V., Boontje, N. M., Wijnker, P. J. M., Jiménez, C. R., Jaquet, K. E., dos Remedios, C., Murphy, A. M., Van Eyk, J. E., van der Velden, J. and Stienen, G. J. M., *PKCa-Specific Phosphorylation of the Troponin Complex in Human Myocardium: A Functional and Proteomics Analysis*. PLoS ONE. 2013;8:e74847.
309. Kooij, V., Boontje, N., Zaremba, R., Jaquet, K., dos Remedios, C., Stienen, G. M. and van der Velden, J., *Protein kinase C α and ϵ phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca^{2+} sensitivity in human myocardium*. Basic Res Cardiol. 2010;105:289-300.
310. van der Velden, J., Narolska, N. A., Lamberts, R. R., Boontje, N. M., Borbely, A., Zaremba, R., Bronzwaer, J. G., Papp, Z., Jaquet, K., Paulus, W. J. and Stienen, G. J., *Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium*. Cardiovasc Res. 2006;69:876-87.
311. Ladage, D., Tilemann, L., Ishikawa, K., Correll, R. N., Kawase, Y., Houser, S. R., Molkentin, J. D. and Hajjar, R. J., *Inhibition of PKC α/β With Ruboxistaurin Antagonizes Heart Failure in Pigs After Myocardial Infarction Injury*. Circulation Research. 2011;109:1396-1400.
312. Hammoudi, N., Ishikawa, K. and Hajjar, R. J., *Adeno-associated virus-mediated gene therapy in cardiovascular disease*. Current opinion in cardiology. 2015;30:228-34.
313. Gorski, Przemek A., Ceholski, Delaine K. and Hajjar, Roger J., *Altered Myocardial Calcium Cycling and Energetics in Heart Failure—A Rational Approach for Disease Treatment*. Cell Metabolism. 2015;21:183-194.
314. Greenberg, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K. M., Butler, J., Felker, G. M., Voors, A. A., Rudy, J. J., Wagner, K. and Hajjar, R. J., *Design of a Phase 2b Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Advanced Heart Failure: The CUPID 2 Trial (Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease Phase 2b)*. JACC: Heart Failure. 2014;2:84-92.
315. Zsebo, K., Yaroshinsky, A., Rudy, J. J., Wagner, K., Greenberg, B., Jessup, M. and Hajjar, R. J., *Long-Term Effects of AAV1/SERCA2a Gene Transfer in Patients With Severe Heart Failure: Analysis of Recurrent Cardiovascular Events and Mortality*. Circulation Research. 2014;114:101-108.

316. Wehling, M., *Assessing the translatability of drug projects: what needs to be scored to predict success?* Nat Rev Drug Discov. 2009;8:541-546.
317. Begley, C. G. and Ellis, L. M., *Drug development: Raise standards for preclinical cancer research.* Nature. 2012;483:531-533.
318. Mochly-Rosen, D., Das, K. and Grimes, K. V., *Protein kinase C, an elusive therapeutic target?* Nat Rev Drug Discov. 2012;11:937-957.
319. Churchill, E. N., Murriel, C. L., Chen, C.-H., Mochly-Rosen, D. and Szweda, L. I., *Reperfusion-Induced Translocation of δ PKC to Cardiac Mitochondria Prevents Pyruvate Dehydrogenase Reactivation.* Circulation Research. 2005;97:78-85.
320. Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M.-H., Sun, L. and Mochly-Rosen, D., *Mitochondrial import of PKC ϵ is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury.* Cardiovascular Research. 2010;88:83-92.
321. Johnson, M. *Souris et Rats de Laboratoire. MATER METHODS 2012;2:113.* 2015.
322. Yang, J., Jiang, H., Yang, J., Ding, J.-W., Chen, L.-H., Li, S. and Zhang, X.-D., *Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia–reperfusion injury through TLR4/NF- κ B signaling pathway.* Mol Cell Biochem. 2009;330:39-46.
323. Opavsky, M. A., Martino, T., Rabinovitch, M., Penninger, J., Richardson, C., Petric, M., Trinidad, C., Butcher, L., Chan, J. and Liu, P. P., *Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis.* The Journal of Clinical Investigation. 2002;109:1561-1569.
324. Bendall, J. K., Heymes, C., Wright, T. J. F., Wheatcroft, S., Grieve, D. J., Shah, A. M. and Cave, A. C., *Strain-Dependent Variation in Vascular Responses to Nitric Oxide in the Isolated Murine Heart.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2002;34:1325-1333.
325. Zhang, J., Wilson, G. F., Soerens, A. G., Koonce, C. H., Yu, J., Palecek, S. P., Thomson, J. A. and Kamp, T. J., *Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells.* Circulation Research. 2009;104:e30-e41.
326. Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flügel, L., Dorn, T., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schömig, A. and Laugwitz, K.-L., *Patient-Specific Induced*

Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. New England Journal of Medicine. 2010;363:1397-1409.

327. Yang, X., Pabon, L. and Murry, C. E., *Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.* Circulation Research. 2014;114:511-523.
328. Sartiani, L., Bettioli, E., Stillitano, F., Mugelli, A., Cerbai, E. and Jaconi, M. E., *Developmental Changes in Cardiomyocytes Differentiated from Human Embryonic Stem Cells: A Molecular and Electrophysiological Approach.* STEM CELLS. 2007;25:1136-1144.
329. Itzhaki, I., Rapoport, S., Huber, I., Mizrahi, I., Zwi-Dantsis, L., Arbel, G., Schiller, J. and Gepstein, L., *Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes.* PLoS ONE. 2011;6:e18037.
330. Escobar, A. L., Perez, C. G., Reyes, M. E., Lucero, S. G., Kornyejev, D., Mejía-Alvarez, R. and Ramos-Franco, J., *Role of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in the regulation of ventricular Ca²⁺ signaling in intact mouse heart.* Journal of molecular and cellular cardiology. 2012;53:768-779.
331. Nuss, H. B. and Marban, E., *Electrophysiological properties of neonatal mouse cardiac myocytes in primary culture.* The Journal of Physiology. 1994;479:265-279.
332. Chioni, A.-M., Fraser, S. P., Pani, F., Foran, P., Wilkin, G. P., Diss, J. K. J. and Djamgoz, M. B. A., *A novel polyclonal antibody specific for the Nav1.5 voltage-gated Na⁺ channel 'neonatal' splice form.* Journal of Neuroscience Methods. 2005;147:88-98.
333. Sen, L. and Smith, T. W., *T-type Ca²⁺ channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts.* Circulation Research. 1994;75:149-55.
334. Nuss, H. B. and Houser, S. R., *T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes.* Circulation Research. 1993;73:777-82.
335. Huang, B., Qin, D., Deng, L., Boutjdir, M. and N, E.-S., *Reexpression of T-type Ca²⁺ channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle.* Cardiovasc Res. 2000;46:442-9.
336. Izumi, T., Kihara, Y., Sarai, N., Yoneda, T., Iwanaga, Y., Inagaki, K., Onozawa, Y., Takenaka, H., Kita, T. and Noma, A., *Reinduction of T-Type*

Calcium Channels by Endothelin-1 in Failing Hearts In Vivo and in Adult Rat Ventricular Myocytes In Vitro. Circulation. 2003;108:2530-2535.

337. Vassort, G., Talavera, K. and Alvarez, J. L., *Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart.* Cell Calcium. 2006;40:205-220.
338. Ono, K. and Iijima, T., *Cardiac T-type Ca²⁺ channels in the heart.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2010;48:65-70.
339. Benitah, J. P., Gomez, A. M., Fauconnier, J., Kerfant, B. G., Perrier, E., Vassort, G. and Richard, S., *Voltage-gated Ca²⁺ currents in the human pathophysiologic heart: a review.* Basic Res Cardiol. 2002;97 Suppl 1:I11-8.
340. Wenger, N. K., *Cardiovascular Disease: The Female Heart Is Vulnerable.* Clinical cardiology. 2012;35:134-135.
341. *Decrease in U.S. Deaths from Coronary Disease.* New England Journal of Medicine. 2007;357:941-941.
342. Dzau, V. J., Antman, E. M., Black, H. R., Hayes, D. L., Manson, J. E., Plutzky, J., Popma, J. J. and Stevenson, W., *The Cardiovascular Disease Continuum Validated: Clinical Evidence of Improved Patient Outcomes: Part I: Pathophysiology and Clinical Trial Evidence (Risk Factors Through Stable Coronary Artery Disease).* Circulation. 2006;114:2850-2870.
343. Pepine, C. J., *Ischemic heart disease in women: facts and wishful thinking.* Journal of the American College of Cardiology. 2004;43:1727-1730.
344. Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., Wylie-Rosett, J., Committee, o. b. o. t. A. H. A. S. and Subcommittee, S. S., *Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update: A Report From the American Heart Association.* Circulation. 2010;121:e46-e215.
345. Kim, E. S. H., Carrigan, T. P. and Menon, V., *Enrollment of Women in National Heart, Lung, and Blood Institute-Funded Cardiovascular Randomized Controlled Trials Fails to Meet Current Federal Mandates for Inclusion.* Journal of the American College of Cardiology. 2008;52:672-673.

