

Université de Montréal

**Contribution de la baisse de l'expression de la
connexine43 aux troubles de la conduction cardiaque**

par

Stéphanie Falcao

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître
en pharmacologie

Avril 2006

© Stéphanie Falcao, 2006

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



W

4

058

2006

V.086

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Ce mémoire intitulé :

**Contribution de la baisse de l'expression de la connexine43 aux troubles de la conduction
cardiaque**

présenté par :

Stéphanie Falcao

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre-André Lavoie, président-rapporteur

Dr René Cardinal, directeur de recherche

Dr Guy Rousseau, co-directeur

Dr Alain Vinet, membre du jury

Résumé

La propagation du courant électrique dans le cœur est possible grâce à l'activité des canaux sodiques et au passage d'ions d'un cardiomyocyte à l'autre via les jonctions Gap. Une altération de l'expression de la principale protéine de ces jonctions dans le cœur, la connexine-43 (Cx43), a été reliée à plusieurs maladies cardiaques chez l'homme, notamment l'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie dilatée. Ces dérangements ont aussi été associés aux arythmies dans certains modèles d'infarctus du myocarde. Le but de ce projet est de produire des altérations électriques dans un modèle animal et d'étudier le rôle du découplage cellulaire dans les troubles de la conduction cardiaque. Des chiens sont soumis à un entraînement ventriculaire rapide (240/min pour 5 semaines), ainsi qu'à une sténose progressive de l'artère coronaire circonflexe (LCx) par un constricteur améroïde. À l'étude finale, des troubles de conduction sont identifiés par cartographie électrophysiologique du territoire de la LCx. Des zones présentant des altérations électriques (LCx1) sont séparées de celles qui ont un patron d'activation normal (LCx2) et sont ensuite comparées au territoire de l'artère interventriculaire (LAD), qui ne subit pas la restriction de flot. Une chute significative de l'expression de la Cx43 est observée dans les deux régions LCx par rapport à la région LAD, alors qu'aucune augmentation de l'espace occupé par le collagène interstitiel n'a été observée. Le dv/dt_{max} du complexe d'activation des électrogrammes unipolaires enregistrés dans la région LCx1 étaient plus déprimés que ceux de la région LCx2 suite à un entraînement rapide, indiquant une plus grande dépression du canal sodique. La chute de l'expression de la Cx43 qui a été observée dans la région LCx pourrait induire un découplage cellulaire et ainsi contribuer aux troubles de la conduction identifiées dans ce territoire simultanément affecté par l'insuffisance cardiaque et la sténose coronarienne.

Mots-clés : Connexine43, découplage cellulaire, arythmies, insuffisance cardiaque

Abstract

Action potentials can propagate within the heart through gap junctions as sodium channels are activated. Disturbances in the expression of the main protein of these junctions in the heart, connexin43 (Cx43), is associated with a number of human heart diseases such as congestive heart failure and dilated cardiomyopathy. These disorders were correlated with reentrant arrhythmias in animal models of infarction. The aim of this study is to produce long term electrical alterations in a proper animal model and to assess the role of cellular uncoupling on conduction troubles. Dogs are subjected to chronic rapid pacing (240 beats/min) and to progressive obliteration of the left coronary circumflex artery (LCx) by an ameroid constriction. At the final study, electrical alterations are identified by electrophysiological mapping of the LCx territory. The zones showing conduction troubles (LCx1) are separated from those presenting normal conduction patterns (LCx2) and compared to samples coming from the left anterior descendant artery (LAD) territory, which is not affected by the blood flow restriction. A drop in the expression of Cx43 was observed in both LCx regions compared to LAD, while no difference in collagen content was noted when compared to healthy preparations. For unipolar electrograms of LCx1 region, dv/dt_{max} was significantly more decreased than in the LCx2 region under rapid pacing, suggesting stronger depression of sodium channels. The drop in the expression of Cx43 noted in the LCx region could induce cellular uncoupling and therefore promote electrical alterations that are observed in this territory challenged by a double energetic stress.

Keywords : Connexin43, cellular uncoupling, congestive heart failure, arrhythmias

Table des matières

Chapitre 1- La conduction cardiaque	1
1.1 - Physiologie	1
1.2 - Potentiel d'action	2
1.3 - Les jonctions Gap dans le cœur	6
1.4 - Électrocardiogramme.....	7
Chapitre 2-Les jonctions Gap et les connexines	8
2.1 - Structure et fonction.....	8
2.2 - Biogénèse des jonctions Gap	10
2.3 - Régulation des jonctions Gap	11
2.4 - Connexine 43	12
2.5 - Phosphorylation de la Cx43.....	13
2.6 - Gène de la Cx43.....	15
2.7 - Régulation de la transcription de la Cx43.....	16
2.8 - Régulation de la traduction de la Cx43.....	18
2.9 - Dégradation de la Cx43.....	19
Chapitre 3 - Insuffisance cardiaque	20
3.1 - Mécanismes généraux.....	20
3.2 - Modèle canin d'insuffisance cardiaque	21
Chapitre 4 -Troubles de la conduction et insuffisance cardiaque : rôle de la diminution de la connexin43	26
4.1 - Arythmies par réentrée.....	26
4.2 - Remodelage de la Cx43 en situation pathologique.....	27
Chapitre 5 - Hypothèse	29
Chapitre 6 – Approche méthodologique	31
Chapitre 7 – Article.....	333
7.1 - Abstract.....	34
7.2 - Introduction.....	35
7.3 - Methods	37
7.4 - Results.....	42

	vi
7.5 - Discussion.....	46
7.6 - Bibliography	49
7.7 - Legend.....	55
7.8 - Table and figure.....	58
Chapitre 8 - Discussion	64

Liste des tableaux

Chapitre 7 – Article

Tableau 1 – Electrophysiologic alterations in the LCx1 versus LCx2 areas (Chapitre 7.8)

Liste des figures

Chapitre 1 – La conduction cardiaque

Figure 1 – Système de conduction dans le cœur (Chapitre 1.1)

Figure 2 – Potentiel d'action cardiaque (Chapitre 1.2)

Figure 3 – Mouvement d'ions au potentiel d'équilibre dans un cardiomyocyte
(Chapitre 1.2)

Figure 4 – Mécanisme du relâchement du calcium par le réticulum sarcoplasmique suite à l'entrée de calcium dans la cellule. (Chapitre 1.2)

Figure 5 – Anisotropie du tissu cardiaque (Chapitre 1.3)

Figure 6 - Électrocardiogramme de surface (Chapitre 1.4)

Chapitre 2 – Les jonctions Gap et les connexines

Figure 7 – Structure d'une jonction Gap (Chapitre 2.1)

Figure 8 – Une connexine (Chapitre 2.1)

Figure 9 – Types de connexons et de jonctions Gap (Chapitre 2.1)

Figure 10 – Sites de phosphorylation de la Cx43 (Chapitre 2.4)

Figure 11 – Gène de la Cx43 (Chapitre 2.5)

Figure 12 – Région proximale au promoteur de la Cx43 (Chapitre 2.5)

Chapitre 4 – Troubles de la conduction et insuffisance cardiaque : rôle de la diminution de Cx43

Figure 13 – Circuit de réentrée (Chapitre 4.1)

Chapitre 7 – Article

Figure 1 – Representative isochronal activation map in the LAD territory

Figure 2 – Representative isochronal map illustrating the identification of areas of conduction disturbances (LCx1) and regular wave front progression (LCx2) in the LCx territory of CRP-AM preparations.

Figure 3 – Electrical alterations in the LCx territory.

Figure 4 – Alterations of Cx43 expression in the LCx territory of CRP-AM preparations.

Figure 5 – Conduction disturbances in the LCx2 area depends on combined reductions in Cx43 expression (ordinate) and $-dv/dt_{\max}$ (abscissa).

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : activator protein-1

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

CK1: casein kinase

Cx43: Connexin 43

CRP-AM: Chronic rapid pacing - Ameroid

C-terminal: carboxy-terminal

ECG: électrocardiogramme

EL: extracellular loop

eNOS: monoxide d'azote synthase endothélial

FGF: fibroblast growth factor

GMPc: guanosine monophosphate cyclique

IL: intracellular loop

iNOS: monoxyde d'azote synthase inductible

IRES: site d'entrée au ribosome

JNK: c-jun n-terminal kinase

K⁺ : potassium

kDa : kilodalton

KO: knock out

LAD: Left anterior descending artery

LCx: Left circumflex artery

MAPK : mitogen activated protein kinase

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PKG : protéine kinase G

PP1 et PP2: protéine phosphatase

Na⁺ : sodium

TM : transmembrane

TNF- α : Tumor necrosis factor α

NO: monoxyde d'azote

Nœud SA : nœud sinusal

Nœud AV : nœud auriculo-ventriculaire

N-terminal: amino terminal

TPA: tetradecanoylphorbolacetate

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling

*À ma famille, mes amis, et à tous ceux qui
m'ont appuyée...*

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, René Cardinal. Tout d'abord de m'avoir donné ma chance le jour où je suis arrivée dans son bureau, à la fin du mois d'août 2003, sans directeur de recherche, et seulement la volonté de travailler et d'apprendre. Et aussi pour tout ce que j'ai appris au cours de ces deux années, pour son aide et ses encouragements.

J'aimerais aussi dire merci à mon co-directeur, Guy Rousseau, pour sa disponibilité, sa patience, pour l'aide qu'il m'a apportée à chaque jour dans le laboratoire et aussi pour sa bonne humeur quotidienne qui a rendu chaque jour plus agréable, les bons comme les plus difficiles.

Merci aussi au personnel du laboratoire, surtout à Michel et à Caroline sans qui cette étude n'aurait pu être faite, pour leur aide et leur support.

Je souhaite aussi remercier mon collègue et ami Matthieu Boucher, qui m'a beaucoup appris sur le travail en laboratoire et qui m'a transmis son intérêt pour la recherche. Sa façon de tout remettre en question, une grande qualité dans un domaine comme celui dans lequel nous évoluons, a été d'une grande inspiration.

Je voudrais aussi remercier mes parents et ma sœur pour leurs encouragements, leur compréhension, pour avoir toujours cru en moi, et surtout pour leur amour inconditionnel, étant donné que le seul fait de me supporter au quotidien mériterait un diplôme en soi.

Et finalement merci à mes amis (es) qui ont rendu ces deux années de maîtrise plus faciles par leurs encouragements et par leur façon de me changer les idées quand j'en avais besoin...Alors Marie-Eve, Stéphanie, Philippe, Matthieu...Merci!

Chapitre 1- La conduction cardiaque

1.1 - Physiologie

Le système cardiovasculaire permet le transport de la plupart des éléments essentiels aux cellules des différents tissus et il est responsable de libérer ceux-ci des déchets métaboliques qu'ils produisent. Pour que ces événements soient possibles, le cœur doit pomper le sang le long des différents vaisseaux du système. La vitesse à laquelle il bat et la quantité de sang qu'il pompe sont des paramètres qui peuvent varier et qui sont régulés à plusieurs niveaux.

Le cœur est donc une pompe ultra-efficace qui est régulée par le système nerveux autonome et qui s'adapte aux variations physiologiques de toutes sortes. Le système parasympathique agit sur le cœur via le nerf vague dont la stimulation a un effet inhibiteur sur la fréquence cardiaque. La sécrétion d'acétylcholine, qui active les récepteurs muscariniques, a un effet ralentissant sur le nœud sinusal (SA) et nœud auriculo-ventriculaire (AV). L'activation du système sympathique suscite au contraire l'accélération du rythme cardiaque via la stimulation des récepteurs β -adrénergiques, par l'adrénaline et la noradrénaline.

Le système nerveux a donc un impact important sur la régulation de l'activité cardiaque. Cependant, le cœur n'a pas besoin du système nerveux pour être fonctionnel. En effet, il est connu, grâce entre autres aux transplantations, que même dénervé, le cœur bat et dispose d'une bonne capacité d'adaptation aux changements. Le cœur possède la propriété de générer ses propres battements grâce à son stimulateur naturel, le nœud sinusal. L'influx électrique se propage donc à partir du nœud SA au niveau de l'oreillette droite, vers le nœud AV et atteint par la suite le faisceau de His. Le courant suit ensuite les branches droites et gauches du faisceau en direction des fibres de Purkinje qui se ramifient au niveau de la surface des ventricules. Le septum interventriculaire et les muscles papillaires sont les premières régions des ventricules à être excitées. Les cellules à l'endocarde sont activées et l'influx s'étend ensuite vers l'épicarde.

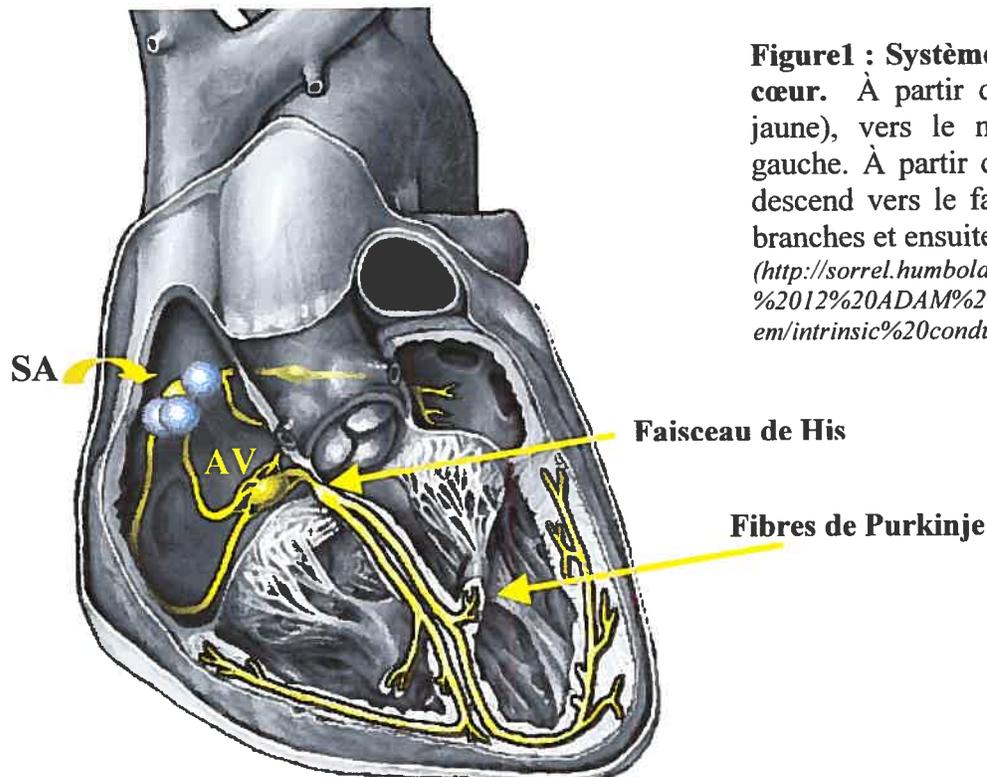


Figure1 : Système de conduction dans le cœur. À partir du nœud Sinusal (flèche jaune), vers le nœud AV et l'oreillette gauche. À partir du nœud AV, le courant descend vers le faisceau de His, ses deux branches et ensuite les fibres de Purkinje.

(<http://sorrel.humboldt.edu/~jlg21/Zoo%20310/Lab%2012%20ADAM%20cardiovasc/Intrinsic%20System/intrinsic%20conduction%20home.html>)

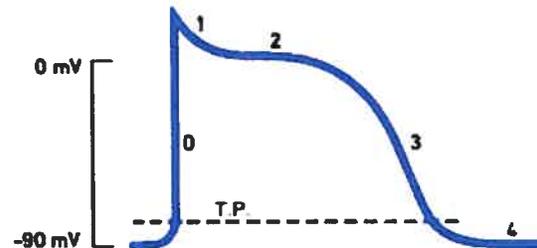
1.2 - Potentiel d'action

Certains tissus du corps humain sont excitables. C'est le cas des muscles lisses, des muscles squelettiques, des nerfs et du cœur. Les cellules qui les composent ont la propriété de pouvoir être dépolarisées et laisser passer un courant électrique. Dans le cœur, les cardiomyocytes ont un potentiel intracellulaire négatif de -90mV par rapport à celui de l'environnement extracellulaire. Lorsqu'ils sont excités par un stimulus électrique suffisant, leur membrane est rapidement dépolarisée. La relation entre le temps et le changement du potentiel membranaire de la cellule est représentée par le potentiel d'action.

Le potentiel d'action des cardiomyocytes peut être divisé en quatre phases qui correspondent à des variations de perméabilité des canaux ioniques transmembranaires. La phase zéro de la courbe correspond à la dépolarisation très rapide de la membrane du cardiomyocyte suivie d'une repolarisation partielle en phase un. Un plateau d'environ 0,1 à 0,2 seconde ainsi qu'une repolarisation de la cellule surviennent successivement lors des

phases 2 et 3. Finalement, la phase quatre correspond à l'intervalle de temps entre la fin de la repolarisation et le début du potentiel d'action suivant.

Figure 2- Potentiel d'action cardiaque. Variation du potentiel membranaire d'un cardiomyocyte en fonction du temps suite à un stimulus suffisant pour atteindre le potentiel seuil (T.P.) (sprojects.mmi.mcgill.ca/heart/980727fig2_1.html)

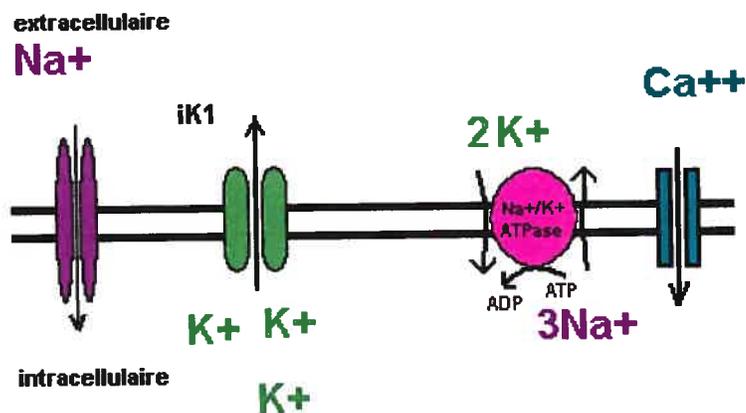


Plusieurs types de canaux spécifiques à chacun des ions impliqués dans le potentiel d'action cardiaque sont exprimés le long de la membrane des cardiomyocytes. Les courants de certains ions varient selon que la membrane leur est plus ou moins perméable. Le sodium (Na^+), le potassium (K^+) et le calcium (Ca^{++}) sont les trois principaux ions impliqués dans le potentiel d'action cardiaque. La perméabilité membranaire pour chaque ion varie continuellement et détermine la quantité nette de chacun d'entre eux qui diffusera de part et d'autre de la membrane en fonction de leur gradient chimique. Ces changements de perméabilité sont possibles grâce à l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques le long de la membrane.

Les cardiomyocytes ont une concentration intracellulaire en potassium plus élevée que leur environnement, tandis que les ions calcium et sodium sont plus concentrés dans le milieu extracellulaire. Même si un gradient de concentration existe, les ions calcium et sodium entrent très peu à l'intérieur des cellules au repos, car la membrane leur est peu perméable. Pendant la phase 4, le potassium a toutefois tendance à diffuser continuellement vers le milieu extracellulaire, par les canaux potassiques de type «inward rectifier» ce qui crée un déficit en ions positifs à l'intérieur de la cellule. Deux forces opposées sont donc impliquées dans le mouvement du potassium de part et d'autre de la membrane au repos. Le gradient de concentrations impose une force chimique qui dirige celui-ci vers l'extérieur de la cellule. À l'inverse, une force électrostatique, créée par le manque de cations à l'intérieur de la cellule, attire les ions potassium positifs vers le milieu

intracellulaire. C'est pourquoi le potentiel de repos (phase 4) correspond au potentiel d'équilibre du potassium.

