

Université de Montréal

**Remodelages électriques et structuraux prédisposant à la fibrillation  
auriculaire dans un modèle murin de surexpression du récepteur de type 1 à  
l'angiotensine II**

Par Julie Demers

Université de Montréal

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en sciences pharmaceutiques

option pharmacologie

Juin 2021

©Julie Demers, 2021

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
Remodelages électriques et structurels prédisposant à la fibrillation auriculaire dans un modèle  
murin de surexpression du récepteur de type 1 à l'angiotensine II

présenté par :  
Julie Demers

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Gaétan Mayer, président-rapporteur  
Dre Céline Fiset, directrice de recherche  
Dr Angelo Calderone, membre du jury

## RÉSUMÉ

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie cardiaque soutenue la plus fréquente et elle peut mener à des conséquences médicales sévères, comme les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Des remodelages électrophysiologiques, c'est-à-dire dans les courants ioniques, ainsi que des remodelages structurels, comme l'hypertrophie et la fibrose, ont été associés avec la fibrillation auriculaire. Ces remodelages peuvent affecter la conduction auriculaire, augmentant les risques de fibrillation auriculaire.

Plusieurs facteurs de risque ont été associés avec la fibrillation auriculaire, parmi ceux-ci, on compte les niveaux élevés d'angiotensine II. L'angiotensine II est l'effecteur principal du système rénine-angiotensine (SRA) et ses effets néfastes sont médiés par le récepteur de type I à l'angiotensine II (AT1R). La suractivation du SRA, par l'action d'AT1R peut entraîner, entre autres, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, ainsi que des arythmies, comme la fibrillation auriculaire. Cependant, les mécanismes par lesquelles l'angiotensine II affectent directement le cœur et prédisposent à la fibrillation auriculaire sont encore peu connus.

L'objectif de ce projet de recherche consiste à étudier les remodelages électriques et structurels chez des souris transgéniques surexprimant le récepteur AT1 de manière cardiomyocyte-spécifique. Ces souris, nommées souris AT1R, permettent de voir l'effet de la suractivation du SRA uniquement au niveau cardiaque, sans modification hémodynamique. Les souris AT1R ont été utilisés à deux âges afin de distinguer les effets directs d'AT1R sur l'électrophysiologie auriculaire (50 jours), de ceux induit par la présence de remodelage structurel (6 mois). Ceci a été validé par la quantification de la fibrose auriculaire par marquage histologique de type rouge Sirius. L'utilisation des deux groupes est importante puisque la fibrose est connue pour affecter l'électrophysiologie cardiaque et altérer la conduction auriculaire.

L'hypothèse de ce projet de recherche est que la surexpression d'AT1R induit un remodelage électrique auriculaire qui altère la conduction et mène au développement de fibrillation auriculaire. La présence de remodelage structurel amplifierait ces effets néfastes, favorisant davantage la survenue de fibrillation auriculaire.

Les données obtenues montrent une diminution du courant sodique d'environ 60% comparativement aux souris contrôles (CTL) dès l'âge de 50 jours. Cette diminution est associée

avec une augmentation de l'expression protéique sarcolemmale de la PKC $\alpha$ , une protéine kinase capable de phosphoryler le canal Na<sub>v</sub>1.5 menant à la réduction du courant sodique. L'expression génique du canal Na<sub>v</sub>1.5 (encodé par le gène Scn5a) n'était pas modifiée à 50 jours, suggérant une absence de régulation transcriptionnel pour ce canal. De plus, une diminution de l'expression génique des connexines 40 et 43 a été observée chez les souris AT1R dès 50 jours. Une prolongation de la durée de l'onde P, qui correspond au temps nécessaire à la dépolarisation des oreillettes, est observée à 50 jours sur les électrocardiogrammes des souris AT1R par rapport aux CTL. À 6 mois, la présence de remodelage structurel n'aggrave pas les remodelages au niveau du courant sodique et des connexines, mais prolonge encore davantage la durée de l'onde P. La susceptibilité à la fibrillation auriculaire est légèrement augmentée à 50 jours et nettement plus à 6 mois.

En conclusion, la surexpression d'AT1R induit directement des remodelages électriques qui affectent la conduction dans l'oreillette, et ce indépendamment de la présence de remodelage structurel. Le remodelage structurel affecte la conduction auriculaire, mais n'amplifie pas les altérations du courant sodique et des connexines observées dans ce projet. Ainsi, ce projet apporte des connaissances sur les mécanismes par lesquels l'angiotensine II peut altérer la conduction auriculaire et mener à la fibrillation auriculaire, indépendamment des effets hémodynamiques.

**Mots-clés :** angiotensine II, récepteur de type I à l'angiotensine II, fibrillation auriculaire, conduction, courant sodique, connexines, oreillettes

## ABSTRACT

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia and is associated with an increased risk of strokes and other morbidities. Atrial fibrillation has been associated with ionic currents remodeling, as well as structural remodeling, such as fibrosis and hypertrophy. These atrial remodeling can slow down atrial conduction velocity increasing the risk of atrial fibrillation.

Several risk factors have been associated with atrial fibrillation and elevated levels of angiotensin II are one of them. Angiotensin II is the primary effector of the renin-angiotensin system (RAS). Angiotensin II type 1 receptors (AT1R) are responsible for the several pathologies induced by RAS overactivity, such as hypertension, heart failure and atrial fibrillation. However, the direct effects of angiotensin II on the heart and its role in atrial fibrillation pathophysiology remain largely unexplored.