346. The National Coalition for Women with Heart disease and SHWR. *10Q Report: Advancing Women's Heart Health through Improved Research, Diagnosis and Treatment*. 2011:1-20.
347. Bairey Merz, C. N., Kelsey, S. F., Pepine, C. J., Reichek, N., Reis, S. E., Rogers, W. J., Sharaf, B. L. and Sopko, G., *The Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: protocol design, methodology and feasibility report*. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;33:1453-1461.
348. Mosca, L., Linfante, A. H., Benjamin, E. J., Berra, K., Hayes, S. N., Walsh, B. W., Fabunmi, R. P., Kwan, J., Mills, T. and Simpson, S. L., *National Study of Physician Awareness and Adherence to Cardiovascular Disease Prevention Guidelines*. *Circulation*. 2005;111:499-510.
349. Jneid, H., Fonarow, G. C., Cannon, C. P., Hernandez, A. F., Palacios, I. F., Maree, A. O., Wells, Q., Bozkurt, B., LaBresh, K. A., Liang, L., Hong, Y., Newby, L. K., Fletcher, G., Peterson, E., Wexler, L., Committee, f. t. G. W. t. G. S. and Investigators, *Sex Differences in Medical Care and Early Death After Acute Myocardial Infarction*. *Circulation*. 2008;118:2803-2810.
350. Nagueh, S. F., Appleton, C. P., Gillebert, T. C., Marino, P. N., Oh, J. K., Smiseth, O. A., Waggoner, A. D., Flachskampf, F. A., Pellikka, P. A. and Evangelista, A., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography*. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2009;22:107-133.
351. Zopf, Y., Rabe, C., Neubert, A., Gaßmann, K. G., Rascher, W., Hahn, E. G., Brune, K. and Dormann, H., *Women encounter ADRs more often than do men*. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64:999-1004.
352. Paulus, W. J. and van Ballegoij, J. J. M., *Treatment of Heart Failure With Normal Ejection Fraction: An Inconvenient Truth!* *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55:526-537.
353. Hunt, S. A., Abraham, W. T., Chin, M. H., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., Jessup, M., Konstam, M. A., Mancini, D. M., Michl, K., Oates, J. A., Rahko, P. S., Silver, M. A., Stevenson, L. W. and Yancy, C. W., *2009 Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:e1-e90.

354. Heart Failure Society Of, A., *Executive Summary: HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline*. Journal of Cardiac Failure. 2006;12:10-38.
355. Paulus, W. J., Tschope, C., Sanderson, J. E., Rusconi, C., Flachskampf, F. A., Rademakers, F. E., Marino, P., Smiseth, O. A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A. F., Borbely, A., Edes, I., Handoko, M. L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A. G. and Brutsaert, D. L., *How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J. 2007;28:2539-50.