Figure 3- Mouvement d'ions au potentiel d'équilibre dans un cardiomyocyte. La pompe Na⁺/K⁺-ATPase pompe le sodium vers l'extérieur de la cellule pour compenser pour la faible entrée de cet ion selon son gradient de concentration. Les ions K⁺ sortent de la cellule selon leur gradient de concentration. Le Ca⁺⁺ diffuse vers l'intérieur de la cellule.

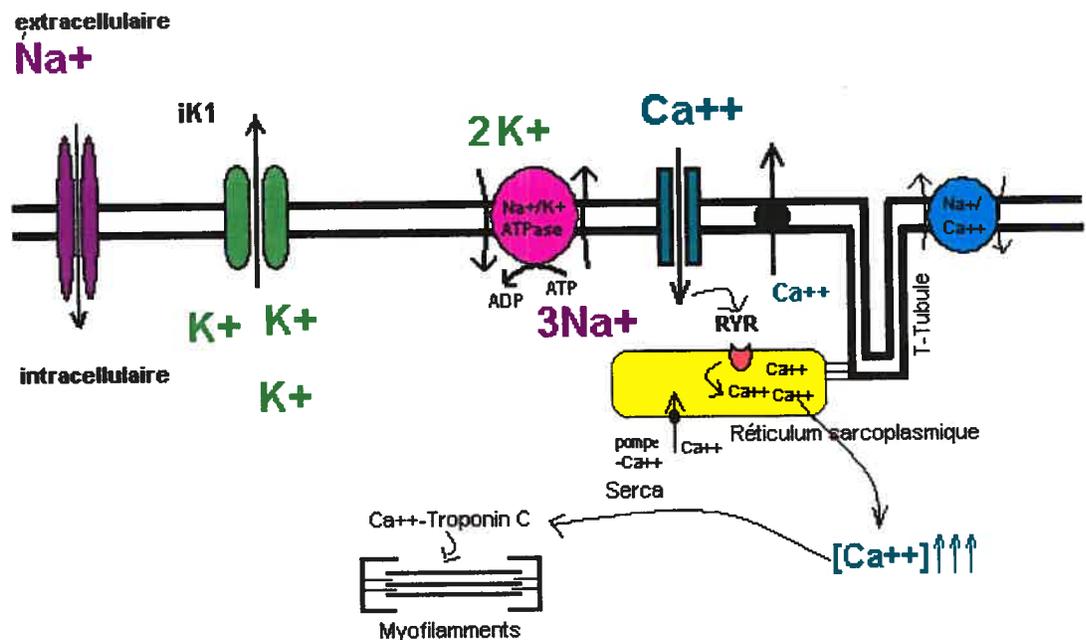


Dans le cas du sodium, les deux types de forces iraient dans le même sens et pousseraient le sodium vers l'intérieur de la cellule lors de la phase 4. Le canal est cependant fermé.

Lorsque la membrane est dépolarisée jusqu'à -60mv par l'arrivée d'un front d'onde, la phase 0 du potentiel d'action survient avec l'ouverture rapide des canaux sodiques sensibles au voltage, et donc, à une augmentation de la perméabilité membranaire au sodium. Comme pour toutes les cellules excitables, cette étape n'est possible que si l'influx qui arrive à la cellule est suffisant pour que le potentiel seuil soit atteint. Si tel est le cas, la membrane du cardiomyocyte sera dépolarisée. La repolarisation qui suit en phase 1 correspond à la diffusion du potassium vers l'extérieur de la cellule. Celle-ci est due à l'activation des canaux potassiques sensibles au voltage, qui génère *le courant transitoire sortant i_{to}* . L'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage est en partie responsable

de la phase 2 qui prend la forme d'un plateau. L'influx de charges positives (Ca^{++}) compense pour la sortie de potassium qui arrive en même temps via différents canaux potassiques. Il existe deux types de canaux calciques dont ceux qui sont le plus fortement exprimés dans le cœur : les canaux de type-L. Ils génèrent des courants d'une longue durée, contrairement aux canaux de type-T qui sont activés de façon plus transitoire mais qui sont peu exprimés au niveau du tissu cardiaque. L'entrée de calcium est une étape importante puisque qu'elle est aussi impliquée dans le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque. En effet, une fois entré dans la cellule, le Ca^{++} se lie aux récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique, activant ainsi la relâche de calcium dans le cytoplasme et favorisant la formation du complexe Ca^{++} -Troponine qui permet la contraction via les myofilaments. Le calcium est ensuite recapté dans le réticulum sarcoplasmique par une pompe Ca^{++} -ATPase de type serca. Cette augmentation temporaire de la concentration de calcium intracellulaire contrebalance la sortie des ions potassiums, et donne donc naissance à la phase plateau du potentiel d'action.

Figure 4 : Mécanisme du relâchement du calcium par le réticulum sarcoplasmique suite à l'entrée de calcium dans la cellule.



La dernière phase de repolarisation rapide est le résultat de trois courants sortant de potassium, soit i_{to} , i_{Kr} , i_{Ks} . Une fois la cellule complètement repolarisée, les concentrations

de sodium et de calcium sont respectivement rétablies par la pompe Na^+/K^+ -ATPase, et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. La pompe Na^+/K^+ -ATPase s'occupe donc d'expulser les ions sodium vers l'extérieur de la cellule, contre leur gradient de concentration. Trois ions Na^+ sortent de la cellule à chaque fois que deux ions K^+ y entrent. Ce processus est dépendant de l'énergie libérée par l'hydrolyse d'un ATP. Outre la sortie continue de potassium mentionnée plus haut, il n'y a pratiquement aucun échange d'ions entre le cardiomyocyte et son milieu pendant la phase 4. À la fin de la phase 0, les canaux sodiques sont inactivés, ce qui explique que jusqu'à la fin de la phase 3, la cellule ne peut pas être dépolarisée à nouveau (période réfractaire).

1.3 - Les jonctions Gap dans le cœur

Dans le cœur, les jonctions Gap sont principalement situées au niveau des disques intercalaires et permettent le passage des ions d'un cardiomyocyte à l'autre.

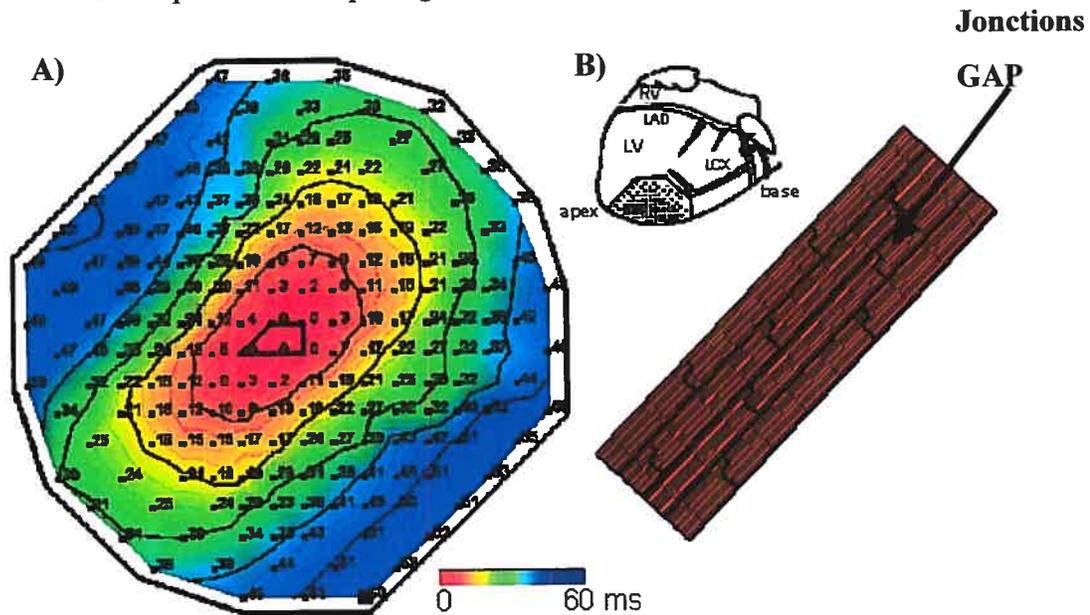


Figure 5- Anisotropie du tissu cardiaque. A) Carte isochrone obtenue avec une plaque d'électrodes constituée de 192 enregistrements placée sur un ventricule gauche de chien. Représentation du patron de propagation du courant électrique à partir d'une stimulation au centre de la plaque. La vitesse de conduction est représenté selon le code de couleur, les chiffres représentant le temps en (ms) à partir du centre (0). B) Sens des fibres cardiaques sous la plaque.

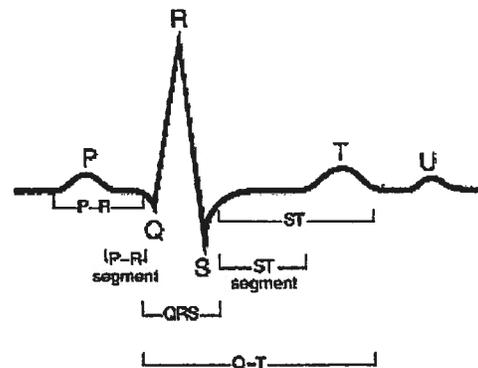
Étant donné que ces canaux sont principalement localisés aux embouts des cellules, la propagation du courant se fait plus rapidement dans le sens longitudinal des fibres que dans le sens transverse. Ce patron de distribution des jonctions Gap confère au tissu cardiaque sa propriété anisotropique. Ces jonctions ont donc un impact direct sur la vitesse de conduction dans le cœur. Le remodelage de celle-ci, la diminution de l'expression des connexines ainsi que des variations dans leur patron de distribution peuvent tous avoir des effets dramatiques sur la propagation de l'influx électrique dans le cœur.

1.4 - Électrocardiogramme

L'électrocardiogramme (ECG) permet d'étudier le comportement électrique du cœur. C'est une représentation graphique de la variation du potentiel électrique généré à la surface corporelle par l'activité cardiaque, telle que détectée entre deux électrodes placées à la surface de la peau. La configuration de l'électrocardiogramme varie selon l'endroit sur le corps où sont placées les électrodes (dérivation) et aussi selon les individus. Toutefois, un patron général est observé chez la plupart des mammifères. L'onde P, correspond à l'activation auriculaire, tandis que le complexe QRS représente l'activation des ventricules. L'intervalle ST est normalement isoélectrique puisque le myocarde ventriculaire est totalement dépolarisé. Il est à noter qu'en conditions normales, le segment ST suit la ligne isoélectrique (donc 0 mv). Une déviation du segment ST vers le haut (sus décalage) ou vers le bas (sous décalage) est souvent associée à des dommages de nature ischémique au niveau du myocarde (Holland 1977).

Figure 6- Électrocardiogramme de surface. Variation du potentiel électrique cardiaque en fonction du temps. Mesure prise à partir de deux électrodes placées à la surface de la peau.

(http://www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/fig_e_0004.jpg)

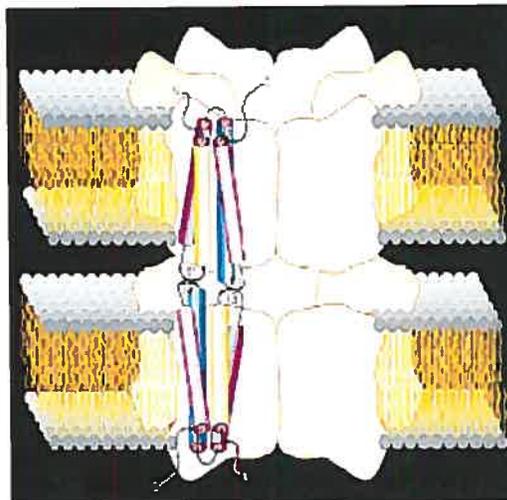


Chapitre 2-Les jonctions Gap et les connexines

2.1 - Structure et fonction

La contraction spontanée du muscle cardiaque est possible grâce à la propagation du courant électrique de cellule en cellule. L'influx est transmis le long des fibres musculaires suite au passage d'ions d'un cardiomyocyte à l'autre. Ce passage se fait via les jonctions Gap comportant des canaux qui relient directement les compartiments cytoplasmiques de deux cellules adjacentes et qui permettent le passage de petites molécules (<1kDa) d'une cellule à l'autre. Elles permettent l'échange intercellulaire de métabolites, de nucléotides, de seconds messagers et d'ions. Dans les tissus excitables, elles sont responsables de la propagation du potentiel d'action. Une jonction est constituée de connexines qui sont regroupées en deux connexons appartenant chacun à l'une des deux cellules reliées.

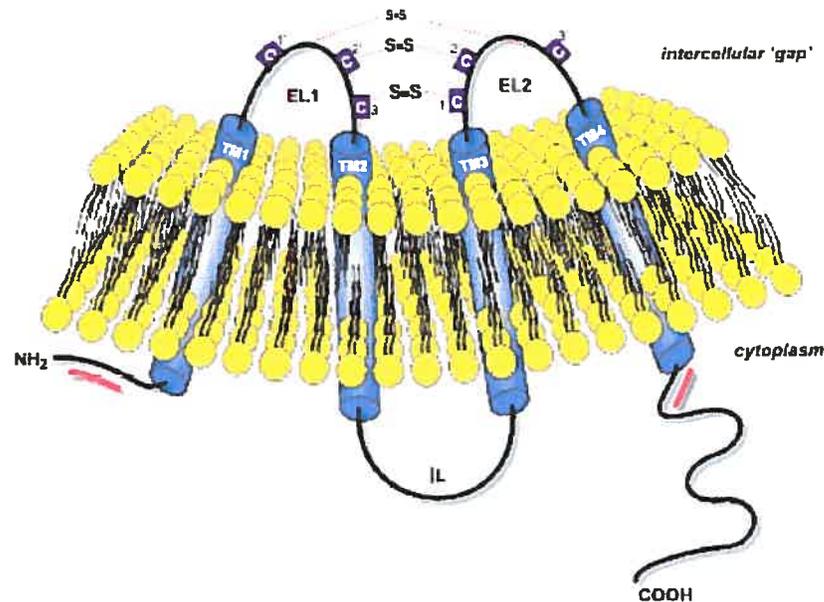
Figure 7- Structure d'une jonction GAP- Deux connexons appartenant chacun à une des deux cellules connectées. Chaque connexon est constitué de six connexines. Les connexines forment la jonction en se liant via leurs boucles extracellulaires. *(Kumar 1996)*



Les connexines sont des protéines formées de quatre hélices- α transmembranaires reliées par deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire. Les groupements

carboxy et N-terminal sont situés du côté intracellulaire de la membrane. La formation du canal est possible grâce à la liaison tête-à-tête des connexines appartenant à chaque connexon via leurs boucles extracellulaires.

Figure 8 – Une connexine avec ses deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2) et les ponts disulfures qui les reliaent, ses quatre domaines transmembranaires (TM1, TM2, TM3 et TM4), sa boucle intracellulaire (IL) . (Martin 2004)

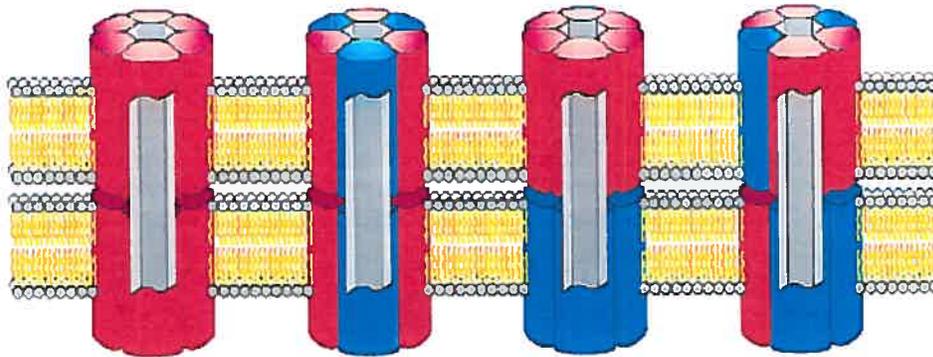


Chez les mammifères, vingt membres de la famille des connexines ont été répertoriés à ce jour et sont exprimés différemment selon les tissus et organes (Willecke 2002). Ils sont tous encodés par une famille de gènes très rapprochés et diffèrent très peu entre eux. Les différentes connexines se distinguent au niveau de la séquence en acides aminés des boucles intracellulaires et/ou de la longueur de leur queue carboxy-terminale. La séquence des boucles extracellulaires est ultra-conservée entre les différents isoformes. Chaque connexine est nommée par un chiffre qui correspond à son poids moléculaire.

Un connexon peut être hétéromérique ou homomérique selon que les six connexines qui le constituent sont différentes ou identiques. Une jonction Gap formée de deux connexons qui ont chacun la même composition en connexine sera homotypique, alors qu'elle sera considérée comme hétérotypique si ses connexons ne sont pas formés des

mêmes types de connexines. La perméabilité des jonctions aux différentes molécules est influencée par le type de connexines qui les forment.

Figure 9- Types de connexons et de jonctions Gap. (Kumar 1996)



Connexon Homomérique Hétéromérique Homomérique Hétéromérique

Canal Homotypique Homotypique Hétérotypique Hétérotypique

2.2 - Biogénèse des jonctions Gap

Les connexines sont majoritairement synthétisées par des ribosomes liés à la membrane plasmique (Martin 2004). Toutefois, les connexines 43 et 26 peuvent être intégrées à la membrane microsomale de manière post-traductionnelle (Ahmad 1999). La topologie transmembranaire des connexines est acquise dans le réticulum endoplasmique dans certains modèles *in vitro* (Ahmad 1999). Lorsqu'elles atteignent la membrane plasmique via la voie de sécrétion cellulaire, les connexines sont déjà oligomérisées en connexon (Musil 1993). Cependant, la localisation exacte de l'oligomérisation n'est pas bien caractérisée. Des études ont suggéré que cette étape de la biogénèse des jonctions Gap débiterait dans le réticulum endoplasmique et serait complétée dans l'appareil de Golgi. Il est fort probable que le moment de l'oligomérisation change en fonction du type cellulaire ou des connexines impliquées. En effet, certaines études suggèrent que la Cx43 s'oligomérisé dans le réseau trans-Golgi alors que d'autres suggèrent que la Cx26 et Cx32

s'assemblent au niveau du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les connexons sont donc formés avant d'atteindre la membrane (George 1999). Leur assemblage serait dépendant de la calmoduline, une protéine ubiquitaire qui est liée au calcium (Ahmad 2001). Il est connu que la calmoduline est impliquée dans plusieurs processus cellulaires via sa liaison à certaines protéines. Dans ce cas-ci, elle interagirait directement avec les connexines et permettrait leur assemblage en connexon.

2.3 - Régulation des jonctions Gap

Une fois le canal assemblé et les deux cellules adjacentes connectées, plusieurs mécanismes peuvent être activés afin de réguler la fonction des jonctions Gap. La quantité de canaux au niveau de la membrane, qui est intimement reliée à l'expression des connexines, a un effet marqué sur la conduction. Le renouvellement de certains types de connexines est très rapide. Dans le cœur, la Cx43 est renouvelée à toutes les heures et demie (Laird 1991). L'état de phosphorylation des connexines est un des éléments qui est impliqué dans leur synthèse et leur dégradation ainsi que dans la régulation de la fonction du canal (Laird 1991). Les connexines possèdent plusieurs sites de phosphorylation sur leur queue carboxy-terminale (Lampe 2000). Ces sites sont pour la plupart des résidus sérine, mais certaines thréonines et tyrosines ont maintenant été répertoriées comme étant des sites phosphorylables. Le site de phosphorylation ainsi que la kinase impliquée varient en fonction de la connexine, de l'espèce et du type cellulaire. Les principales kinases qui phosphorylent les différentes connexines sont la PKA, la PKC, la PKG et les MAPKs (Solan 2005). Les kinases et phosphatases qui interagissent avec les connexines ont un impact sur l'ouverture et la fermeture du canal ainsi que sur le diamètre du pore puisqu'elles induisent un changement conformationnel de la protéine. Ces propriétés influencent la perméabilité du canal, et par conséquent, la conductance entre les cellules. Il a été démontré que la phosphorylation de la Cx43 par les MAPKs et la PKC assurait la fermeture du canal (Goodenough 2003). De plus, dans le cas de la Cx43, il semble que sa phosphorylation permette l'agencement des connexons qui forment la jonction (Cooper 2002).