ANNEXE I : Curriculum vitae

Réalisations professionnelles

Bourses

- **2009** Bourse de recrutement à la maîtrise de la FESP de l'Université de Montréal (\$6'000)
 - **2009** Bourse de formation de 2^e cycle de la fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal (\$12'000)
 - **2010** Bourse d'excellence pour le passage direct au doctorat de la FESP de l'Université de Montréal (\$7'000)
 - **2010** Bourse de recrutement au doctorat de la FESP de l'Université de Montréal (\$9'000)
 - **2010** Bourse de formation de 3^e cycle du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (\$12'000)
 - **2012** Bourse de support de la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (\$2'000)
 - **2014** Bourse de voyage pour participer aux séminaires sur le développement du médicament (SSM6) à BarceloneTravel (\$2'250)
 - **2014** Bourse de fin d'études doctorales de rédaction de thèse de la FESP de l'Université de Montréal (\$9'000)
-

Prix

- **2009** Finaliste pour le prix de leadership Dominico Regoli décerné pour l'excellence et l'implication dans la vie académique des étudiants en pharmacologie de l'Université de Sherbrooke
 - **2010** 1^{er} prix de la meilleure présentation par affiche en pharmacologie lors de la 2^e journée de présentations scientifiques du CESC de la Faculté de Pharmacie, Université de Montréal
 - **2010** 2^e prix de la meilleure présentation par affiche à la maîtrise lors de la XIII^e journée de la recherche de l'ICM offert par le réseau en santé cardiovasculaire du FRSQ
 - **2012** Prix Jacques-Genest, 1^{er} prix de la meilleure présentation orale des étudiants gradués lors de la 54^e réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ)
 - **2013** 3^e prix de la meilleure présentation par affiche de la catégorie doctorat/postdoctorat lors de la XVI^e journée de la recherche de l'ICM
 - **2013** Prix de la meilleure présentation par affiche par catégorie lors du XXVII^e symposium du GEPRM
 - **2014** Prix Martial Bourassa, 1^{ère} place pour la meilleure présentation des étudiants au doctorat lors de la journée de la recherche de l'ICM
-

Publications

Papiers (*co-première auteure)

1. Kaloustian S, Wann BP, Bah MT, Apostolakis A, Isaak S, **Mathieu S**, Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G. *Apoptosis time chase in the limbic system following myocardial infarction in the rat*, Brain Research, 2008;1216:87-91.
2. Kaloustian S, Bah TM, **Mathieu S**, Lada-Moldovan L, Rondeau I, Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G. *Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction*, Apoptosis, 2009;14:1308-16.
3. El Khoury N, **Mathieu S***, Marger L, Ross J, El Gebeily G, Ethier N, Fiset C. *Upregulation of the hyperpolarization Activated Current Increases Pacemaker Activity of the Sino-Atrial Node and Heart Rate during Pregnancy in Mice*, Circulation, 2013; 127(20):2009-2020.
4. El Khoury N, **Mathieu S**, Fiset C. *Interleukin-1 Modulates Cardiac L-type Calcium Channel via PKC Signalling Pathways in Mice*. J. Biol. Chem., 2014; 289(32):21896-908.
5. El Gebeily G, El Khoury N, **Mathieu S***, Brouillette J, Fiset C. *Estrogen Receptor α Regulates the Transient Outward K^+ Current in the Mouse Heart*, J. Mol. Cell. Cardiol., 2015; 20(86):85-94.
6. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *Reduction in Na^+ current by Angiotensin II is mediated by $PKC\alpha$ in mouse and human iPSC-cardiomyocytes*, Heart Rhythm, 2015. (accepté avec révisions majeures)
7. **Mathieu S**, Rivard K, El Khoury N, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *Female Mice Display More Severe Alterations in Ca^{2+} Homeostasis with Cardiac Overexpression of the Angiotensin II Type 1 Receptor*, Circ. Heart Fail., 2015. (soumis)

Abrégés

Présentations orales

1. Katy Rivard, **Sophie Mathieu**, Mona Nemer, Pierre Paradis et Céline Fiset. *La surexpression cardiaque du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) est associée à une diminution du courant calcique de type L chez les souris mâles et femelles*, 78th meeting of the ACFAS, May 12th, 2010. Montréal, (QC, CAN), page 78. (I presented the results at this meeting)
2. **Mathieu S**, Rivard K, Paradis P, Nemer M et Fiset C. *Les souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) au niveau cardiaque présentent une diminution des courants calciques ventriculaires indépendante du sexe*, 52nd meeting of Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), September 25th, 2010. Bromont (QC, CA), #122.
3. Rivard K, **Mathieu S**, Paradis P, Nemer M and Fiset C. *Sex differences in sudden cardiac death is associated with chronic stimulation of type 1 angiotensin II receptor in mice*, *Innovations in Gender, Sex and Health Research Conference*, Institute of Gender and Health, Canadian Institute of Health Research (CIHR),