2.4 -Connexine 43

La connexine 43 (Cx43), clonée pour la première fois en 1987, est la seconde de la famille à avoir été caractérisée après la Cx32 (Beyer 1987). Elle est retrouvée dans presque tous les tissus, notamment au niveau de l'épithélium, du myomètre et de plusieurs muscles lisses (Beyer 1987). En plus d'être celle qui est la plus exprimée chez les mammifères (Beyer 1987), elle prédomine dans le cœur adulte (Fishman 1991). La Cx43 est exprimée au niveau des cardiomyocytes des oreillettes et surtout des ventricules. Elle fait partie intégrante du système de conduction cardiaque. Cette isoforme est composée de 382 acides aminés chez la souris, le rat et l'humain (Lampe 2000). La Cx43 n'est pas sélective pour un ion en particulier (Veenstra 1995). Elle possède plusieurs sites de phosphorylation dont le nombre diffère selon l'espèce étudiée (Lampe 2000). Lorsque l'expression de la Cx43 est mesurée par immunobuvardage, trois bandes rapprochées peuvent être détectées avec un anticorps monoclonal spécifique à cette protéine, soit à 41, 43 et 46 kDa (Hertzberg 2000). Les deux plus élevées correspondent aux états hautement et partiellement phosphorylés alors que la plus basse représente la forme non-phosphorylée. Les souris *Knock-out* (KO) pour la Cx43 meurent avant la naissance à cause d'une malformation cardiaque (Reaume 1995). Toutefois, il a été suggéré que l'obstruction de la chambre de chasse du ventricule droit qui était observée chez les embryons pouvait être attribué à l'absence de la Cx43 au niveau de la crête neurale, ce qui influencerait la morphogenèse du cœur (Sullivan 1998). Les hétérozygotes sont cependant viables et peuvent même se reproduire malgré une expression en ARNm de Cx43 de 50% inférieure à celle observée chez les souris normales. La morphologie du cœur semble normale, mais une diminution de 30 à 40% de la vitesse de conduction a été notée, ainsi qu'une prolongation de la durée du complexe QRS (Guerrero 1997). Afin d'étudier l'importance du rôle de la Cx43 au niveau du cœur, des souris mutantes seulement pour la Cx43 cardiaques ont été générées (Gutstein 2001a). Les souris sont viables, mais meurent subitement après quelques mois des suites de tachycardie et de fibrillation ventriculaire. Les taux de Cx43 sont moins élevés dans les cœurs de ces souris que dans ceux des contrôles et la vitesse de conduction est ralentie (Gutstein 2001b). Cependant, la morphologie, ainsi que les données histologiques et échocardiographiques ne

semblent pas différer des données correspondantes chez les souris normales (Gutstein 2001a).

2.5 - Phosphorylation de la Cx43

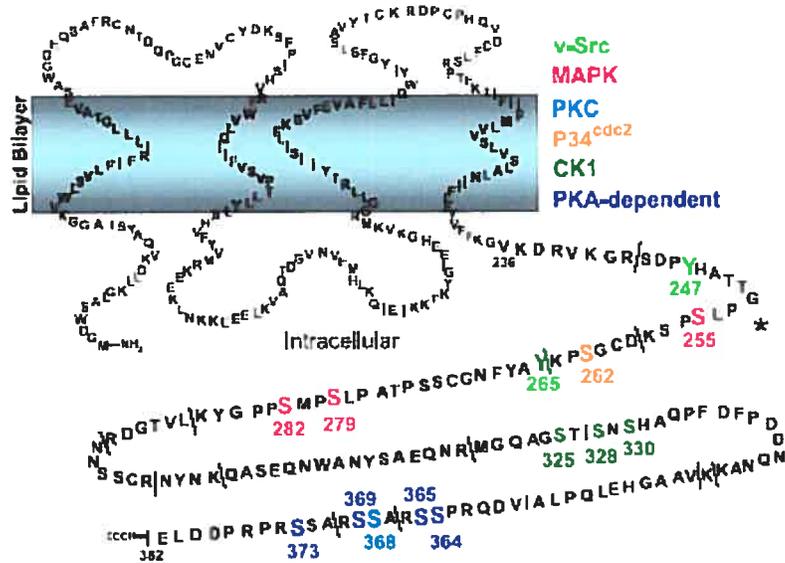
La Cx43 ne possède pas de résidu sérine sur ses boucles intracellulaires, ce qui suggère qu'elle est plutôt phosphorylée au niveau de sa queue C-terminale (Lampe 2000). Il a été démontré à ce jour que 12 des 21 sérines (Lampe 2000) de la queue terminale de la Cx43 pouvaient être phosphorylées ainsi que 2 de ses tyrosines (Lin 2001). La phosphorylation des connexines a un rôle à jouer dans la régulation de l'expression de celles-ci. Elle peut avoir lieu à différentes étapes du cycle cellulaire, que ce soit au niveau de la biogénèse des jonctions, pour réguler l'ouverture et la fermeture du canal à la membrane, ou bien pour influencer la dégradation de la protéine (Lampe 2000).

Bien qu'il ait été observé que la Cx43 pouvait être phosphorylée avant d'atteindre la membrane plasmique (Crow 1990), le rôle fonctionnel de cet événement est encore inexpliqué. La communication intercellulaire peut être augmentée ou inhibée suite à la phosphorylation des connexines par les différentes kinases. Une augmentation de la phosphorylation de la Cx43 médiée par la PKA a été observée suite à l'augmentation des concentrations d'AMPc dans différents modèles (Paulson 2000). Une hausse de l'assemblage des jonctions Gap, du transport de celles-ci à la membrane et de la communication intercellulaire y était observée. La phosphorylation de la Cx43 au niveau de la sérine 364 (S364) sera nécessaire pour la régulation de l'assemblage des jonctions Gap par l'augmentation de l'AMPc (Paulson 2000). Au contraire, la phosphorylation de la Cx43 par la PKC a pour effet de diminuer la communication via les jonctions Gap (Brisette 1991, Martinez 2002). C'est via la phosphorylation au niveau de la S368 que PKC régulerait la perméabilité du canal *in vivo* (Lampe 2000). De plus, il a été démontré que PKC pouvait aussi phosphoryler le résidu S372 *in vitro* (Lampe 2000). Dans le cœur humain, les isoformes PKC α et ϵ s'associent à la Cx43 des cardiomyocytes (Bowling 2001). Une étude a démontré que le FGF-2, qui diminue la perméabilité des jonctions Gap dans les cardiomyocytes, augmentait la colocalisation de PKC ϵ avec la Cx43 dans ces mêmes cellules (Doble 2000). L'inhibition de la kinase CK1 augmente la localisation de la

Cx43 à la membrane mais diminue la formation des jonctions Gap (Cooper 2002). La même étude a démontré que CK1 phosphoryle la Cx43 sur trois résidus, soit les sérines 325, 328, 330. Les deux tyrosines qui peuvent être phosphorylées sont Y247 et Y265 (Lin 2001). C'est la kinase v-Src qui a été démontrée comme étant celle qui les phosphoryle *in vivo*, causant ainsi la disruption des jonctions Gap (Lin 2001). Les MAPKs peuvent elles aussi phosphoryler la Cx43, et ce sur les sérines 255, 279, 282. L'augmentation de la phosphorylation de la Cx43 par la kinase cdc-2 au niveau de son résidu S255 diminuerait la communication intercellulaire via les jonctions Gap au cours de la mitose (Kanemitsu 1998).

Si les connexines peuvent être phosphorylées par des kinases, elles peuvent aussi être déphosphorylées par un certain nombre de phosphatases (Duthe 2001). Les phosphatases sont classées en deux grandes catégories, soit les protéines phosphatases de type-1 et de type-2 (PP1 et PP2). Les phosphatases de type-2 sont pour leur part subdivisées en trois catégories, A, B et C (Ingbritsen 1983). Récemment, il a été observé que l'expression de la PP2A était augmentée dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le lapin et que celle-ci colocalisait avec la Cx43, dont le taux de phosphorylation était diminué (Xun 2005). À la suite de l'inhibition de la phosphatase, une diminution de la Cx43 non-phosphorylée était rapportée ainsi qu'une augmentation de la communication intercellulaire. Il est donc intéressant de noter que tout comme les kinases, les phosphatases peuvent aussi avoir un effet sur la communication intercellulaire via les jonctions Gap.

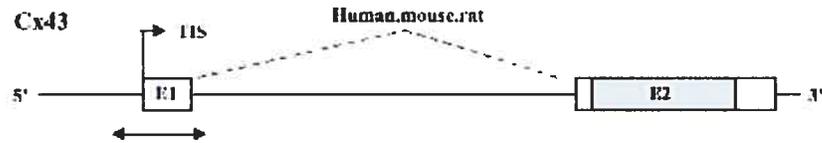
Figure 10 – Sites de phosphorylation de la Cx43 avec les kinases correspondantes à la phosphorylation de chaque acide aminé. (Lampe 2000)



2.6 - Gène de la Cx43

Chez l'humain, le gène de la Cx43 est localisé au niveau du chromosome 6. Chez la souris et le rat, on le retrouve sur les chromosomes 10 et 20 respectivement (Teunissen 2004), alors que chez le chien il est sur le chromosome 1 (Cruciani 2005). Il est constitué de deux exons séparés par un intron. L'exon 1 code pour la région en 5' qui n'est pas traduite. Le second exon est composé de toute la séquence codant pour la protéine ainsi que celle de la région non-traduite en 3'. Le site d'initiation de la transcription de la Cx43 se trouve au commencement de l'exon 1 et le transcrit est dérivé de la séquence des exons 1 et 2. La région proximale au promoteur est constituée d'environ 150 nucléotides surtout en amont, mais aussi en aval du site d'initiation de la transcription (De Leon 1994). Cette région est constituée de régions non-codantes conservées entre les gènes de la souris et de l'humain.

Figure 11- Gène de la Cx43. Les deux exons (E1 et E2) séparés par un intron, ainsi que le site d'initiation de la transcription. Structures conservées chez l'humain, la souris et le rat. (Teunissen 2004)



2.7 - Régulation de la transcription de la Cx43

Certains éléments activateurs et répresseurs de la transcription ont tout d'abord été rapportés chez la souris (Chen 1995). Un site de liaison à l'*API* (Activator Protein 1) est situé entre -44 et -36 sur le gène humain (De Leon 1994). Chez la souris, il est retrouvé dans la région activatrice du promoteur (Chen 1995) et les rats possèdent deux sites AP1 sur leur gène de Cx43 (Yu 1994). Il a été démontré chez l'humain que AP1 était nécessaire pour obtenir une activité optimale du promoteur (Echetebu 1999), et que chez le rat, ce site était déterminant pour l'activation de la transcription (Yu 1994). Les facteurs de transcription de la famille AP1 sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires. Il a été démontré que *c-jun*, un membre de cette famille, interagissait avec le site AP1 du gène de la Cx43. Dans les cellules de muscle lisse utérines humaines, l'activation de PKC par le TPA induit la transcription de la Cx43 ainsi que l'expression et l'activité de *c-jun* et *c-fos* (Geimonen 1996). L'activation de la *JNK* (c-jun N-terminal kinase), autant dans les cardiomyocytes que dans les cœurs de souris transgéniques, résulte en une diminution de la Cx43 et de son ARN (Petrich 2002).

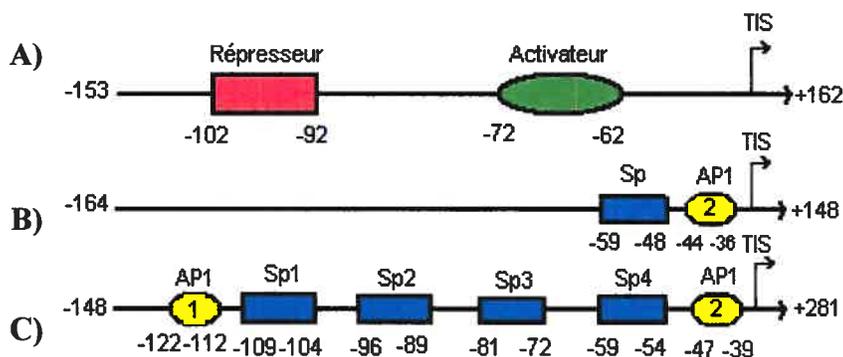


Figure 12- Région proximale au promoteur de la Cx43 chez A) la souris, B) l'humain, C) et le rat. Le site d'initiation de la transcription (TIS) correspond à l'acide aminé (+1). (Teunissen 2004)

Un autre élément activateur de la transcription du gène de la Cx43 est le site de liaison *Sp1* (Specificity protein 1) qui est conservé chez le rat (4 sites), l'humain (1 site) et chez la souris, qui possède une région homologue dans son site activateur. Les membres de cette famille de facteurs de transcription ont en commun de se lier à l'ADN via leur motif de doigt de zinc en C-Terminal. Ils ont aussi un domaine d'initiation de la transcription en N-Terminal (Courey 1989). La surexpression de Sp1 dans les cellules de muscles lisse du myomètre humain est nécessaire à l'obtention d'une activité optimale du promoteur (Echetebeu 1999). Chez le rat, Sp1 et Sp3 sont les facteurs de transcription qui activent le promoteur du gène de la Cx43 (Teunissen 2003).

Les facteurs de transcription mentionnés ci-haut sont exprimés de façon ubiquitaire. Il est donc fort probable que d'autres facteurs régulent la transcription du gène de la Cx43 en fonction du type cellulaire. Kasahara et coll. (2003) ont observé que la surexpression d'un mutant dominant négatif pour l'homoprotéine *Nkx2.5* dans les cœurs de souris induisait une réduction de l'expression de la Cx43 et de son ARNm. Plusieurs études ont d'ailleurs associé des mutations de *Nkx2.5* à des maladies cardiaques congénitales et à des troubles de conduction auriculo-ventriculaire (Jay 2004). Toutefois, une surexpression de *Nck2.5* dans les cœurs de souris et les cardiomyocytes néonataux de rats induit aussi une diminution de l'expression de la Cx43 (Teunissen 2003, Kasahara 2003, Akasawa 2003). Ces données suggèrent que *Nkx2.5* aurait des propriétés d'activateur et de répresseur par rapport au gène de la Cx43 dans le cœur (Teunissen 2004).

Une augmentation de l'expression de la Cx43 ainsi que de son ARN a été observée dans les cardiomyocytes à la suite de l'activation des voies de signalisation des Wnt et du dibutyryl-cAMP. Les *Wnt* sont une famille de glycoprotéines sécrétées et modifiées-lipidiquement. Elles peuvent activer différentes voies de signalisation via l'activation de récepteurs dits «Frizzled», et ainsi activer les facteurs de transcriptions *TCF/LEF* (Wang 2004). Le promoteur du gène de la Cx43 contient la séquence liant ces facteurs de transcription (Van der Heyden 1998).

Récemment, Pfeifer et coll. (2004) ont redéfini la structure du gène de la Cx43 de la souris en suggérant la présence de trois promoteurs alternatifs et de six différents exons qui

permettraient une régulation de l'expression de la Cx43 par épissage alternatif. Une telle structure pourrait permettre une régulation de l'expression de la protéine et/ou des ARNm en fonction du type cellulaire par exemple. Il sera intéressant de voir si ces observations peuvent être reproduites dans d'autres modèles animaux, ce qui redéfinirait la structure et la régulation du gène de la Cx43 comme on les connaît aujourd'hui.

En plus de la régulation de la transcription par AP1, Sp1, Nkx2.5 et les Wnt, plusieurs autres molécules ont été impliquées en tant que régulatrices de la transcription du gène de la Cx43. En effet, la prostaglandine E2, l'hormone parathyroïde, le 8Br-AMPC, les hormones thyroïde T3 et T4, le cofacteur Tbx2 ainsi que la voie de signalisation de Ras ont tous eu des effets sur la transcription du gène, mais dans des tissus différents du cœur (Teunissen 2004). Aussi, la méthylation de l'ADN dans la partie proximale au gène est associée à une absence de Cx43 dans les cellules hépatiques de rats (Piechocki 1999). Il n'est toutefois pas exclu que tous ces paramètres puissent avoir un impact sur l'expression de la Cx43 des cardiomyocytes.

2.8 - Régulation de la traduction de la Cx43

Une fois la transcription terminée, les ARNm sont traduits en protéines. La petite sous-unité du ribosome se lie à la coiffe en 5' de l'ARNm et la sous-unité 40S cherche le codon de départ (AUG). La sous-unité 60S peut alors se joindre au complexe et initier la traduction. Tout comme il a été vu plus haut pour la transcription du gène, la traduction est aussi une étape fortement régulée. Ce ne sont pas tous les ARNm, bien que transcrits, qui sont traduits dans tous les types cellulaires. Aussi, certaines séquences d'un ARNm peuvent ne pas être traduites, alors que d'autres, sur le même brin d'ARN le sont. L'expression de la Cx43 est donc aussi influencée par la régulation de la traduction de son ARN. Comme c'est le cas de la plupart des gènes, celui de la Cx43 contient des séquences non-traduites en 5'. Étant donné que dans ce cas-ci elles sont plutôt longues, ~ 200 nucléotides, il est probable qu'elles soient impliquées dans la régulation de la traduction. En effet, la sous-unité 40S peut avoir de la difficulté à trouver, ou même atteindre, le codon de départ sur une longue séquence qui possède une structure secondaire stable. Un site interne d'entrée au ribosome (IRES) a été trouvé dans la séquence non-codante en 5' de la

Cx43 (Schiavi 1999). Ce type de site permet une initiation de la traduction additionnelle qui est indépendante de la reconnaissance de la coiffe. En cas de stress, la traduction qui dépend de la reconnaissance de la coiffe est souvent inhibée. Les éléments IRES sont la plupart du temps présents sur les ARNm de protéines qui doivent continuer à être synthétisées même en cas de stress. La communication intercellulaire dans le cœur par exemple doit continuer à être assurée lorsque celui-ci est soumis à un stress, ce qui expliquerait la présence de sites IRES sur les ARNm de Cx43. Celle-ci peut ainsi être rapidement synthétisée en cas de besoin.

2.9 – Dégradation des jonctions Gap

Dans le cœur, la connexine43 a un taux de renouvellement d'environ une heure et demie. Il est important de connaître et comprendre les mécanismes à l'origine de sa dégradation puisque c'est un facteur principal de la régulation de son expression. Les deux voies de dégradation les plus empruntées dans la cellule sont celles du protéasome et du lysosome. De façon générale, le protéasome est la route de dégradation pour les protéines nucléaires et cytosoliques alors que la voie lysosomiale est utilisée pour dégrader le matériel ayant subi une endocytose, notamment les protéines membranaires (Berthoud 2004). Au cours de plusieurs études, l'utilisation d'inhibiteurs de ces deux voies a démontré une implication de chacune d'entre elles dans la dégradation de la Cx43 (Laing 1997). Le mécanisme exact de dégradation est toutefois encore inconnu. La phosphorylation (Berthoud 2004), la dégradation de certaines protéines du cytosquelette, ainsi que certains facteurs stressants, comme la chaleur (Laing 1998) et l'hypoxie (Berthoud 2004) ont tous été identifiés comme étant impliqués dans la régulation de la dégradation de la Cx43.

Chapitre 3 - Insuffisance cardiaque

3.1 – Mécanismes généraux

Les maladies cardiovasculaires font partie des principales causes de mortalité en Amérique du Nord et dans le monde. La recherche dans ce domaine est très active afin de trouver des thérapies potentielles pouvant améliorer la qualité de vie et la longévité des patients atteints. L'insuffisance cardiaque est la résultante de plusieurs désordres du système cardiovasculaire. C'est une condition qui s'installe progressivement à la suite d'une accumulation de perturbations. Elle est alors associée à des troubles tant au niveau cellulaire qu'au niveau des organes affectés (Moe 1999). Cette pathologie est caractérisée par une pression de remplissage élevée, une augmentation de la pression au niveau des capillaires pulmonaires, une réduction du débit cardiaque ainsi que par une élévation de la résistance artérielle périphérique (Moe 1999). L'activation de mécanismes adaptatifs au niveau du cœur afin de compenser pour l'hypoperfusion systémique est tout à fait appropriée lors des stades précoces de la maladie. Toutefois, lorsque ces mécanismes sont activés de façon chronique, ils contribuent à la progression de la pathologie. Certains troubles hémodynamiques mentionnés plus haut mènent à des troubles structuraux et fonctionnels au niveau du cœur, notamment à la mort des myocytes et à une altération de la matrice extracellulaire (Davies 1996). La dysfonction du myocarde crée alors un stress qui favorise la libération de cytokines proinflammatoires et de neurohormones (Packer 1995). Ces substances sont impliquées dans le remodelage du myocarde et elles augmentent le stress oxydatif (McMurray 1990), favorisant ainsi la mort cellulaire par nécrose et par apoptose (Narula 1996). La mort des cellules au niveau du myocarde, surtout des cardiomyocytes, augmente la dysfonction myocardique qui était à la base de cette cascade d'événements. Il est important de comprendre les phénomènes moléculaires sous-jacents à cette pathologie, afin de trouver des cibles thérapeutiques efficaces pour mettre fin à ce cercle vicieux.

3.2 - Modèle canin d'insuffisance cardiaque

L'utilisation d'un modèle animal d'insuffisance cardiaque est primordiale afin d'étudier *in vivo* les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie. À la suite des études faites au cours des quarante dernières années, il est aujourd'hui accepté que le modèle canin de cardiomyopathie induite par entraînement rapide reproduit fidèlement les symptômes observés chez l'humain. Le groupe de Whipple a été le premier à rapporter, en 1962, qu'un entraînement auriculaire rapide de 330 battements par minute induisait les signes et symptômes de l'insuffisance cardiaque chez le chien (Moe 1999). Depuis, l'entraînement rapide ne se fait pas toujours au niveau auriculaire, mais aussi à partir du ventricule droit (Moe 1999, Cardinal 2004), à une vitesse d'environ 250 battements par minutes pour une durée de 4 à 5 semaines (Cardinal 2004). Plusieurs autres modèles animaux ont été utilisés, notamment le porc, le mouton et le lapin (Moe 1999). La méthode d'entraînement rapide est idéale pour étudier l'insuffisance cardiaque pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elle a pour effet de reproduire chez l'animal la plupart des symptômes hémodynamiques et structuraux observés chez l'humain. La tachycardie soutenue produit chez les animaux une dysfonction biventriculaire systolique et diastolique (Damiano 1987), ainsi qu'une congestion pulmonaire et la cardiomyopathie dilatée. Tout comme la résistance vasculaire systémique, la pression de remplissage ventriculaire est très élevée, alors que le débit cardiaque est diminué. La paroi du ventricule gauche subit un stress élevé lors de la systole (Moe 1988, Howard 1988). De plus, les concentrations plasmatiques de peptide natriurétique auriculaire, de catécholamines, de rénine et d'aldostérone sont augmentées par rapport à la normale (Riegger 1982, Moe 1989). Le fait que l'instrumentation des animaux soit relativement peu invasive est un autre avantage d'utiliser cette méthode pour induire l'insuffisance cardiaque. En effet, dans la plupart des cas elle ne requiert pas de thoracotomie ou de péricardectomie (Moe 1999). La condition de l'animal évolue au cours des semaines, ce qui permet d'observer la progression de la maladie dans le temps, et il est possible de contrôler le pacing grâce aux pacemakers programmables (Moe 1999). Il est intéressant de noter que les études faites sur ce modèle ont démontré que la pathologie induite chez les animaux était complètement réversible à la suite de l'arrêt du pacemaker (Howard 1988, Moe 1988).

Les animaux qui subissent un entraînement ventriculaire ou auriculaire rapide présentent une variation de nombreux paramètres hémodynamiques comme mentionné précédemment. La cardiomyopathie dilatée qui résulte du pacing rapide est associée à une perte de contractilité du myocarde dans son ensemble, ainsi que des cardiomyocytes isolés (Spinale 1992, Laurent 2001). Il a aussi été démontré que la densité des récepteurs β -adrénergiques à la membrane des cardiomyocytes était diminuée, et que l'activité de l'adénylate cyclase médiée par ce type de récepteur était aussi hypothéquée (Calderone 1991, Laurent 2001). De plus, les récepteurs couplés à la protéine G (Gs) sont diminués alors que ceux couplés à la Gi sont augmentés, tout comme leur ARNm (Spinale 1994). Une élongation cellulaire, une perte des sarcomères, un remplacement des protéines contractiles par des protéines du cytosquelette, ainsi qu'un désalignement des myofibrilles sont toutes des caractéristiques qui ont été observées au niveau des cardiomyocytes de cœurs insuffisants (Kajstura 1995). Le volume du cœur est typiquement augmenté tout comme sa masse, mais une perte de myocytes est aussi notée (Kajstura 1995). Un remodelage de la matrice extracellulaire a aussi été observé (Kajstura 1995). La dilatation des chambres cardiaques est un phénomène observé dans la plupart des cas, mais n'est pas accompagnée d'hypertrophie et d'augmentation de la masse cardiaque (Howard 1988). Certaines études ont aussi noté une hypertrophie localisée au niveau des oreillettes seulement, qui était accompagnée d'une augmentation du contenu en collagène de celles-ci (Moe 1996). Le remodelage de la matrice extracellulaire est un phénomène controversé. En effet, dans le modèle canin de tachycardie chronique, certains ont observé une augmentation du contenu en collagène (Weber 1990) alors que d'autres n'ont noté aucun changement (Komamura 1992). Une activation des métalloprotéinases au niveau des oreillettes et des ventricules dans le modèle de pacing rapide pourrait contribuer au remodelage et à la dysfonction du ventricule gauche (Moe 1999).

La rétention de fluides est une autre caractéristique du modèle de tachycardie chronique. La congestion pulmonaire ainsi que l'œdème résulte de ce phénomène. Comme dans l'insuffisance cardiaque humaine, l'activité du système rénine-angiotensine est beaucoup plus élevée qu'en situation normale (Moe 1989). La rénine, l'aldostérone et l'angiotensine voient donc leur concentration augmenter. Il a aussi été remarqué que le taux

de filtration glomérulaire, le flot sanguin au niveau des reins ainsi que l'excrétion du sodium étaient tous diminués. Le peptide natriurétique ainsi que le NO sont augmentés à un stade précoce de l'évolution de la pathologie. Ils ont la capacité d'activer le GMPc, ce qui peut être considéré comme une réponse compensatoire afin de prévenir la rétention des fluides (Moe 1999). Toutefois, lorsque la maladie progresse, le taux de NO diminue tout comme l'excrétion du GMPc et du sodium (Moe 1999).

Comme dans plusieurs pathologies, des cytokines proinflammatoires sont relâchées en réponse au stress induit par le pacing rapide (Mann 1994). Une augmentation des taux plasmatiques de TNF- α dès le début du pacing rapide, ainsi qu'un maintien de cette élévation après trois semaines de tachycardie a été remarqué dans le modèle canin. Toutefois, peu de cellules inflammatoires ont été observées dans ce même modèle (Mann 1994), suggérant ainsi que l'activation du TNF- α dans le cœur n'était pas accompagnée d'une autre réponse immunitaire (Moe 1999). Une élévation des concentrations d'endothéline a aussi été rapportée. Il a été suggéré que cette augmentation du puissant vasoconstricteur était en partie due au fait que sa clairance pulmonaire était diminuée chez les chiens qui subissent la tachycardie chronique (Dupuis 1998). De plus, une augmentation des ARNm de préproendothéline-1 au niveau du ventricule gauche et des poumons pourrait être à l'origine de la dysfonction ventriculaire ainsi que de l'hypertension pulmonaire observées en insuffisance cardiaque (Huntington 1998). Le monoxyde d'azote (NO) est une autre molécule pour laquelle il a été démontré un impact au niveau de l'insuffisance cardiaque. Le NO diminuerait la réponse contractile à la stimulation adrénergique (Yamamoto 1997), alors que l'augmentation de l'activité de la iNOS (inductible NO-synthase) médierait les effets délétères des cytokines (Finkel 1992). Une augmentation du taux de NOS endothéliale (eNOS) est observée seulement au niveau de l'oreillette droite et non au niveau des ventricules (Khadour 1998). Il a été proposé que cette augmentation régionale du NO pourrait, via la diminution de la réponse β -adrénergique et la préservation du flot sanguin, être une réponse adaptative protectrice contre l'hypertrophie auriculaire (Moe 1999).

La mort des myocytes ventriculaires par apoptose a été rapportée dans le modèle animal d'insuffisance cardiaque qui nous intéresse (Liu 1995). L'apoptose, connue comme

étant une mort cellulaire programmée, est caractérisée entre autres par la fragmentation de l'ADN et l'activation et l'inhibition de protéines pro- et anti-apoptotiques. Elle est considérée comme une mort propre puisque les membranes ne sont pas rompues et par conséquent, le contenu du cytoplasme n'est pas déversé dans le milieu extracellulaire, de plus elle ne suscite pas de réponse inflammatoire. Contrairement à la nécrose, qui est plus désordonnée et beaucoup moins régulée, l'apoptose requiert de l'énergie. L'apoptose dans le modèle animal de pacing rapide a été confirmé par essai TUNEL, coloration de l'ADN fragmenté et par l'augmentation du ratio Bax/Bcl-2, qui sont respectivement des protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Leri 1998).

Le but d'utiliser un tel modèle en recherche est d'élucider les mécanismes qui causent cette pathologie afin de trouver des cibles thérapeutiques potentielles. Il est donc primordial d'essayer de comprendre pourquoi la tachycardie chronique induit chez les animaux la défaillance cardiaque.

En situation normale, le cœur du chien conscient bat à 100 battements/minute. La demande métabolique est beaucoup plus élevée si on le fait battre à 240 battements/minute pour une période de 4 à 5 semaines. Si l'apport en énergie n'augmente pas proportionnellement avec la demande, la situation devient pathologique. Il a donc été suggéré par plusieurs études que la déplétion en énergie du myocarde pouvait être à l'origine des troubles observés chez les animaux ayant subi un entraînement rapide. Plusieurs désordres métaboliques ont été rapportés dans les modèles de cardiomyopathie induite par entraînement rapide. Par exemple, des troubles structuraux et fonctionnels des mitochondries ont été observés dans ces modèles, ainsi qu'une diminution de la réserve de créatine phosphorylée et non-phosphorylée et d'ATP, et par conséquent de la réserve d'énergie. L'activité des enzymes oxydatives du cycle de Krebs est augmentée (O'Brien 1990).

Les troubles métaboliques observés subséquemment à la tachycardie induite ne sont cependant pas les seules altérations pouvant être à l'origine de la cardiomyopathie. Une implication des voies de régulation du calcium a aussi été suggérée. Il a été démontré que la régulation intracellulaire du calcium est affectée chez les chiens en insuffisance cardiaque

(Perreault 1992). Une diminution du transport du calcium par les pompes Ca^{++} -ATPase du réticulum sarcoplasmique et des myofibrilles a été notée (O'Brien 1990) et la concentration intracellulaire anormale du calcium a été reliée aux troubles de contractilité observée chez ces chiens (Perreault 1992). La régulation négative du cycle du calcium serait caractérisée par une altération plus importante des canaux calciques que de la pompe Ca^{++} -ATPase (O'Brien 1995). Certaines études démontrent que les cardiomyocytes des chiens en insuffisance cardiaque ont une sensibilité au calcium qui est réduite (Perreault 1992) et d'autres qu'elle est augmentée (Wolff 1995). Certains prétendent donc que la dysfonction systolique qui résulte de la tachycardie chronique peut être due à la diminution de la sensibilité au calcium, alors que les autres l'attribuent aux troubles du couplage excitation-contraction.

L'ischémie myocardique est aussi considérée comme étant un mécanisme qui pourrait provoquer la défaillance cardiaque dans le modèle d'entraînement rapide. Il a été démontré que la tachycardie chronique cause un remodelage au niveau des capillaires du myocarde. Ce remodelage est associé à une réduction du flot sanguin, à une dysfonction du ventricule gauche et à des lésions au niveau des myocytes (Spinale 1992). De plus, conséquemment à l'élévation de la pression diastolique du ventricule gauche, une baisse du flot sanguin à l'endocarde a été observée ainsi qu'une diminution de la réserve en vasodilatateurs endogènes (Shannon 1993). Ces paramètres peuvent donc créer une ischémie myocardique et éventuellement mener aux dysfonctions cardiaques notées dans le modèle animal qui nous intéresse.

Le modèle animal d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie chronique est donc le meilleur modèle *in vivo* connu à ce jour pour étudier la pathologie. Évidemment, comme tous les modèles, celui-ci n'est pas parfait. Toutefois, il est clair que tous les avantages que comporte ce modèle surpassent ses limitations.

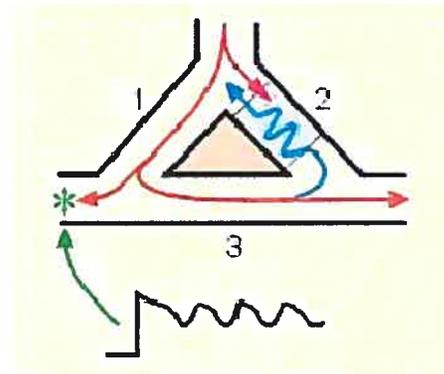
Chapitre 4 -Troubles de la conduction et insuffisance cardiaque : rôle de la diminution de la connexine43

4.1 – Arythmies par réentrée

Les arythmies ventriculaires sont habituellement la cause directe de la mort subite chez les patients souffrant de maladies coronariennes, notamment d'insuffisance cardiaque. Dans la plupart des cas, une altération du rythme cardiaque survient lorsqu'un circuit de réentrée prend naissance dans le tissu, ce qui peut mener à la tachycardie et à la fibrillation. Les arythmies par réentrée se produisent lorsque la même région est excitée répétitivement par le même influx électrique qui «tourne en rond». Trois conditions sont nécessaires afin que cet événement puisse avoir lieu. Il faut premièrement que le tissu se divise en deux branches distinctes le long desquelles va se séparer le courant. Cette séparation a lieu dans le cas où l'influx doit se propager de chaque côté d'un obstacle dont la nature peut être diverse. Une zone nécrosée à la suite d'un infarctus, une région où la conduction est ralentie, la présence de tissu cicatriciel sont tous des phénomènes pouvant être à l'origine de l'obstacle. Il faut aussi que dans l'une des deux branches, il y ait un bloc de conduction unidirectionnel. Dans cette zone, le courant ne peut se propager que dans un seul sens. L'influx est donc bloqué et c'est l'impulsion qui est passée dans la première branche qui va pouvoir venir exciter cette région lorsqu'il aura contourné le premier obstacle. Ce type de bloc unidirectionnel peut être causé entre autres par une zone réfractaire ou une zone où les cellules sont découplées. La troisième et dernière condition implique que le temps nécessaire à l'influx pour faire le tour de l'obstacle soit plus long que la période réfractaire des premières cellules excitées. Celles-ci sont alors prêtes à être dépolarisées à nouveau. Le courant se propage autour de l'obstacle en faisant une boucle, créant ainsi un circuit de réentrée.

Figure 13- Circuit de réentrée. Le courant se sépare entre la fibre 1 et 2 qui sont séparées par un obstacle. Après avoir passé dans la fibre trois, le courant passe dans le bloc unidirectionnel de la fibre 2, et peut aller réexciter le tissu à la base de la fibre 2 si la période réfractaire des cellules qui le constituent est terminée.

(<http://www.cvphysiology.com/Arrhythmias/A008c.htm>)



Des études réalisées dans des modèles de myocarde pathologique ont démontré que le découplage entre deux faisceaux de fibres myocardiques peut produire une dissociation en deux, remplaçant l'obstacle illustré à la figure 12. L'un des objectifs de nos travaux sera d'étudier la relation entre un tel découplage et une chute de l'expression de la Cx43.

4.2 - Remodelage de la Cx43 en situation pathologique

Il a été rapporté que des altérations dans le patron d'expression de la Cx43 étaient associées à plusieurs maladies cardiaques (Jongsma 2000). Chez l'humain, une désorganisation des jonctions Gap a été observée en bordure d'une zone qui avait subi un infarctus (Smith 1991). La détection des connexines ne se faisait plus principalement au niveau des disques intercalaires, mais plutôt sur les membranes latérales des cardiomyocytes. Toutefois la densité totale des jonctions n'avait pas varié. Il a aussi été démontré que l'expression totale de la Cx43 était diminuée de 40% dans les ventricules gauches de cœurs soit hypertrophiés ou ischémiques lorsqu'ils étaient comparés à des

cœurs sains (Peters 1993). Toujours chez l'humain, une diminution de la densité des jonctions Gap au niveau des disques intercalaires a été notée dans le myocarde hibernant ainsi que dans les cœurs ischémiques (Kaprielian 1998). Une relocalisation des jonctions en bordure latérale des cardiomyocytes plutôt qu'aux embouts a aussi été rapportée dans des cœurs humains souffrant de cardiomyopathie hypertrophique (Sepp 1996), alors qu'une diminution de l'expression de la Cx43 a été observée en insuffisance cardiaque (Dupont 2001, Kostin 2003), et chez des patients souffrant de cardiomyopathie dilatée (Kitamura 2002). Le remodelage de la Cx43 a aussi été remarqué dans les modèles animaux d'insuffisance cardiaque. Une diminution de son expression a été rapportée chez le cobaye (Wang 1999), une désorganisation ainsi qu'une diminution de la vitesse de conduction a été notée chez le rat (Uzzaman 2000), et finalement, une désorganisation des jonctions a été rapportée en bordure d'infarctus chez le chien (Peters 1997).

L'influx électrique nécessaire à la contraction du muscle cardiaque se propage dans le cœur grâce au passage d'ions d'un cardiomyocyte à l'autre, et ce, via les jonctions Gap. Il est donc probable qu'une désorganisation dans leur patron de distribution, ou une diminution de leur expression à la membrane plasmique aura un impact sur la vitesse de propagation du courant. Ces altérations au niveau des jonctions Gap peuvent être à l'origine d'un découplage cellulaire et ainsi créer des blocs de conduction ou simplement un ralentissement de la vitesse à laquelle l'influx se propage, favorisant ainsi les arythmies par réentrée.

Chapitre 5 - Hypothèse

Dans un modèle canin d'infarctus du myocarde, Peters et coll. ont démontré en 1997 qu'il y avait remodelage des connexines en bordure de la zone qui était nécrosée. Ils ont observé une latéralisation de la Cx43, c'est-à-dire qu'elle n'était plus majoritairement située au niveau des disques intercalaires, mais plutôt sur les membranes latérales des cardiomyocytes. Cette modification de la distribution de la Cx43 correspondait de façon spatiale avec un circuit de réentrée, suggérant ainsi que le remodelage de celle-ci pouvait augmenter la susceptibilité du tissu aux tachycardies ventriculaires.