November 22nd, 2010. Toronto (QC, CA), B10. (*I presented the results at this meeting*)

4. **Mathieu S**, Rivard K, El Khoury N, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *Régulation des courants calciques ventriculaires par l'angiotensine II chez les souris mâles et femelles*, 14th Montreal Heart Institute Research Day, June 2nd 2011, Montreal, (QC, CA).
5. **Mathieu S**, Rivard K, El Khoury N, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *L'angiotensine II (ANGII) réduit les courants calciques ventriculaires chez les souris mâles et femelles*, 53rd meeting of Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), September 23rd, 2011, St-Adèle (Qc, CA), #101.
6. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *La réduction du courant sodique ventriculaire des souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II contribue au développement d'arythmies cardiaques*, 54th meeting of Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), October 13th 2012, Orford (Qc, CA), #116.
7. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M and Fiset C. *Le courant sodique (I_{Na}) est réduit dans les ventricules de souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (ANGII)*, 15th Montreal Heart Institute Research Day, June 7th, 2012, Montreal (QC, CA)
8. **Mathieu S**, El Khoury N, El Gebeily G, Brouillette J, Fiset C. *Les oestrogènes régulent $K_{A.3}$ et le courant potassique transitoire sortant, I_{to} , via les récepteurs aux oestrogènes alpha*, 55th meeting of Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), September 27th, 2013, Manoir du Lac Delage, (Qc, CA), #126.

Présentations par affiche

1. Katy Rivard, **Sophie Mathieu**, Mona Nemer and Céline Fiset. *Reductions in ventricular Ca^{2+} current occur independently of cardiac remodelling in transgenic mice with cardiac specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor*, Biophysical Society, 54th annual meeting, February 20-24th, 2010. San Francisco (CA, US), page 129. (*I presented the results at this meeting*)
2. **Sophie Mathieu**, Katy Rivard, Mona Nemer and Céline Fiset. *La surexpression cardiaque du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) est associée à une diminution du courant calcique de type L chez les souris mâles et femelles*, 2nd scientific presentation day of the Faculty of pharmacy (CECSP), April 15th, 2010. Faculty of pharmacy, Université de Montréal, Montreal (QC, CA).
3. **Sophie Mathieu**, Katy Rivard, Mona Nemer and Céline Fiset. *La surexpression cardiaque du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) est associée à une diminution du courant calcique de type L chez les souris mâles et femelles*, 13th Montreal Heart Institute Research Day, June 3rd, 2010. Montreal, (QC, CA).
4. **Mathieu S**, Rivard K, El Khoury N, Paradis P, Nemer M and Fiset C. *Calcium Current Regulation by Angiotensin II in Male and Female Mouse Ventricles*, International Society for Heart Research- American Section, May 22-25th, 2011, Philadelphia (PA, US).
5. **Mathieu S**, Rivard K, El Khoury N, Paradis P, Nemer M and Fiset C. *Angiotensin II Regulation of Calcium current in Mouse Ventricles*, Canadian Society for

- Pharmaceutical Sciences, May 24-27th, 2011, Montreal, (QC, CA).
6. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M and Fiset C. *Sodium Current is Reduced in Mice with Cardiac Specific Overexpression of Type 1 Angiotensin II Receptor*, International Society for Heart Research- American Section, May 28th-31st, 2012, Banff (AB, CA).
 7. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M and Fiset C. *Cardiac Overexpression of Type 1 Angiotensin II Receptor in Mice Causes an Important Decrease in Sodium Current*, CIHR-Young Investigator Forum, June 4th-6th, 2012, Montreal (QC, CA).
 8. **Mathieu S**, El Khoury N, El Gebeily G, Brouillette J, Fiset C. *Implication des récepteurs oestrogéniques alpha dans la régulation de Kv4.3 et du courant potassique transitoire sortant indépendant du calcium, I_{to}* , 16th Montreal Heart Institute Research Day, June 6th, 2013, Montréal (QC, CA).
 9. **Mathieu S**, El Khoury N, El Gebeily G, Brouillette J, Fiset C. *Estrogen regulation of the transient outward potassium current I_{to} is mediated by alpha estrogen receptor*, XXVII^e GEPROM Symposium, June 12-13th, 2013, Montreal (QC, CA).
 10. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *Régulation du courant sodique ventriculaire par l'angiotensine II*, 17th Montreal Heart Institute Research Day, Junes 5th, 2014, Montréal (QC, CA).
 11. **Mathieu S**, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. *Modulation du courant sodique ventriculaire par l'angiotensine II*, 56th meeting of Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), September 18-20th, 2014, Ste-Adèle (QC, CA), #25.