Notre laboratoire a mis au point un modèle animal qui permettait de générer des tachycardies ventriculaires par réentrée dans un cœur qui n'avait subi aucun infarctus et qui ne présente pas de cicatrice (Cardinal 2004). Les chiens sont soumis à un entraînement ventriculaire rapide de 240 battements/min pour 4 à 5 semaines ainsi qu'à une sténose progressive de l'artère coronaire circonflexe (LCx) par un constricteur améroïde. Tel que discuté précédemment, l'entraînement à partir du ventricule droit produit une insuffisance cardiaque chez les animaux. En limitant l'apport sanguin, l'obstruction graduelle de la LCx crée un stress énergétique supplémentaire sur son territoire. Toutefois, l'oblitération de l'artère étant progressive, une circulation collatérale se développe, empêchant ainsi les cellules de la région de mourir par nécrose. Des altérations électriques qui contribuent à la génération d'arythmies ont été observées par cartographie épicaudique. L'étude avait été faite sur trois groupes différents de chiens. Afin de bien évaluer l'impact de chacun des deux stress, l'étude avait été réalisée sur des animaux qui ne portaient seulement que le constricteur améroïde (AM), ou bien qui ne supportaient que l'entraînement ventriculaire rapide (CRP), et finalement dans le cas du troisième groupe, qui subissaient les deux stress (CRP-AM). Il avait été remarqué que les troubles de conduction et les régions d'inexcitabilité étaient propres aux préparations CRP-AM, suggérant que de telles altérations émergeaient suite à un effet additif des deux stress.

Des modifications de l'espace interstitiel ont été associées à la cardiomyopathie dilatée (Weber 1990). De telles modifications peuvent être à l'origine d'un découplage cellulaire et ainsi favoriser les troubles de conduction cardiaque.

Une altération de l'entrée du sodium dans la cellule peut aussi être à l'origine de problèmes au niveau de la propagation de l'influx dans le coeur. En effet, il a été démontré qu'en bordure de zone d'infarctus, le courant sodique était altéré à l'épicarde (Pu 1997) et correspondait avec des troubles d'origine électrique.

Notre objectif est maintenant d'analyser les régions desquelles découlent des troubles de conduction. Les échantillons provenant de ces zones d'intérêt seront analysés afin de vérifier si un découplage cellulaire pourrait être à l'origine des altérations électriques observées lors de l'étude électrophysiologique. La mesure de l'expression de la Cx43 ainsi que des modifications de l'espace interstitiel permettra de mieux connaître les mécanismes à l'origine des arythmies ventriculaires. Cette compréhension pourra éventuellement mener à la découverte de cibles pharmacologiques afin de remédier à ces troubles du rythme cardiaque qui sont souvent la cause de mort subite chez les patients coronariens.

Chapitre 6 – Approche méthodologique

Le modèle canin d'entraînement ventriculaire rapide associé à une sténose coronarienne (CRP-AM) qui a été présenté ci-haut est utilisé au cours de cette étude. Lors de l'étude finale, nous procédons à une angiographie afin d'évaluer le degré d'occlusion de l'artère coronaire circonflexe par le constricteur améroïde, ainsi qu'à la mesure des paramètres hémodynamiques de l'animal. Ces paramètres sont alors comparés à ceux obtenus avant l'instrumentation.

Une plaque électrode contenant 191 enregistrements est positionnée sur la région de la LAD suite à la thoracotomie afin d'obtenir les enregistrements électrophysiologiques de la région. Une autre plaque est aussi placée sur le territoire de la LCx afin de recueillir les données électrophysiologiques de cette région.

Les électrogrammes unipolaires obtenues précédemment sont ensuite analysés avec le logiciel Cardiomap III, permettant d'obtenir le dv/dt_{max} , le potentiel du segment ST ainsi que les vitesses d'activation pour chaque électrode de la plaque. Des cartes isochrones de chaque région permettent d'identifier les zones de ralentissement des vitesses de conduction et/ou les régions inexcitables. Les vitesses de conduction, les valeurs de potentiel du segment ST ainsi que les valeurs de $-dv/dt_{max}$ dans le territoire de la LAD sont calculées en moyenne sur la totalité des enregistrements de la plaque, puisque les cartes obtenues suite à l'analyse de ce territoire sont plutôt uniformes.

Pour le territoire de la LCx, une région présentant un ralentissement de la vitesse de conduction sous la plaque est choisie et nommée LCx1 et une autre région ne présentant aucun trouble de conduction est identifiée comme étant LCx2. Ces deux régions sont ensuite comparées sur le plan des vitesses de conduction, du potentiel du segment ST et des dv/dt_{max} .

Les deux régions d'intérêts sous la plaque LCx, ainsi qu'une région au hasard sous la plaque LAD (épicares et endocares sont séparés) sont prélevées pour analyses biochimiques.

L'expression de la Cx43 est mesurée par Western Blot. Toutes les régions d'une même préparation sont chargées sur un même gel avec les échantillons des mêmes régions d'un chien témoin qui est utilisé comme standard interne de chaque gel. L'expression de la protéine sera exprimée en pourcentage de son expression dans la même région chez le chien témoin.

Le chien témoin est un chien dont le cœur est immédiatement prélevé après son anesthésie, et duquel les régions d'intérêts ont été recueillies de la même façon que sur les préparations pathologiques.

Les autres échantillons des mêmes régions sont utilisés pour mesurer les modifications de l'espace interstitiel. Des coupes de tissus sont préparées et colorées au rouge de Picrosirius et analysées sous une lumière polarisée. L'espace occupé par le collagène est calculé avec un logiciel qui l'exprime en pourcentage de l'aire photographiée.

Chapitre 7 – Article

Regional reduction in excitability and connexin 43 expression in areas of conduction disturbance in canine ventricles with chronic rapid pacing and ameroid constrictor

Stéphanie Falcao, Guy Rousseau, Michel Vermeulen, Caroline Bouchard,

Douglas L. Jones, René Cardinal

From the Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal and Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada (SF, RC, GR, MV, CB), Department of Physiology, University of Western Ontario, London, Ontario (DLJ).

Running title : Alterations in connexin43 and electrical properties

Address for reprint requests and other correspondence : René Cardinal, Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 Gouin Blvd. West, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5, (E-mail: XXXXXXXXXX)
Telephone: (514) 338-2222 ext. 3180

Fax: (514) 338-2694

7.1 - Abstract

Alterations in the cellular distribution of connexin43 (Cx43) and in myocardial architecture may contribute to reentrant activity generated in muscle fibers surviving next to scar tissue in chronic myocardial infarction. A similar possibility was investigated in canine preparations of energetic stress but without necrotic scar. Canines were subjected to chronic rapid pacing (CRP) at 240 beats/min for 4 weeks and progressive obliteration of the left coronary circumflex artery (LCx) by an ameroid constrictor. Electrophysiologic alterations identified from 191 unipolar recordings included activation delay, ST segment potential elevation and reduced maximum negative slope ($-dV/dt_{\max}$) in the activation complex of unipolar electrograms. The LCx was divided into areas displaying depressed conduction (LCx1: 0.06 ± 0.04 m/s, mean \pm SD) and milder depression (LCx2: 0.28 ± 0.01 m/s). Cx43 levels measured by Western blot analysis with reference to tissues from healthy canines indicated that Cx43 expression in LCx1 and LCx2 were significantly lower than in the territory of the left anterior descending coronary artery but without significant difference between LCx1 and LCx2. However, $-dV/dt_{\max}$ was significantly depressed (4.4 ± 3.4 mV/ms) and ST segment potential was significantly elevated (23.3 ± 14.6 mV) in LCx1 in comparison with LCx2 (9.6 ± 3.6 mV/ms and 0.3 ± 1.4 mV, respectively). Interstitial collagen surface fractions similar to values derived from healthy hearts were measured in all regions. The data indicate that conduction disturbances occurring in myocardium subjected to energetic stress but without scar are associated with reduced Cx43 expression in conjunction with depressed excitability.

Key Words: Cardiac conduction, connexin 43, excitability

7.2 - Introduction

Impulse conduction in ventricular muscle requires sodium channel opening and intercellular current flow via gap junctions (17). Among the ~20 members of the connexin protein family known to date (10), connexin 43 (Cx43) is the main component of ventricular gap junctions (6). Slowing of cardiac conduction has been identified in murine models with genetically altered expression of cardiac Cx43 (5, 9, 34, 37).

Alterations in Cx43 expression have been reported in congestive heart failure and several human heart diseases (8,16,19,20,27,30,31). In addition to remodelling of the expression and cellular distribution of gap junctions (29), other possible contributors to slow conduction include depression of active membrane properties, modification of cardiomyocyte size, tissue architecture and interstitial fibrosis (15,25,32). In muscle surviving next to the infarct scar in canine myocardial infarction, spatial correlations were identified between, on the one hand, reentrant pathway localizations and, on the other hand, alterations in gap junctional Cx43 distribution and tissue architecture (26). In this model, muscle fiber strands survive sparsely in thin tissue layers, interdigitating with necrotic tissue.

We have recently reported a canine preparation of combined chronic rapid pacing and reduction of blood flow reserve by an ameroid constrictor implanted around the left circumflex coronary artery (LCx) in which electrical alterations occur and reentrant arrhythmias can arise from failing myocardium without scarring (3). In the present study, epicardial mapping was used to identify areas of conduction disturbances in the LCx territory of such preparations and to analyse Cx43 expression in these areas with the expectation that it would be decreased in comparison with other areas in which more

regular conduction patterns are identified. In addition, local depression of excitability was estimated from reductions in the magnitude of the maximum negative slope of unipolar electrograms ($-dV/dt_{\max}$) (12), susceptibility to ischemia was assessed from local ST segment potential elevation (13), and the extracellular space area was identified by microscopic imaging and Picrosirius Red staining (39).

7.3 - Methods

Canine preparations. The experiments were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Pacemaker implantation was performed under aseptic conditions and anesthesia (25 mg/kg iv thiopental, maintained by 1% isoflurane) in 17 canines of either sex weighing from 26 to 37 kg. The pacing electrode was placed at the apex of the right ventricle (RV) and the pacemaker was set in a subcutaneous pocket (22). The pacemaker was activated at 240 beats/min 2 days after implantation. Fifteen days after the pacemaker implantation, the animals were reanesthetised. The ring was positioned on the LCx artery via a limited left thoracotomy (3). Postoperative care was administered and canines were carefully monitored to detect any sign of pain. None of the CRP-AM dogs showed any signs of pain.

Electrophysiologic study. The terminal study was scheduled 16 days after the ameroid constrictor implantation. Animals were anesthetised with 50 mg of meperidine and 8 mg/kg of thiopental, and anaesthesia was maintained with 1% isoflurane. Pulmonary capillary wedge pressure and cardiac output were measured, followed by a coronary angiography that was achieved to estimate constrictor closure. A score of 0 to 5 was given, depending on the degree of occlusion, 5 being completely occluded. A score of three was attributed when the blood could hardly pass across the site of obliteration, and if there was no resistance whatsoever, a zero was given. A silicon plaque electrode containing 191 recordings was placed on the left ventricular free wall (LCx territory). Unipolar electrograms and ECG lead II were connected to a multichannel recording system (3,12). In 4 animals, signals were also recorded from the territory perfused by the left anterior descending coronary artery

(LAD) by placing the plaque electrode on the anterior left ventricular wall before measurements were made from the LCx territory.

Protocol. After recording electrograms in sinus rhythm, atrioventricular block was induced by formaldehyde injection (37%, 0,1 ml) into the atrioventricular node and ventricular pacing was maintained at cycle length of 400-500 ms with bouts of transient rapid pacing at 250 ms (1 min) (3). Refractory periods were determined using extra-stimuli (S2) coupled in 5 ms decrements, to repetitive trains of basic stimuli (S1, S1-S1 interval = 400-500 ms) applied from bipolar electrodes in the center of the plaque electrode. Signals were amplified by programmable-gain analog amplifiers (0,05- 450 Hz), converted to digital format at 1,000 samples·channels⁻¹·s⁻¹, and stored on a hard disk for analysis using custom-designed software.

Mapping data analysis. Unipolar electrograms were analysed using Cardiomap III software (<http://www.crhsc.umontreal/cardiomap>). Three measurements were extracted from the electrograms recorded at each electrode site. 1) The maximum slope of the negative deflection in the activation complex (reported herein as its absolute value: $|-dV/dt_{\max}|$, in mV/ms) was determined by computing for each sampling point the potential difference between the preceding and the following sampling points and dividing by 2 ms (2× the sampling period) (12). 2) The local activation time (ms) was determined at the point of $|-dV/dt_{\max}|$ with a value generally in excess of 0.5 mV/ms and was expressed (in ms) with reference to the earliest activation time determined under the plaque electrode. When $|-dV/dt_{\max}|$ was < 0.5 mV/ms and the electrogram did not display an “rs” morphology, it was considered that excitation did not occur at the corresponding recording site, as a result

of inexcitability or conduction block. 3) ST segment depression or elevation (mV) was measured with reference to isoelectric lines (T-Q) at 60 ms after activation.

Average conduction velocities (m/s) were measured in the longitudinal and transverse fiber directions in the LAD territory. When pacing from the center of the plaque, activation times increased from the center to the periphery of the recording surface; the computer-generated isochronal map displayed an ellipsoid pattern with a long axis along which conduction velocity was faster, and a short axis along which it was slower (11,12). Correspondence between the directions of relatively faster and slower conduction velocities, on the one hand, and the longitudinal and transverse fiber orientations, on the other hand, has been established in previous studies (35).

Since heterogeneous activation patterns were generated in the LCx territory, conduction velocity was measured at selected sites from the longest activation time difference between a given site and each of the surrounding ones divided by the interelectrode distance (23). A region of conduction disturbance (usually 3×3 electrode sites) was identified in the LCx territory (LCx1) in which conduction disturbances occurred in the form of abrupt changes in conduction time (>40 ms) and/or inexcitability. Another region was identified in which the activation pattern was regular (LCx2).

Tissue sampling. At the end of the electrophysiologic study, ventricular fibrillation was induced by application of a DC battery and the heart was excised with the plaque electrode still attached to the left ventricle. Tissue samples were dissected in the LCx1 and LCx2 regions identified during the electrophysiologic study as well as in the LAD region. Samples were taken in duplicate and separated into epicardial and endocardial tissue blocks. Half of the samples were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C

for Western blot analysis while the others were immersed in fixative (Tissue Fix, Laboratoires Gilles Chaput Inc.) for histology.

Cx43 western blot analysis. Frozen samples from 12 CRP-AM preparations and healthy controls (2 healthy dogs anaesthetised, heart excised, sample from each region separated and frozen in liquid nitrogen) were lyophilised on ice in liquid nitrogen with mortar and pestle. The powder was homogenised for 30 min at 4°C in a lysis buffer containing (mM): 50 Tris-HCl (pH7,5), 20 β -glycerophosphate, 20 NaF, 5 EDTA, 1 Na_3VO_4 , 10 benzamidine, 0,5 PMSF, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ leupeptine, 5 DTT and 1 μM microcystin, and 1% Triton X-100. The preparation was then sonicated for 30 s on ice and centrifuged at 6000 g for 10 min at 4°C. The pellet was discarded and analyses were performed on the supernatant. Total protein was determined (in 5 μl aliquot) with the Lowry protein assay. Volumes containing 15 μg of protein were loaded on a 12,5 % polyacrylamide gel and allowed to migrate for 90 min under 150 V. Four wells were loaded with samples from healthy dog while six others were loaded with samples from CRP-AM preparation according to the regions we chose at the final study. Proteins were then transferred on a nitrocellulose membrane for 90 min under 15 V in a semi-dry gel transfer apparatus. Proteins on the membrane are revealed with Ponceau Red. Unspecific sites are blocked for an hour at room temperature with 5% non-fat milk in TBS-T. The membrane is then incubated overnight (4°C) with monoclonal primary anti-Cx43 antibody (Chemicon 1:1000). The secondary anti-mouse antibody (Cell signalling, 1:5000) is applied for 45 minutes. The bands are revealed with chemiluminescence reagent on a Kodak film and analysed with the Kodak ID software (1). Samples of the four regions of interest, endocardial and epicardial LAD and LCx, from healthy dogs, were loaded on every gel and Cx43 expression in each region of CRP-AM

preparations was reported as percent of its expression in the same region in healthy canine on the same gel. Healthy dogs were only used as standard value on each gel.

Interstitial space modifications. Samples embedded in Tissue Fix after electrophysiological studies were transferred after 24 hours in a formalin-ethanol solution (50/50 %) until they were sliced longitudinally. They were then stained with Picrosirius Red and examined under circularly polarised light to visualise interstitial collagen from its red coloration (39). Photographs were taken and the surface staining for collagen was calculated as a percent of the total surface with the use of the NIH program ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Materials. All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO) unless specified. Leupeptin and microcystin were obtained from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Tween 20 was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris), sodium chloride, and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Ac-DEVD-AMC was obtained from BD Biosciences (Toronto, Canada). Lowry protein assay reagents were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced Chemiluminescence Reagents was obtained from Perkin Elmer (Markham, Ontario).

Data analysis. Data are reported as mean \pm S.D. unless stated otherwise. Electrophysiologic variables (conduction velocity, $-dV/dt_{\max}$, ST segment potential) were compared between LCx 1 and LCx 2 by t-test for paired data. Biochemical variables (Cx43 expression) and interstitial collagen surface fraction measured in different regions were compared by one way analysis of variance. Comparisons were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

7.4 - Results

Among the 17 animals, 2 died suddenly prior to electrophysiologic study, and another was withdrawn because severe deterioration of cardiac function (requiring massage) occurred before completion of data acquisition. The 14 remaining animals form the basis of this report. Pulmonary capillary wedge pressure was increased (from 6.1 ± 1.8 mmHg to 23.9 ± 8.9 mmHg) and cardiac output was reduced (from 2.61 ± 0.66 L/min to 1.71 ± 0.50 L/min) in all preparations. Left coronary circumflex artery was severely stenosed or totally occluded in 9 animals, moderately stenosed in 3, and slightly reduced in 1 and was not determined for technical reasons in 1.

Electrophysiologic study

Territory of left anterior descending coronary artery (LAD). Isochronal activation maps recorded from the LAD territory displayed regular wavefront progression. When pacing was performed from the center of the plaque electrode, activation times increased from the center to the periphery of the recording surface (Fig. 1,A). The computer-generated isochronal map displayed an ellipsoid pattern with a long axis along which conduction velocity was faster (0.66 ± 0.08 m/s) and a short axis along which it was slower (0.35 ± 0.08 m/s) corresponding respectively to the longitudinal and transverse muscle fiber orientations, as previously reported (11,35). ST segment potentials were isoelectric (1.4 ± 0.9 mV, see Fig. 1,B). $-dV/dt_{\max}$ were generally greater than -5 mV/ms (-8.7 ± 2.2 ; see Fig. 1,C).

Territory of the left circumflex coronary artery (LCx). In contrast to the LAD territory, activation patterns determined in the LCx territory displayed marked heterogeneities. Some areas displayed abrupt changes in activation times between neighboring sites or inexcitability (Fig. 2, middle panel: LCx 1 area) whereas regular activation sequences were identified in other areas (LCx 2 area). The regional heterogeneities precluded determination of longitudinal and transverse conduction velocities from the use of an ellipsoid model for the analysis of activation times generated during pacing from the center. ST segment potential elevation (Fig. 3,A) as well as $-dV/dt_{\max}$ depression below -5 mV/ms (Fig. 3,B) were identified in the areas of conduction disturbances. In contrast, areas in which regular conduction patterns were identified displayed isoelectric ST segment potentials and $-dV/dt_{\max}$ generally > 5 mV/ms, except at sites of poor electrode contact with tissue at the edges of the plaque electrode.

In 12 of 14 preparations, it was possible to identify areas in which conduction velocity was slowed markedly, as evidenced by bunching of isochronal lines, and/or inexcitability occurred (designated as LCx 1) and areas in which activation progressed regularly, without conduction delay and/or inexcitability (designated as LCx 2). In the other 2 preparations, it was not possible to identify within the LCx region 2 distinct areas with clear disparity in their respective conduction velocity pattern. LCx artery was totally occluded in one of these two preparations and slightly occluded in the other one.

When the LCx 1 and LCx 2 regions were compared, conduction velocity in the LCx1 region was significantly lower (Table 1, S1: 0.10 ± 0.05 m/s) than in the LCx2 region (S1: 0.28 ± 0.09 m/s) in agreement with the selection criterion. Depression of conduction velocity was exacerbated in response to closely coupled extrastimuli (S2, S3). As illustrated

in Fig. 3A, ST segment potential elevation which was exacerbated following transient rapid pacing was identified in all preparations in the LCx 1 region whereas only slight ST segment potential displacements (elevation or depression) were detected in the LCx 2 region (Table 1). The maximum negative slope of the activation complexes of unipolar electrograms ($-dV/dt_{\max}$) recorded from the LCx 1 region was significantly lower than the $-dV/dt_{\max}$ of recordings from the LCx 2 region (Fig. 3B and Table 1).

Cx43 expression.

The levels of Cx43 expression in protein sampled from the LAD regions as well as from the LCx 1 and LCx 2 regions were expressed with reference to protein sampled from healthy ventricular myocardium loaded in each gel (100%). There was no difference in Cx43 expression between the endocardial and epicardial levels neither in the LCx region nor in the LAD territory. Cx43 levels were significantly reduced in the LCx samples in comparison with LAD (Fig. 4). Moreover, expression levels in epicardial samples tended to be lower in the LCx 1 region ($42 \pm 26\%$) than in the LCx 2 region ($61 \pm 35\%$) although the difference was not statistically significant.

The diagram shown in Fig. 5 indicates that in 9 of 12 preparations, the Cx43 expression levels (ordinate) and $-dV/dt_{\max}$ values (abscissa) measured in the LCx 1 area were contained within a domain with $Cx43 < 50\%$ (with reference to healthy hearts) and $-dV/dt_{\max} < 10$ mV/ms. In the 3 preparations in which Cx43 levels of $\sim 80\%$ were measured in LCx 1 (#1,3,10), depression of conduction velocity (parentheses) appeared to be

determined by low $-dV/dt_{\max}$ values (#3 : 0.03 m/s – 1 mV/ms, #1 : 0.08 m/s – 3 mV/ms, #10 : 0.10 m/s – 7,1 mV/ms). In all preparations, the $-dV/dt_{\max}$ values determined in LCx 1 was lower than the value measured in LCx 2 whereas this was not always the case with Cx43 levels.

Interstitial space.

When microscopic images prepared from LAD, LCx 1 and LCx 2 tissue samples were compared, no significant difference was identified between collagen surface fraction (% of total surface) in the three regions (LAD - endo: 2.1 ± 1.0 , epi: 2.5 ± 0.8 , LCx1 - endo: 2.1 ± 0.5 , epi: 2.6 ± 0.8 , LCx2 - endo: 2.0 ± 1.0 , epi: 2.4 ± 1.1). Neither was there any difference with surfaces determined in samples from healthy hearts (LAD - endo: 2.2 ± 1.0 , epi: 2.6 ± 1.3 , LCx - endo: 2.0 ± 0.8 , epi: 2.3 ± 1.1).

7.5 - Discussion

In this study, we found that 1) Cx43 expression was significantly reduced in the LCx territory of CRP-AM preparations in comparison with the LAD territory, 2) in contrast to expectations, the Cx43 levels were not significantly lower in areas of conduction disturbances (LCx 1) than in the areas in which regular conduction patterns were identified (LCx 2), and 3) the active generator properties, assessed from $-dV/dt_{\max}$ measurements, were significantly reduced, and the ST segment potential displacements were significantly greater in the areas of conduction disturbances (LCx 1) but not in the areas with relatively intact conduction (LCx 2). We have previously reported that in this model, Na^+ channel protein expression is reduced in association with a depression of the $-dV/dt_{\max}$ of the activation complexes of unipolar electrograms recorded from the LCx territory (3). The border zone of infarct preparations is another example of a re-entrant substrate in which Na^+ channel protein expression is reduced (28) and $-dV/dt_{\max}$ is depressed (12).

It is noteworthy that, on the average, the Cx43 was consistently reduced to ~ 60% of healthy in subendocardial tissues from both LCx areas and in subepicardial tissues from LCx 2. In contrast, slightly more profound reduction (to 42% of healthy) was identified in epicardial LCx 1. Thus, conduction disturbances were associated with a combination of changes that included depressed active generator properties as well as reduced Cx43 expression (as illustrated in Fig. 5). This notion is consistent with the fact that marked depression of conduction velocity and inexcitability occurred at Cx43 expression levels that produce only moderate changes in conduction velocity in models with genetically altered Cx43 expression (5,34,37).

It is interesting to note that such conduction disturbances were detected in areas displaying marked ST segment elevation, which is a well known marker of transmural ischemia (13). One could speculate that cellular signaling associated with ischemic stress might thus be relatively more important for depression of active generator properties ($-dV/dt_{\max}$ depression identified mainly in LCx 1) than for alteration of Cx43 expression (identified in both LCx 1 and LCx 2).

Interstitial space modification did not appear to be involved in conduction disturbances. The literature concerning collagen accumulation in the interstitial space of animal preparations subjected to chronic rapid pacing is inconclusive since significant increases in the collagen content have been reported in some studies (38) but not in others (18,33). The data reported herein are consistent with the latter and moreover suggest that the CRP-AM combination would not be different from CRP in this regard.

Limitations. Analysis of Cx43 expression was limited to Western blot determinations. Because of a lack of confocal immunofluorescence microscopy, we would have missed any potential contribution in conduction slowing from redistribution of Cx43 from end-to-end intercalated disk localizations to lateral cell membrane surfaces (26,36). Another limitation is that the phosphorylation state of Cx43 was not considered in the analysis presented herein since Cx43 phosphorylation influences intercellular channel conductivity (2,4,7,14,24). The use of the anti-phospho-Cx43 antibody would help determine the phosphorylation state of the Cx43 in our model.

Perspective.

This study emphasizes the interplay between the active membrane properties and Cx43 regulation in myocardial conduction disturbances and the need to complement the study of genetically-engineered models with investigations in more realistic models of myocardial pathology. It also points to a need for further investigations of the cellular signalling leading to Cx43 remodelling as well as reduced expression of channels involved in the active membrane properties of cardiomyocytes.

7.6 - Bibliography

1. Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert E, Cardinal R, Rousseau G Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:416-422, 2004.
2. Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Dotto GP. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol* 11:5364-5371, 1991.
3. Cardinal R, Rousseau G, Bouchard C, Vermeulen M, Latour J-G, Pagé P L. Myocardial electrical alteration in canine preparations with combined chronic rapid pacing and progressive coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1496-H1506, 2004.
4. Cooper CD, Lampe PD. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* 277:44962-44968, 2002.
5. Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ Res* 95: 1035-1041, 2004.
6. Davis DM, Kanter HL, Beyer EC, Saffitz JE. Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. *J Am Coll Cardiol* 24:1124-1132, 1994.

7. Doble BW, Ping P, Kardami E. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ Res* 86:293-301, 2000.
8. Dupont E, Matsushita T, Kaba R A, Vozzi C, Coppens S R, Khan N, Kaprielian R, Yacoub M H, Severs N J. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33:359-371, 2001.
9. Eloff BC, Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE , Rosenbaum DS. High resolution optical mapping reveals conduction slowing in connexin-43 deficient mice. *Cardiovasc Res* 51: 681-690, 2001.
10. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *BioEssays* 18:719-730, 1996.
11. Hélie F, Cossette J, Vermeulen M, Cardinal R. Differential effects of lignocaine and hypercalcaemia on anisotropic conduction and reentry in the ischaemically damaged canine ventricle. *Cardiovasc Res* 29:359-372, 1995.
12. Hélie F, Vinet A, Cardinal R. Cycle length dynamics at the onset of postinfarction ventricular tachycardias induced in canines: dependence on interval-dependent excitation properties of the reentrant substrate. *J Cardiovasc Electrophysiol* 11:531-544, 2000.
13. Holland RP, Brooks H. TQ-ST segment mapping: critical review and analysis of current concepts. *Am J Cardiol* 40:110-129, 1977.
14. Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W. Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ* 9:13-21, 1998.

15. Kawara T, Derksen R, de Groot JR, Coronel R, Tasseron S, Linnenbank AC, Hauer RN, Kirkels H, Janse MJ, de Bakker JM. Activation delay after premature stimulation in chronically diseased human myocardium relates to the architecture of interstitial fibrosis. *Circulation* 104: 3069-3075, 2001.
16. Kitamura H, Ohnishi Y, Yoshida A, Okajima K, Azumi H, Ishida A, Galeano EJ, Kubo S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Heterogeneous loss of connexin43 protein in nonischemic dilated cardiomyopathy with ventricular tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13:865-870, 2002.
17. Kléber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* 84: 431-488, 2004.
18. Komamura K, Shannon RP, Pasipoularides A, Ihara T, Lader AS, Patrick TA, Bishop SP, Vatner SF Alterations in left ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* 89:1825-1838, 1992.
19. Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* 62:426-436, 2004.
20. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem* 242:135-144, 2003.
21. Lammers WJ, Schalij MJ, Kirchhof CJ, Allessie MA. Quantification of spatial inhomogeneity in conduction and initiation of re-entrant atrial arrhythmias. *Am J Physiol* 259: H1254-H1263, 1990.

22. Laurent CE, Cardinal R, Rousseau G, Vermeulen M, Bouchard C, Wilkinson M, Armour JA, Bouvier M. Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comparative Physiol* 280:R355-R364, 2001.
23. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: Atrial remodelling of a different sort. *Circulation* 100:87-95, 1999.
24. Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 90:1100-1107, 2002.
25. Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circ Res* 85:1046-1055, 1999.
26. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 95:988-996, 1997.
27. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation* 88:864-875, 1993.
28. Pu J, Boyden PA. Alterations of Na⁺ currents in myocytes from epicardial border zone of the infarcted heart. A possible ionic mechanism for reduced excitability and postrepolarization refractoriness. *Circ Res* 81: 110-119, 1997.

29. Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res* 42:309-317, 1999.
30. Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG. Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 76:412-417, 1996.
31. Severs NJ. Gap junction remodeling in heart failure. *J Card Fail* 8:S293-S299, 2002.
32. Spach MS, Heidlage JF, Barr RC. Cell size and communication: Role in structural and electrical development and remodeling of the heart. *Heart Rhythm* 4: 500-515, 2004.
33. Spinale FG, Tomita M, Zellner JL, Cook JC, Crawford FA, Zile MR. Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia. *Am J Physiol* 261:H308-H318, 1991.
34. Thomas SP, Kucera JP, Bircher-Lehmann L, Rudy Y, Saffitz JE, Kléber AG. Impulse propagation in synthetic strands of neonatal cardiac myocytes with genetically reduced levels of connexin 43. *Circ Res* 92: 1209-1216, 2003.
35. Ursell PC, Gardner PI, Albala A, Fenoglio JJ Jr, Wit AL. Structural and electrophysiological changes in the epicardial border zone of canine myocardial infarcts during infarct healing. *Circ Res* 56: 436-451, 1985.
36. Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 86:871-878, 2000.
37. van Rijen HVM, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongasma HJ, Opthof T, de Bakker JMT. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the

propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 109: 1048-1055, 2004.

38. Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 82:1387-1401, 1990.
39. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 89:397-410, 1994.
40. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725-737, 2002.

7.7 - Legend

Figure 1. Representative isochronal map illustrating activation in the left anterior descending coronary artery (LAD) territory.

A. When pacing was performed from the center of the plaque electrode, activation times increased progressively from the center to the periphery of the recording surface according to a regular anisotropic conduction pattern, as indicated by the color code and isochronal lines (drawn at 20 ms intervals). B. Isoelectric (± 5 mV) ST segment potential values were measured.

C. $-dV/dt_{\max}$ values were greater than 5 mV/ms at most recording sites except in some areas (1-5 mV/ms) in which there was poor contact between tissue and the edge of the plaque electrode. The unipolar electrogram was selected as the one showing maximum ST segment displacement. The diagram of the heart indicates the position of the plaque electrode in the LAD territory.

Figure 2. Representative isochronal map illustrating the identification of areas of conduction disturbance (LCx 1) and regular wave front progression (LCx 2) in the LCx territory of CRP-AM preparations.

Middle panel. Isochronal activation map during stimulation applied to the center of the LCx territory. Conduction velocity was depressed and inexcitability occurred in most of the recording field (encompassing the LCx 1 area) whereas the wave front progressed regularly in the upper right hand quadrant (LCx 2). Activation times are indicated by numbers, and inexcitable areas are left blank. Left hand panel. Areas (LCx 1 and LCx 2) from which conduction velocity measurements were made. Right hand panel. Diagram of the heart

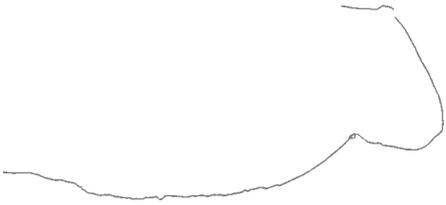
showing position of the plaque electrode. Representative unipolar recordings from LCx 1 and LCx 2 are shown with $-dV/dt_{\max}$ (mV/ms) and ST segment potential (mV) values.

Figure 3. Electrical alterations in the LCx territory. Maps showing representative ST segment potential elevation (A) and $-dV/dt_{\max}$ reduction (B) below 5 mV/ms. Electrophysiologic alterations were exacerbated at a rapid pacing cycle length (250 ms: right hand maps) in comparison with a slow pacing cycle length (750 ms: left hand maps). Magnified fields indicate the $-dV/dt_{\max}$ values that were averaged for LCx 1 and LCx 2.

Figure 4. Alterations of Cx43 expression in the LCx territory of CRP-AM preparations.

A. Representative Western blots. B. Bar diagrams indicate Cx43 levels (mean \pm S.E. n=12) expressed as percent of corresponding regions in tissues from healthy canines (taken as 100%). Values obtained in the LAD region of CRP-AM preparations were similar to corresponding healthy heart values whereas the values from the LCx areas were significantly lower than in the LAD region ($p < 0.01$). Cx 43 expression at the epicardial level in the LCx 1 area tended to be lower than in the LCx 2 area although not significantly different.

Figure 5. Conduction disturbances in the LCx 1 area depends on combined reductions in Cx 43 expression (ordinate) and $-dV/dt_{\max}$ (abscissa). Data are shown for the LCx 1 and LCx 2 areas from 12 CRP-AM canine preparations. $-dV/dt_{\max}$ values were measured in the first beat following pacing at a rapid cycle length (250 ms) for 30 s. Conduction velocities (m/s) are indicated in parentheses.



7.8 – Table and figure

Table 1. *Electrophysiologic alterations in the LCx1 versus LCx2 areas*

	LCx1	LCx2
A. Conduction velocity (m/s)		
S1	0.10 ±0.05*	0.28 ±0.09
S2	0.08 ±0.04*	0.22 ±0.07
S3	0.06 ±0.04*	0.18 ±0.06
B. dV/dt_{max} (mV/ms)		
Sinus rhythm	7.8 ±4.1	9.6 ±3.3
Rapid pacing	4.4 ±3.4*	9.6 ±3.6
C. ST segment potential (mV)		
Sinus rhythm	16.6 ±16.9*	-0.6 ±2.0
Rapid pacing	23.3 ±14.6*	0.3 ±1.4

A. Conduction velocity measurements were made during basic pacing (S1-S1 = 400-500 ms) as well as in response to a first (S1-S2 \cong 180 ms) and second extrastimulus (S2-S3 \cong 160 ms). B., C. dV/dt_{max} and ST segment potential were measured in the selected LCx 1 and LCx 2 areas during sinus rhythm as well as in the first beat following termination of rapid pacing for 30 s at a cycle length of 250 ms. Mean \pm SD *= $p < 0.05$, (n=12 preparations)