Engagements envers la communauté scientifique

Activités extracurriculaires

Juillet 2014	<i>Summer School on Medicines (SSM6)</i> , Université de Montréal, Université de Toulouse and University of Barcelona
Mai 2014	Séminaire sur la propriété intellectuelle et l'éthique, Université de Montréal
Hiver 2010	<i>Scientific and Technical Writing</i> , Université de Montréal
Automne 2009	<i>English Communications Skills</i> , Université de Montréal

Parution

Novembre 2012	ICM Express: Sophie Mathieu, récipiendaire du Prix Jacques-Genest 2012, Montreal Heart Institute journal, Vol 23 no21, p.1
Decembre 2012	Phacteur: Prix Jacques-Genest Sophie Mathieu récipiendaire Faculty of pharmacy journal, no 5, p.2

Mars **2013** Recherche en Santé: Sophie Mathieu, Prix Jacques-Genest
FQRS-Fonds de la recherche en santé journal, no 5, p.11

Scientific activities

Janvier **2012-...** Memre associé à la faculté 1000 (F1000)

2012-2014 Membre étudiant du comité de déontologie animale

Janvier-Août **2013** Supervision de stagiaire

ANNEXE II : Données supplémentaires

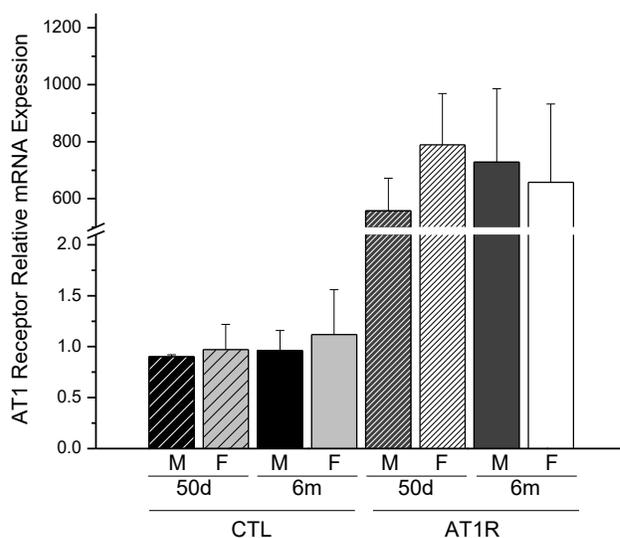


Figure II.1 Expression du récepteur AT1 dans les souris CTL et AT1R des deux sexes (M : mâle, F : femelle) à l'âge de 50 jours (50d) et 6 mois (6m). Les statistiques démontrent une augmentation de l'expression chez les souris AT1R en comparaison aux CTL. Aucune différence n'est détectée entre les sexes ou l'âge.

			RR interval (ms)	HR (bpm)	PR interval (ms)	PR segment (ms)	QRS complex (ms)	QT interval (ms)	QTc interval (ms)
M	50d	CTL (11)	111.8 ± 4.4	545.7 ± 21.0	31.4 ± 0.7	20.9 ± 0.7	17.0 ± 0.4	45.1 ± 1.1	42.8 ± 0.9
		AT1R (7)	131.0 ± 2.6*	459.3 ± 9.4*	42.9 ± 1.0*	27.9 ± 1.0*	22.2 ± 1.5*	58.2 ± 1.1*	49.4 ± 1.5*
	6m	CTL (9)	114.4 ± 3.3	528.6 ± 16.4	37.5 ± 1.8†	26.3 ± 1.2	17.0 ± 0.6	47.6 ± 1.3	44.5 ± 1.0
		AT1R (9)	126.1 ± 1.9*	476.8 ± 7.1*	46.9 ± 1.7*	26.8 ± 1.8	21.7 ± 0.6*	55.2 ± 0.9*	49.2 ± 0.9*
F	6m	CTL (9)	109.9 ± 2.8	548.9 ± 13.7	37.7 ± 1.5	24.4 ± 0.7	16.0 ± 0.8	45.1 ± 1.5	43.0 ± 1.0
		AT1R (6)	120.9 ± 2.0*	496.9 ± 8.2*	51.4 ± 2.1*	36.7 ± 3.2*‡	21.2 ± 1.9*	51.2 ± 3.*	49.7 ± 0.7*