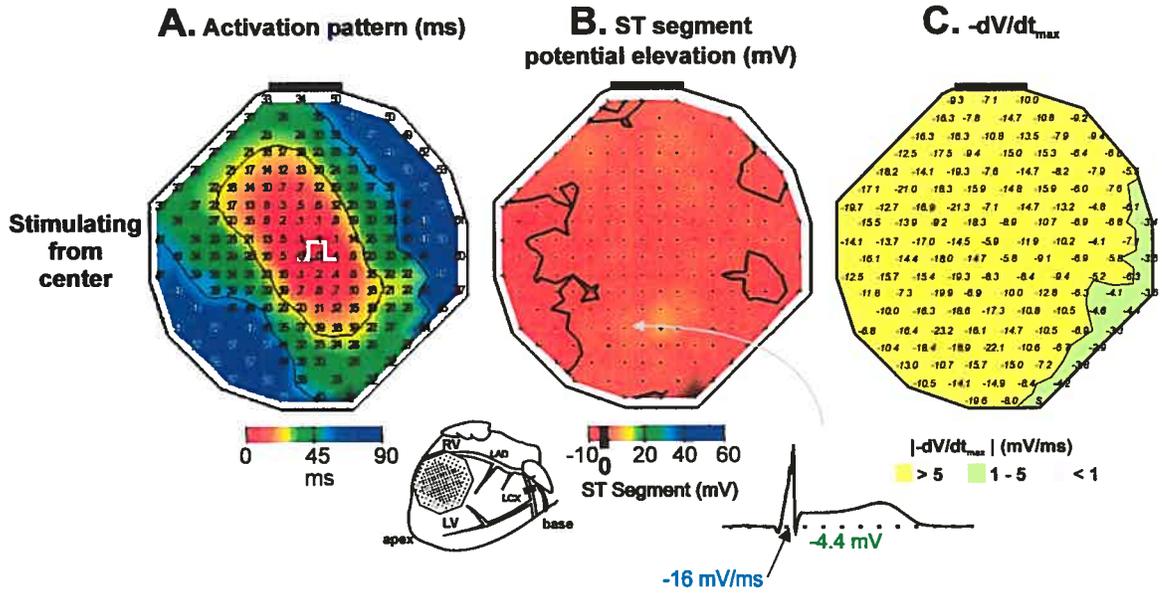


Figure 1

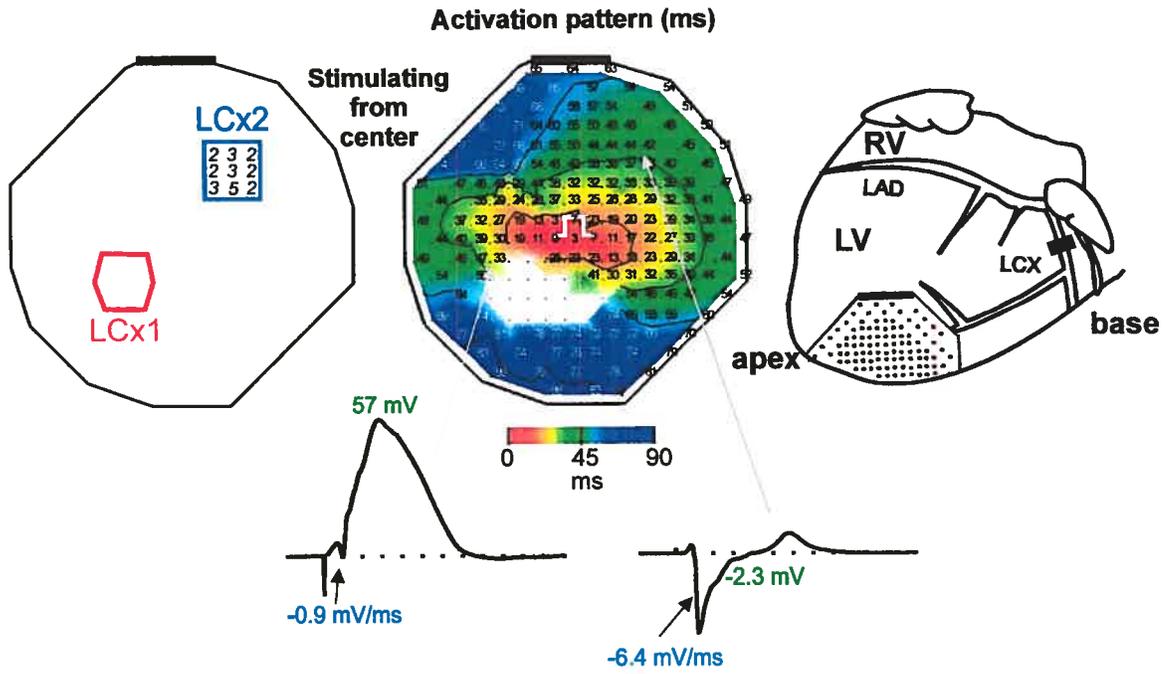


Figure 2

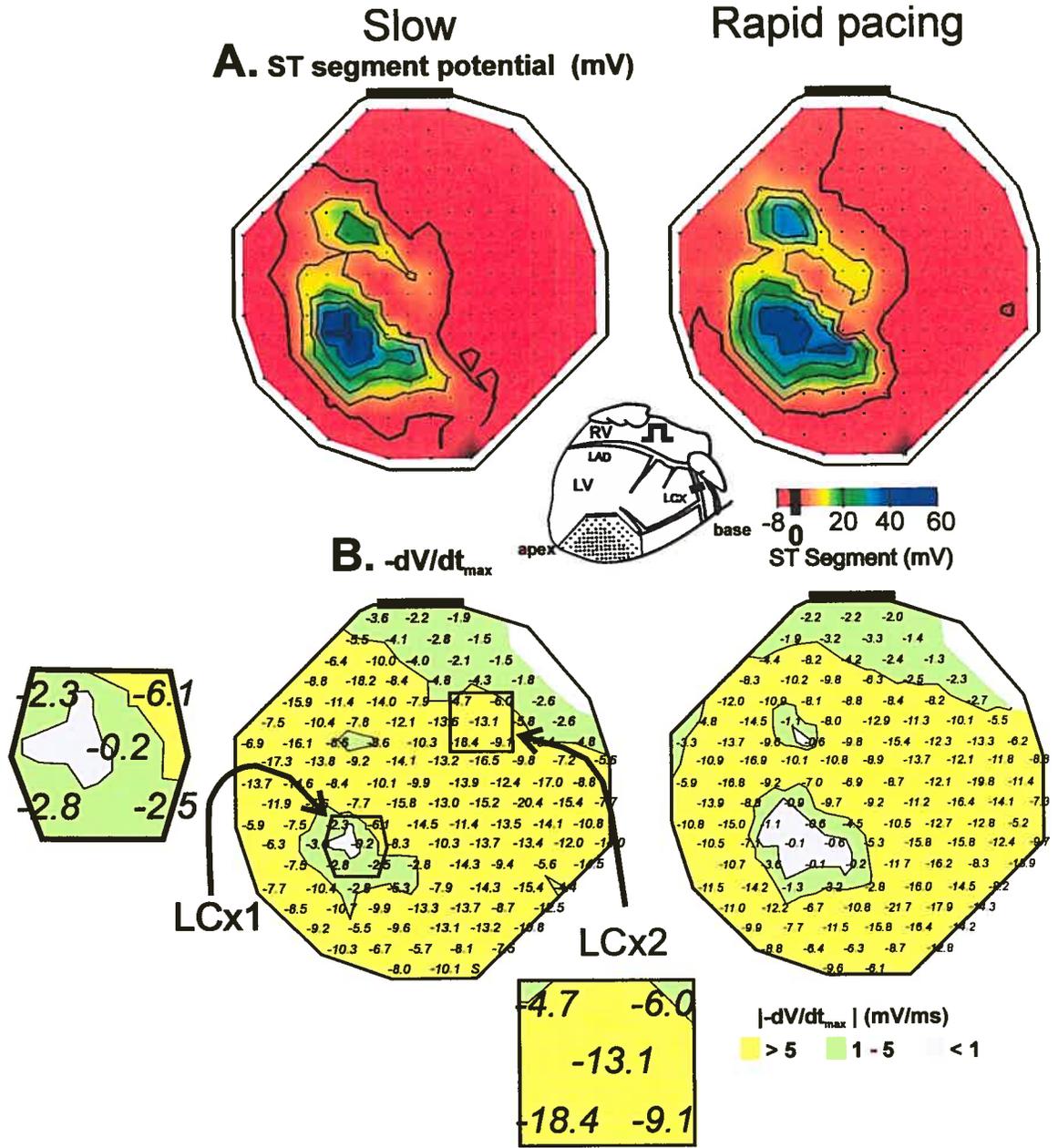
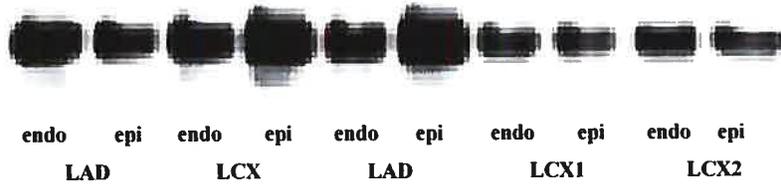


Figure 3

A)



B)

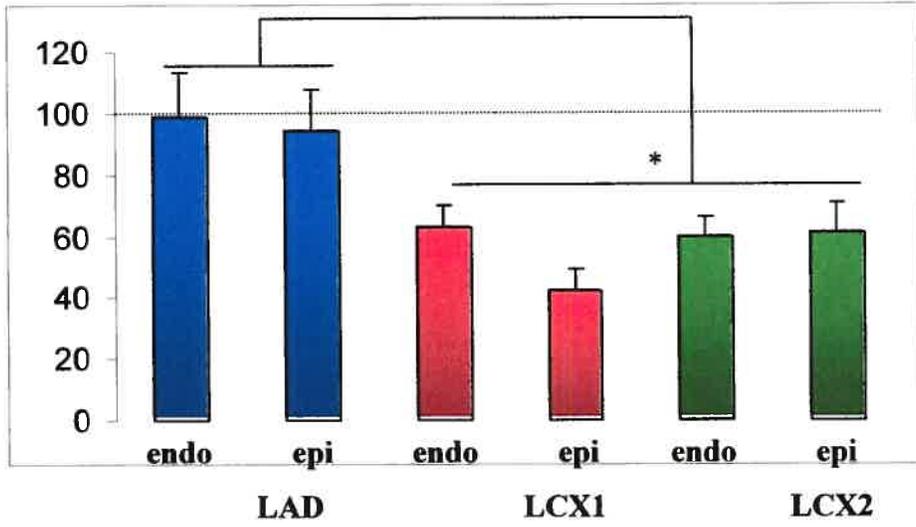


Figure 4

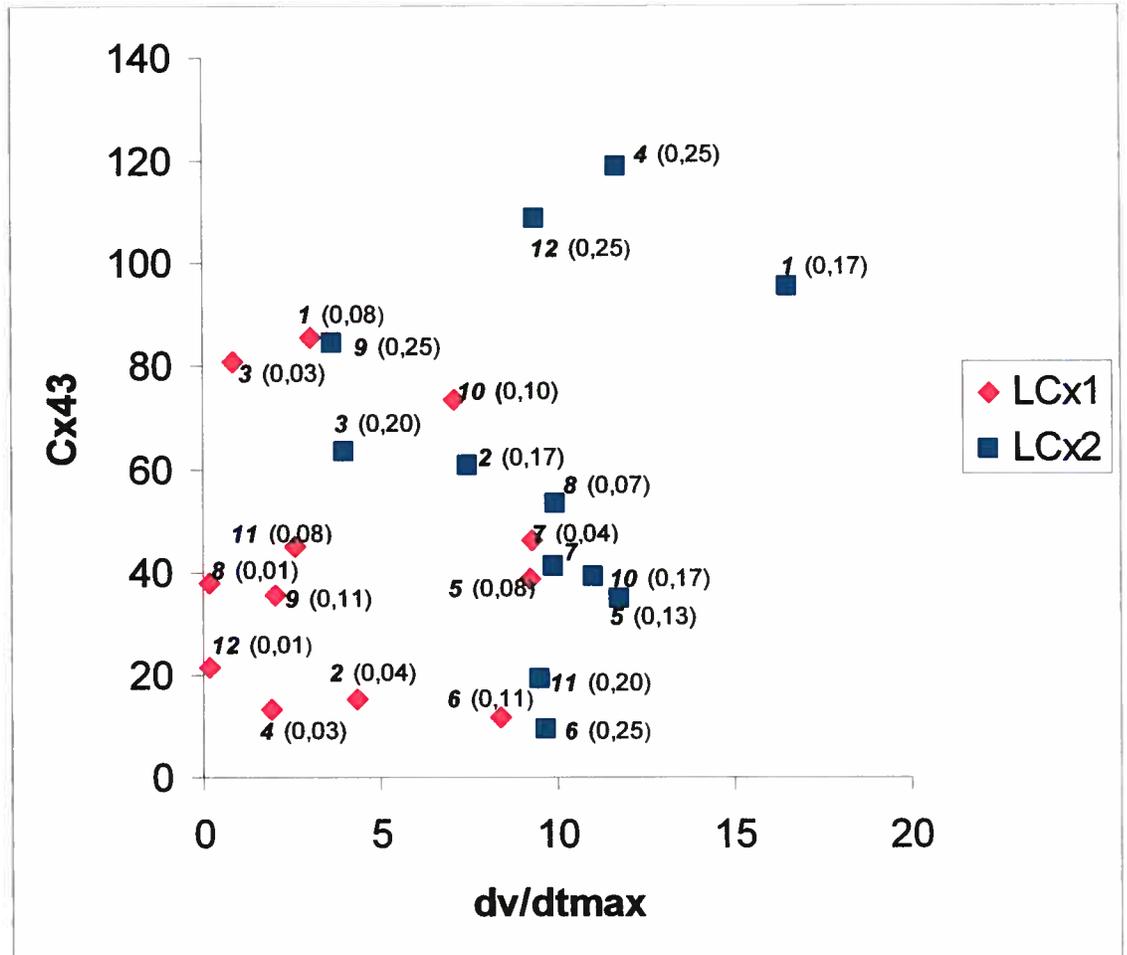


Figure 5

Chapitre 8 - Discussion

Une diminution de l'expression de la Cx43 accompagnée d'une dépression de la valeur des dV/dt_{\max} dans une région présentant des troubles de la conduction, mais qui ne contenait pas de substrat nécrotique est la principale observation de notre étude. Une désorganisation de la distribution de la Cx43 en bordure de zone d'un infarctus avait déjà été rapportée auparavant (Peters 1997). Ce désordre transmural des jonctions Gap correspondait dans l'espace avec un site ou prenait forme un circuit de réentrée. Il est maintenant intéressant d'observer qu'une région ayant des altérations électriques présente aussi un dérangement au niveau des connexines accompagné d'une réduction de l'entrée de sodium dans la cellule (dV/dt_{\max}), et ce, sans qu'il n'y ait eu présence d'infarctus.

Notre laboratoire a déjà démontré qu'il était possible de créer un modèle animal présentant des troubles d'origines électriques qui favorisaient les arythmies, et ce sans qu'il y ait eu nécrose au niveau du tissu. Lors de cette présente étude, nous avons pu recréer ces altérations au niveau de la propagation de l'influx électrique dans le myocarde. Le modèle que nous avons utilisé était le même qu'au cours de l'étude précédente (Cardinal 2004), toutefois certaines améliorations y ont été apportées. Dans le modèle antérieur, l'installation du constricteur améroïde se faisait au même moment que celle du stimulateur cardiaque. Toutefois, la formation d'une circulation collatérale en réponse compensatoire à la restriction du flot sanguin était trop importante, ce qui réduisait la présence de troubles de conduction. Afin d'avoir un modèle idéal pour l'observation de troubles de conduction, nous avons synchronisé dans le temps les effets optimaux des deux types de stress énergétiques. L'insuffisance cardiaque par le stimulateur commence à devenir apparente après 3 à 4 semaines d'entraînement ventriculaire rapide. Le constricteur améroïde pour sa part crée un effet optimal après environ une quinzaine de jours. Ce laps de temps permet d'obtenir une occlusion souvent complète de l'artère sans qu'une circulation collatérale trop importante n'ait eu le temps de se développer. Ainsi, nous sommes parvenus à maximiser l'interaction entre ces deux types de stress en démarrant l'entraînement ventriculaire rapide 2 semaines avant l'implantation du constricteur améroïde.

Nous avons pu observer, grâce à la cartographie épiscopardique du territoire de la LCx, des troubles de conduction en conséquence du stress énergétique qui avait été imposé. Le ralentissement significatif de la vitesse de propagation du courant pouvait être détecté par une altération de la séquence d'activation anisotropique à certains points sous la plaque. Toutefois, des régions montrant un patron anisotropique plus normal étaient aussi présentes. Certaines zones, à certains moments au cours de l'expérience étaient même inexcitables. Il est à noter que le tissu dans ces régions n'était pas mort puisque l'inexcitabilité n'était pas permanente et qu'aucune nécrose n'était détectée. En effet, en faisant varier le site de stimulation, il était possible d'exciter une zone qui était quelques instants auparavant inexcitable. Les régions qui étaient associées à une diminution de la vitesse de conduction étaient aussi associées à une élévation significative du segment ST, alors que celles qui étaient plutôt normales ne présentaient pas cette élévation. Les dV/dt s dans les zones de conduction anormale étaient aussi significativement diminués. Ce paramètre est associé à la pente ascendante du potentiel d'action, et par conséquent à l'entrée de sodium dans la cellule qui se dépolarise. Ce résultat est intéressant puisque la propagation de l'influx électrique dans le cœur dépend entre autres de l'entrée de sodium dans les cardiomyocytes. Ce résultat suggère donc que dans la région étudiée, le ralentissement de la propagation électrique peut être dû à une altération au niveau des canaux sodiques.

Une diminution de l'expression de la Cx43 a été rapportée dans plusieurs maladies cardiovasculaires chez l'humain ainsi que dans un bon nombre de modèles animaux de ces pathologies (Peters 1993, Dupont 2001, Spach 2000, Kostin 2003 et 2004). Lors de la présente investigation, nous avons remarqué une chute de l'expression de cette protéine dans le territoire qui subissait la restriction de flot sanguin en plus de l'entraînement ventriculaire rapide en comparaison avec le territoire de la LAD. Cette observation est intéressante puisqu'au cours de l'étude précédente qui avait été faite sur le même modèle, la combinaison de toutes les altérations électriques était le résultat d'une synergie entre les deux stress énergétiques. Trois groupes de chiens avaient été étudiés, soit ceux qui ne subissaient que la restriction de flot par le constricteur améroïde, ceux qui n'expérimentaient que l'entraînement rapide et les finalement ceux qui supportaient la

combinaison des deux. Les troubles de conduction et l'inexcitabilité n'étaient rapportés que chez les chiens CRP-AM. Une diminution de l'expression des canaux sodiques était aussi détectée dans le territoire de la LCx de ces préparations. Or, dans le cas qui nous occupe aujourd'hui, la région LAD ne supportant qu'un seul des deux types de stress, elle est moins susceptible aux troubles de conduction et à l'inexcitabilité. Ce qui a été confirmé par les cartes électrophysiologiques de cette région. La chute de l'expression de la Cx43 peut donc contribuer aux troubles de conduction, en plus de la dépression du canal sodique. Ce résultat suggère que la diminution de l'expression de cette protéine pourrait être à l'origine d'un découplage cellulaire qui peut engendrer un ralentissement de la vitesse de conduction, et même parfois des blocs de conduction, qui sont tous des paramètres favorisant les arythmies ventriculaires et éventuellement le phénomène de mort subite par fibrillation.

Nous n'avons cependant pas vu de différence significative au niveau de l'expression des connexines entre les régions distinctes sous la plaque. Plusieurs interprétations de ce résultat peuvent être élaborées. Premièrement, des études ont déjà rapporté une altération dans la distribution de la Cx43 dans le modèle d'infarctus (Peters 1997). La détection de celle-ci ne se faisait plus aux embouts des cellules mais plutôt en bordure latérale des myocytes. Il n'est donc pas exclu que ce soit une différence que nous aurions pu observer entre les deux zones sous la plaque et qui aurait pu expliquer les distinctions électriques qui les caractérisaient. La mesure de la distribution de la Cx43 par immunofluorescence serait donc un paramètre éventuellement intéressant à étudier. De plus, il a été rapporté dans la littérature que la phosphorylation de la Cx43 pouvait influencer la perméabilité du canal. Il n'est alors pas improbable que même si les deux régions sous la plaque sont constituées de la même quantité de Cx43, celles-ci n'aient pas le même état de phosphorylation dans les deux zones. Certains anticorps spécifiques à la forme non-phosphorylée de la protéine sont disponibles, il serait donc possible dans une prochaine étude de vérifier si une différence à ce niveau est observable entre les différentes régions sous la plaque.

Nous avons étudié les modifications de l'espace interstitiel dans notre modèle via la coloration du collagène. Une augmentation de l'espace que celui-ci occupe entre les cardiomyocyte aurait pu causer un découplage cellulaire, ce qui aurait pu ralentir la

propagation du courant électrique. Il est connu que lors de l'infarctus du myocarde, il y a invasion de la région affectée par du tissu cicatriciel. Cette augmentation du collagène peut altérer le couplage cellule-à-cellule et par conséquent ralentir la conduction. Aucune variation significative au niveau de l'espace interstitiel n'a été notée dans notre modèle animal par rapport à des chiens sains (témoins). Aussi, aucun changement à ce niveau n'a été identifié entre les différentes régions d'intérêt. Ce résultat suggère que les troubles de conduction que nous observons sur le territoire de la LCx ne sont probablement pas dus à un découplage cellulaire ayant comme origine une modification de l'espace entre les cellules, favorisant ainsi l'hypothèse que la chute de l'expression de la Cx43 soit à l'origine de ce découplage.

Il sera maintenant intéressant de poursuivre ces études afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la formation de troubles de conduction associés à certaines maladies cardiovasculaires, notamment l'insuffisance cardiaque. La régulation de l'expression de la Cx43 est très complexe et implique un grand nombre de variables. Il faudra alors pousser plus loin l'investigation de ces paramètres. Étant donné que cette protéine a un taux de renouvellement très rapide, il serait important d'en connaître davantage sur les facteurs influençant sa synthèse et sa dégradation. En premier lieu il serait nécessaire d'élucider les mécanismes à l'origine d'une diminution de l'expression de la protéine. Une telle réduction peut être causée par des événements au niveau de la transcription du gène. En effet, la pathologie pourrait influencer l'expression de certains activateurs et répresseurs de la transcription. Il est donc possible que la diminution de l'expression soit causée par une altération au niveau de la transcription. La phosphorylation de la protéine méritera aussi d'être étudiée, puisque ce paramètre peut potentiellement influencer autant le transport de la protéine à la membrane, la perméabilité du canal ainsi que la susceptibilité de la protéine à être dégradée. L'étude de la phosphorylation implique non seulement l'état de phosphorylation de la protéine même, mais aussi l'étude des kinases et phosphatases activées. La dégradation de la Cx43 par certaines protéases peut aussi avoir un rôle déterminant au niveau de son expression.

Le modèle de chien CRP-AM que nous avons utilisé s'avère être un modèle avantageux pour étudier certains de ces paramètres *in vivo*. Cependant, afin d'étudier des

mécanismes considérés comme étant davantage moléculaires, les modèles *in vitro* sont souvent plus appropriés. Effectivement, ils sont des modèles moins complexes qui comportent moins de variables pouvant influencer les résultats, ils sont donc plus adéquats quand il s'agit d'élucider des mécanismes moléculaires à la base de certains phénomènes. Les cultures primaires de cardiomyocytes de rats néonataux sont un très bon modèle pour d'étudier les paramètres pouvant influencer l'expression de la Cx43.