Table II.1 Paramètres mesurés sur des ECG de surface sur les souris AT1R et CTL mâles (M) et femelles (F) à l'âge de 50 jours (50d) et 6 mois (6m). * $p < 0.05$ vs CTL du même sexe, † $p < 0.05$ versus M 50d CTL, ‡ $p < 0.05$ vs M AT1R 6m. Les statistiques ont été réalisées dans un premier temps entre les mâles des deux âges puis dans un deuxième temps les animaux de 6 mois des deux sexes par un ANOVA suivi du test post hoc Fisher.

			RR interval (ms)	HR (bpm)	PR interval (ms)	PR segment (ms)	QRS
6m	M	CTL (9)	175.5 ± 12.1	361.6 ± 23.3	40.0 ± 2.6	31.9 ± 2.6	10.6 ± 0.4
		AT1R (11)	179.1 ± 7.1	348.1 ± 15.4	52.1 ± 4.5*	40.6 ± 4.2	12.8 ± 0.8*
	F	CTL (8)	177.9 ± 9.5	363.7 ± 14.1	37.5 ± 1.5	28.0 ± 1.2	10.4 ± 0.3
		AT1R (9)	193.0 ± 13.5	341.7 ± 15.8	63.6 ± 4.7* [‡]	41.1 ± 5.4*	12.8 ± 0.7*

Table II.2. Paramètres mesurés sur des ECG en Langendorff sur les cœurs isolés de souris AT1R et CTL mâles (M) et femelles (F) à l'âge 6 mois (6m). * $p < 0.05$ vs CTL du même sexe, [‡] $p < 0.05$ vs M AT1R 6m. Les statistiques ont été réalisées avec un ANOVA suivi du test post hoc Fisher

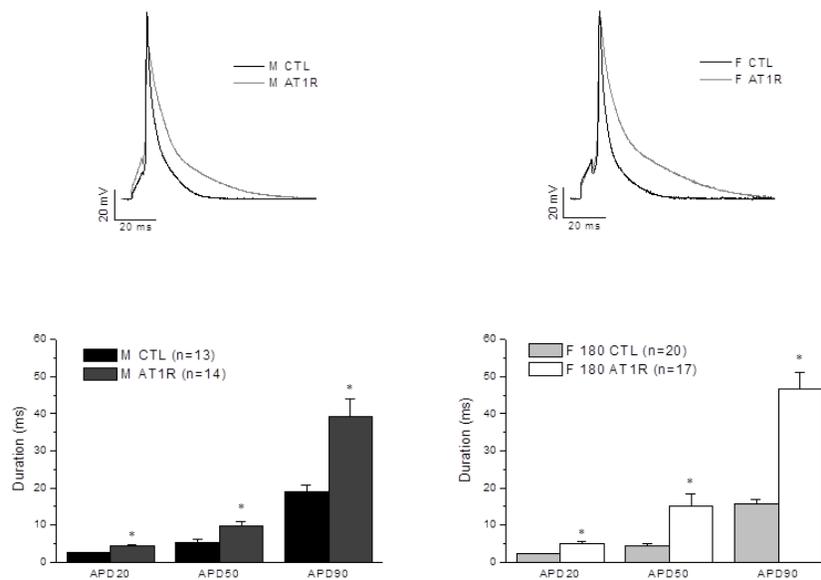


Figure II.2 Potentiel d'action chez les souris AT1R de 6 mois. *Haut-* Exemple représentatif de potentiel d'action ventriculaire chez les souris CTL et AT1R mâles (gauche) et femelles (droite). *Bas-* Les données moyennes de durée du potentiel d'action pour 20%, 50% et 90% de la repolarisation ont été présentées sur les graphiques. Les valeurs obtenues entre les mâles et les femelles sont similaires.