Quelle que soit l'avenue empruntée, la recherche doit encore avancer en vue de découvrir des cibles pharmacologiques efficaces pour réduire les troubles de conduction cardiaques qui sont à l'origine des arythmies ventriculaires, et par conséquent de la mort subite chez un grand nombre de patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

Bibliographie

- Akazawa H, Komuro I** (2003) Too much Csx/Nkx2.5 is as bad as too little?, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35:227-229;
- Ahmad S, Diez JA, George CH, Evans WH** (1999) Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels, *Biochemical Journal*, 339:247-253;
- Ahmad S, Martin PE, Evans WH** (2001) Assembly of gap junction channels: mechanism, effects of calmodulin antagonists and identification of connexin oligomerization determinants, *European Journal of Biochemistry*, 268:4544-4552;
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA** (1987) Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver, *Journal of Cellular Biology*, 105:2621-2629;
- Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert E, Cardinal R, Rousseau G** (2004) Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 43:416-422;
- Bowling N, Huang X, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Esterman M, Allen PD, Maddi R, McCall E, Vlahos CJ** (2001) Protein kinase C-alpha and -epsilon modulate connexin-43 phosphorylation in human heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33:789-798;
- Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Dotto GP** (1991) The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins, *Molecular and Cellular Biology*, 11:5364-5371;
- Calderone A, Bouvier M, Li K, Juneau C, de Champlain J, Rouleau JL** (1991) Dysfunction of the beta- and alpha-adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog, *Circulation Research*, 69 :332-343;
- Cardinal R, Rousseau G, Bouchard C, Vermeulen M, Latour J-G, Pagé P L** (2004) Myocardial electrical alteration in canine preparations with combined chronic rapid

- acing and progressive coronary artery occlusion, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286:H1496-H1506;
- Chen ZQ, Lefebvre D, Bai XH** (1995) Identification of two regulatory elements within the promoter region in the mouse connexin43 gene, *Journal of Biological Chemistry*, 270:3863-3868;
- Cruciani V, Mikalsen S-O** (2002) Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases, *Biology of the cell*, 94 :433-443;
- Cruciani V, Mikalsen SO** (2005) The connexin gene family in mammals, *Biological Chemistry*, 386:325-332;
- Cooper CD, Lampe PD** (2002) Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly, *Journal of Biological Chemistry*, 277:44962-44968;
- Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R** (1989) Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1, *Cell*, 59:827-836;
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF** (1990) Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts, *Molecular and Cellular Biology*, 10:1754-1763;
- Damiano RJ Jr, Tripp HF Jr, Asano T, Small KW, Jones RH, Lowe JE** (1987) Left ventricular dysfunction and dilatation resulting from chronic supraventricular tachycardia, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 94:135-143;
- Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE** (2004) Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circulation Research*, 95: 1035-1041.
- Davies CH, Harding SE, Poole-Wilson PA** (1996) Cellular mechanisms of contractile dysfunction in human heart failure, *European Heart Journal*, 17:189-198;
- Davis DM, Kanter HL, Beyer EC, Saffitz JE** (1994) Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. *Journal of the American College of Cardiology*, 24:1124-1132.
- De Leon JR, Buttrick PM, Fishman GI** (1994) Functional analysis of the Cx43 gene promoter *in vivo* and *in vitro*, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26:379-389;

- Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM** (2004) Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels, *Cardiovascular Research*, 62: 268-275;
- Doble BW, Ping P, Kardami E** (2000) The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation, *Circulation Research*, 86:293-301;
- Dupont E, Matsushita T, Kaba R A, Vozzi C, Coppens S R, Khan N, Kaprielian R, Yacoub M H, Severs N J** (2001) Altered connexin expression in human congestive heart failure, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33:359-371;
- Dupuis J, Moe GW, Cernacek P** (1998) Reduced pulmonary metabolism of endothelin-1 in canine tachycardia-induced heart failure, *Cardiovascular Research*, 39:609-616;
- Duthe F, Plaisance I, Sarrouilhe D, Herve JC** (2001) Endogenous protein phosphatase 1 runs down gap junctional communication of rat ventricular myocytes, *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 281:C1648-C1656;
- Echeteu CO, Ali M, Izban MG, Mackay L, Garfield RE** (1999) Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin43 gene, *Molecular Human Reproduction*, 5:757-766;
- Eloff BC, Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE, Rosenbaum DS** (2001) High resolution optical mapping reveals conduction slowing in connexin-43 deficient mice. *Cardiovascular Research*, 51: 681-690.
- Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL** (1992) Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide, *Science*, 257:387-389;
- Fishman GI, Hertzberg EL, Spray DC, Leinwand LA** (1991) Expression of connexin43 in the developing rat heart, *Circulation Research*, 68:782-787;
- Fromaget C, el Aoumari A, Gros D** (1992) Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes, *Differentiation*, 51:9-20;
- Geimonen E, Jiang W, Ali M, Fishman GI, Garfield RE, Andersen J** (1996) Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene

- transcription through an AP-1 site in the promoter sequence, *Journal of Biological Chemistry*, 27:23667-23674;
- George CH, Kendall JM, Evans WH** (1999) Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions, *Journal of Biological Chemistry*, 274:8678-8685;
- Goodenough DA, Paul DL** (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels, *Nature Reviews, Molecular and Cellular Biology*, 4:285-294;
- Gros DB, Jongsma HJ** (1996) Connexins in mammalian heart function, *BioEssays*, 18:719-730;
- Guerrero PA, Schuessler RB, Davis LM, Beyer EC, Johnson CM, Yamada KA, Saffitz JE** (1997) Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation, *Journal of Clinical Investigation*, 99:1991-1998;
- Gutstein DE, Morley GE, Fishman GI** (2001) Conditional gene targeting of connexin43: exploring the consequences of gap junction remodeling in the heart, *Cell Communication and Adhesion*, 8:345-348;
- Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI** (2001) Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43, *Circulation Research*, 88:333-339;
- Hélie F, Cossette J, Vermeulen M, Cardinal R** (1995) Differential effects of lignocaine and hypercalcaemia on anisotropic conduction and reentry in the ischaemically damaged canine ventricle. *Cardiovascular Research*, 29:359-372.
- Helie F, Vinet A, Cardinal R** (2000) Cycle length dynamics at the onset of postinfarction ventricular tachycardias induced in canines: dependence on interval-dependent excitation properties of the reentrant substrate, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 11:531-544;
- Hertzberg EL, Saez JC, Corpina RA, Roy C, Kessler JA** (2000) Use of antibodies in the analysis of connexin 43 turnover and phosphorylation, *Methods*, 20:129-139;
- Holland RP, Brooks H** (1977) TQ-ST segment mapping: critical review and analysis of current concepts, *American Journal of Cardiology*, 40:110-129;

- Howard RJ, Stopps TP, Moe GW, Gotlieb A, Armstrong PW** (1988) Recovery from heart failure: structural and functional analysis in a canine model, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 66:1505-1512;
- Huntington K, Picard P, Moe G, Stewart DJ, Albernaz A, Monge JC** (1998) Increased cardiac and pulmonary endothelin-1 mRNA expression in canine pacing-induced heart failure, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 31:S424-426;
- Iacobas D A, Iacobas S, Li Wei, Zoidl G, Dermietzel R, Spray DC** (2005) Genes controlling multiple functional pathways are transcriptionally regulated in connexin43 null mouse heart, *Physiological Genomics*, 20:211-223;
- Ingebritsen TS, Cohen P** (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities, *European Journal of Biochemistry*, 132 :255-261;
- Jay PY, Harris BS, Buerger A, Rozhitskaya O, Maguire CT, Barbosky LA, McCusty E, Berul CI, O'brien TX, Gourdie RG, Izumo S** (2004) Function follows form: cardiac conduction system defects in Nkx2-5 mutation, *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 280:966-972;
- Jongsma HJ, Wilders R** (2000) Gap junctions in cardiovascular disease, *Circulation Research*, 86:1193-1197;
- Kajstura J, Zhang X, Liu Y, Szoke E, Cheng W, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P** (1995) The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy, *Circulation*, 92 : 2306-2317;
- Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W** (1998) Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis, *Cell Growth and Differentiation*, 9:13-21;
- Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennell DJ, Fox K, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ** (1998) Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle, *Circulation*, 97:651-660;
- Kasahara H, Ueyama T, Wakimoto H, Liu MK, Maguire CT, Converso KL, Kang PM, Manning WJ, Lawitts J, Paul DL, Berul CI, Izumo S** (2003) Nkx2.5

homeoprotein regulates expression of Gap junction protein Cx43 and sarcomere organisation in postnatal cardiomyocytes, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35:243-256;

Kasahara H, Wakimoto H, Liu M, Maguire CT, Converso KL, Shioi T, Huang WY, Manning WJ, Paul D, Lawitts J, Berul CI, Izumo S (2001) Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein, *Journal of Clinical Investigation*, 108:189-201;

Kawara T, Derksen R, de Groot JR, Coronel R, Tasseron S, Linnenbank AC, Hauer RN, Kirkels H, Janse MJ, de Bakker JM (2001) Activation delay after premature stimulation in chronically diseased human myocardium relates to the architecture of interstitial fibrosis. *Circulation*, 104: 3069-3075.

Khadour FH, O'Brien DW, Fu Y, Armstrong PW, Schulz R (1998) Endothelial nitric oxide synthase increases in left atria of dogs with pacing-induced heart failure, *American Journal of Physiology*, 275:H1971-H1978;

Kitamura H, Ohnishi Y, Yoshida A, Okajima K, Azumi H, Ishida A, Galeano EJ, Kubo S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M (2002) Heterogeneous loss of connexin43 protein in nonischemic dilated cardiomyopathy with ventricular tachycardia, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13:865-870;

Komamura K, Shannon RP, Pasipoularides A, Ihara T, Lader AS, Patrick TA, Bishop SP, Vatner SF (1992) Alterations in left ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-induced heart failure, *Journal of Clinical Investigation*, 89:1825-1838;

Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J (2004) Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis, *Cardiovascular Research*, 62:426-436;

Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J (2003) Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 242:135-144;

Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel, *Cell*, 84 :381-388;

- Laird DW, Puranam KL, Revel JP** (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes, *Biochemical Journal*, 273:67-72;
- Lammers WJ, SchaliJ MJ, Kirchhof CJ, Allessie MA** (1990) Quantification of spatial inhomogeneity in conduction and initiation of re-entrant atrial arrhythmias. *American Journal of Physiology* 259: H1254-H1263.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF** (2000) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication, *Journal of Cellular Biology*, 26:1503-1512;
- Lampe PD, Lau AF** (2000) Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384:205-215;
- Laurent CE, Cardinal R, Rousseau G, Vermeulen M, Bouchard C, Wilkinson M, Armour JA, Bouvier M** (2001) Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiocytes, *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 280:R355-R364;.
- Leri A, Liu Y, Malhotra A, Li Q, Stiegler P, Claudio PP, Giordano A, Kajstura J, Hintze TH, Anversa P** (1998) Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes, *Circulation*, 97:194-203;
- Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S** (1999) Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: Atrial remodelling of a different sort. *Circulation*, 100:87-95.
- Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF** (2001) v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication, *Journal of Cellular Biology*, 154:815-827;
- Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P** (1995) Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs, *Laboratory investigation*, 73:771-787;
- Mann DL, Young JB** (1994) Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines, *Chest*, 105:897-904;

- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC** (2002) Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation, *Circulation Research*, 90:1100-1107;
- Martin P E M, Evans W H** (2004) Incorporation of connexins into plasma membrane and gap junctions, *Cardiovascular Research*, 62: 378-387;
- Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T** (1999) Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts, *Circulation Research*, 85:1046-1055;
- McMurray J, McLay J, Chopra M, Bridges A, Belch JJ** (1990) Evidence for enhanced free radical activity in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease, *American Journal of Cardiology*, 65:1261-1262;
- Moe GW, Armstrong P** (1999) Pacing-induced heart failure: a model to study the mechanism of disease progression and novel therapy in heart failure, *Cardiovascular Research*, 42:591-599;
- Moe GW, Grima EA, Howard RJ, Armstrong PW** (1996) Batrial appendage hypertrophy but not ventricular hypertrophy: a unique feature of canine pacing-induced heart failure, *Journal of Cardiac Failure*, 2:127-132;
- Moe GW, Stopps TP, Angus C, Forster C, De Bold AJ, Armstrong PW** (1989) Alterations in serum sodium in relation to atrial natriuretic factor and other neuroendocrine variables in experimental pacing-induced heart failure, *Journal of the American College of Cardiology*, 13:173-179;
- Moe GW, Stopps TP, Howard RJ, Armstrong PW** (1988) Early recovery from heart failure: insights into the pathogenesis of experimental chronic pacing-induced heart failure, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 112:426-432;
- Musil LS, Goodenough DA** (1993) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER, *Cell*, 74:1065-1077;

- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA** (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure, *The New England Journal of Medicine*, 335:1182-1185;
- O'Brien PJ, Duke AL, Shen H, Shohet RV** (1995) Myocardial mRNA content and stability, and enzyme activities of Ca-cycling and aerobic metabolism in canine dilated cardiomyopathies, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 142:139-150;
- O'Brien PJ, Ianuzzo CD, Moe GW, Stopps TP, Armstrong PW** (1990) Rapid ventricular pacing of dogs to heart failure: biochemical and physiological studies, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68:34-39;
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P** (1997) Apoptosis in the failing human heart, *New England Journal of Medicine*, 336:1131-1141;
- Packer M** (1995) Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure?, *Circulation*, 92:1379-1382;
- Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG** (2000) Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking, *Journal of Cell Science*, 113:3037-3049;
- Perreault CL, Shannon RP, Komamura K, Vatner SF, Morgan JP** (1992) Abnormalities in intracellular calcium regulation and contractile function in myocardium from dogs with pacing-induced heart failure, *Journal of Clinical Investigation*, 89:932-938;
- Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL** (1997) Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia, *Circulation*, 95:988-996;
- Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ** (1993) Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts, *Circulation*, 88:864-875;

- Petrich BG, Gong X, Lerner DL, Wang X, Brown JH, Saffitz JE, Wang Y** (2002) c-Jun N-terminal kinase activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocytes, *Circulation Research*, 91:640-647;
- Pfeifer I, Anderson C, Werner R, Oltra E** (2004) Redefining the structure of the mouse connexin43 gene: selective promoter usage and alternative splicing mechanisms yield transcripts with different translational efficiencies, *Nucleic Acids Research*, 32: 4550-4562;
- Piechocki MP, Burk RD, Ruch RJ** (1999) Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells, *Carcinogenesis*, 20:401-406;
- Pu J, Boyden PA** (1997) Alterations of Na⁺ currents in myocytes from epicardial border zone of the infarcted heart. A possible ionic mechanism for reduced excitability and postrepolarization refractoriness, *Circulation Research*, 81: 110-119;
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J** (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43, *Science*, 267:1831-1834;
- Riegger AJ, Liebau G** (1982) The renin-angiotensin-aldosterone system, antidiuretic hormone and sympathetic nerve activity in an experimental model of congestive heart failure in the dog, *Clinical Science*, 62:465-469;
- Saez J C, Retamal M A, Basilio D, Bukauskas F F, Bennett M V L** (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711:215-224;
- Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA** (1999) Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias, *Cardiovascular Research*; 42:309-317;
- Schiavi A, Hudder, Werner R** (1999) Connexin43 mRNA contains a functional internal ribosome entry site, *FEBS Letters*, 464:118-122;
- Schulz R, Heusch G** (2004) Connexin 43 and ischemic preconditioning, *Cardiovascular Research*, 62:335-344;
- Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG** (1996) Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy, *Heart*, 76:412-417;

- Severs NJ** (2002) Gap junction remodeling in heart failure, *Journal of Cardiac Failure*, 8:S293-S299;
- Shannon RP, Komamura K, Shen YT, Bishop SP, Vatner SF** (1993) Impaired regional subendocardial coronary flow reserve in conscious dogs with pacing-induced heart failure, *American Journal of Physiology*, 265:H801-H809;
- Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ** (1991) Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy, *American Journal of Pathology*, 139:801-821;
- Solan JL, Lampe PD** (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711:154-163;
- Spach MS, Heidlage JF, Barr R.**(2004) Cell size and communication: Role in structural and electrical development and remodeling of the heart. *Heart Rhythm* 4: 500-515.
- Spach MS, Heidlage JF, Dolber PC, Barr RC** (2000) Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth, *Circulation Research*, 86:302-311;
- Spinale FG, Tomita M, Zellner JL, Cook JC, Crawford FA, Zile MR** (1991) Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia, *American Journal of Physiology*, 261:H308-H318;
- Spinale FG, Fulbright BM, Mukherjee R, Tanaka R, Hu J, Crawford FA, Zile MR** (1992) Relation between ventricular and myocyte function with tachycardia-induced cardiomyopathy, *Circulation Research*, 71:174-187;
- Spinale FG, Grine RC, Tempel GE, Crawford FA, Zile MR** (1992) Alterations in the myocardial capillary vasculature accompany tachycardia-induced cardiomyopathy, *Basic Research in Cardiology*, 87:65-79;
- Spinale FG, Tempel GE, Mukherjee R, Eble DM, Brown R, Vacchiano CA, Zile MR** (1994) Cellular and molecular alterations in the beta adrenergic system with cardiomyopathy induced by tachycardia, *Cardiovascular Research*, 28:1243-1250;
- Sullivan R, Huang GY, Meyer RA, Wessels A, Linask KK, Lo CW** (1998) Heart malformations in transgenic mice exhibiting dominant negative inhibition of gap

junctional communication in neural crest cells, *Developmental Biology*, 204:224-234;

- Teunissen BEJ, Jansen AT, van Amersfoort CM, O'Brien TX, Jongsma HJ, Bierhuizen MFA** (2003) Analysis of the rat connexin43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes, *Gene*, 322:123-136;
- Teunissen B E J, Jongsma H J, Bierhuizen M F A** (2004) Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodelling, *European Heart Journal*, 25:1979-1989;
- Teunissen B E J, Bierhuizen M F A** (2004) Transcriptional control of myocardial connexins, *Cardiovascular Research*, 62: 246-255;
- Thomas SP, Kucera JP, Bircher-Lehmann L, Rudy Y, Saffitz JE, Kléber AG** (2003) Impulse propagation in synthetic strands of neonatal cardiac myocytes with genetically reduced levels of connexin 43. *Circulation Research*, 92: 1209-1216.
- Ursell PC, Gardner PI, Albala A, Fenoglio JJ Jr, Wit AL** (1985) Structural and electrophysiological changes in the epicardial border zone of canine myocardial infarcts during infarct healing. *Circulation Research*, 56: 436-451.
- Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I** (2000) Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension, *Circulation Research*, 86:871-878;
- van der Heyden MA, Rook MB, Hermans MM, Rijksen G, Boonstra J, Defize LH, Destree OH** (1998) Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling, *Journal of Cell Science*, 111:1741-1749;
- van Rijen HVM, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JMT** (2004) Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation*, 109: 1048-1055.
- Veenstra RD, Wang HZ, Beblo DA, Chilton MG, Harris AL, Beyer EC, Brink PR** (1995) Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance, *Circulation Research*, 77:1156-1165;
- Wang HY, Malbon CC** (2004) Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:69-75;

- Wang X, Gerdes AM** (1999) Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31:333-343;
- Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF** (1996) Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein, *Journal of Biological Chemistry*, 271:3779-3786;
- Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW** (1990) Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle, *Circulation*, 82:1387-1401;
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG** (1994) Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light, *Basic Research in Cardiology*, 89:397-410;
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G** (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome, *Biological Chemistry*, 383:725-737;
- Wolff MR, Whitesell LF, Moss RL** (1995) Calcium sensitivity of isometric tension is increased in canine experimental heart failure, *Circulation Research*, 76:781-789;
- Yamamoto S, Tsutsui H, Tagawa H, Saito K, Takahashi M, Tada H, Yamamoto M, Katoh M, Egashira K, Takeshita A** (1997) Role of myocyte nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness in heart failure, *Circulation*, 95:1111-1114;
- Yu W, Dahl G, Werner R** (1994) The connexin43 gene is responsive to oestrogen, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 255:125-132;.