The objective of this research project is to study electrical and structural remodeling in transgenic mice overexpressing AT1R specifically in cardiomyocytes. These mice, identified as AT1R mice, do not have hemodynamic changes and are therefore suitable for studying the direct effect of RAS overactivation on the heart. Two age groups were used to distinguish the direct effects of AT1R on atrial electrophysiology (50-day-old mice) from those induced by structural remodeling (6-month-old mice). The presence of atrial fibrosis solely in 6 months old AT1R mice was confirmed using Picrosirius Red histological method. Characterizing electrical remodeling with and without structural remodeling is important since fibrosis is known to modulate cardiac electrophysiology and impair atrial conduction.

The hypothesis of this project is that AT1R overexpression induces atrial electrical remodeling which alters conduction, leading to atrial fibrillation. Structural remodeling is expected to worsen conduction defects, further increasing the risk of atrial fibrillation.

In this project, we measured an approximately 60% decrease in sodium current in 50 days old AT1R mice compared to controls (CTL). This change in sodium current was associated with an increase of PKC $\alpha$  protein expression in the sarcolemmal fraction. PKC $\alpha$  is a protein kinase able to phosphorylate Na<sub>v</sub>1.5 channels, resulting in a decrease in its function. *Scn5a* gene expression, encoding for Na<sub>v</sub>1.5 channels, was not changed at 50 days, suggesting an absence of transcriptional regulation of the sodium current. Moreover, a decrease in connexins 40 and 43 gene expression

was observed in AT1R mice from the age of 50 days. Accordingly, a prolongation in P wave duration, which corresponds to atrial depolarization, is observed at 50 days in AT1R mice compared to CTL. At 6 months, structural remodeling did not worsen the reduction in sodium current or connexins induced by AT1R overexpression but was associated with a further prolongation of P wave duration. Susceptibility to AF was slightly increased in 50 days old AT1R mice and even more at 6 months.

In conclusion, AT1R overexpression directly induces electrical remodeling, which slows down atrial conduction, independently of structural remodeling. Structural remodeling further alters atrial conduction without changes in sodium current or connexins expression. This project provides knowledge on mechanisms by which angiotensin II alters atrial conduction and leads to atrial fibrillation, even in absence of angiotensin II-induced hemodynamic changes.

**Key words:** angiotensin II, angiotensin II type I receptor, atrial fibrillation, conduction, sodium current, connexins, atrium

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xiii
REMERCIEMENTS .....	xvii
1. INTRODUCTION.....	18
1.1 La fibrillation auriculaire .....	18
1.1.1 Épidémiologie.....	18
1.1.2 Diagnostique et types de fibrillation auriculaire.....	18
1.1.3 Risques associés à la fibrillation auriculaire.....	20
1.1.4 Facteurs de risque de la fibrillation auriculaire.....	21
1.2 Mécanismes de la fibrillation auriculaire.....	22
1.2.1 La réentrée .....	22
1.2.2 Remodelage structurel auriculaire .....	24
1.2.2.1 Hypertrophie.....	25
1.2.2.2 Fibrose.....	25
1.2.2.3 Disques intercalaires .....	28
1.2.3 Remodelage électrique auriculaire.....	31
1.2.3.1 Le potentiel d'action auriculaire .....	31
1.2.3.1.1 Rôle du courant sodique dans la conduction électrique auriculaire .....	33
1.2.3.1.2 Régulation du courant sodique auriculaire .....	33

1.3 Gestion thérapeutique de la fibrillation auriculaire.....	36
1.4 Le système rénine-angiotensine .....	37
1.4.1 Les récepteurs de l'angiotensine II .....	37
1.5 Implication du système rénine-angiotensine dans la fibrillation auriculaire .....	41
1.5.1 Bloqueurs du système rénine-angiotensine pour traiter la fibrillation auriculaire.....	41
1.6 Modèle expérimental de souris transgéniques pour étudier la fibrillation auriculaire.....	42
1.6.1 La souris comme modèle pour la fibrillation auriculaire.....	44
1.7 Mise en contexte .....	45
1.8 Hypothèse.....	46
1.9 Objectifs .....	46
1.10 Présentation de l'article.....	47
2. ARTICLE .....	48
3. DISCUSSION .....	82
3.1 Résumé des principaux résultats .....	82
3.2 Développement de la fibrose chez les souris AT1R .....	83
3.3 Régulation du courant sodique auriculaire.....	87
3.4 Impacts de la surexpression d'AT1R sur les connexines.....	90
3.4.1 Contribution des connexines dans la conduction auriculaire menant à la fibrillation auriculaire .....	91
3.4.2 Modulation de l'expression des connexines par le SRA .....	93
3.5 Régulation des courants ioniques selon les chambres cardiaques .....	95
3.6 Comparaison des modèles expérimentaux d'angiotensine II.....	96
3.7 Limites de l'étude.....	98
3.7.1 Reproduction des souris AT1R.....	98
3.7.2 Difficultés techniques .....	98



3.7.2.1 Western Blot sur fraction sarcolemmale .....	98
3.7.2.2 Stimulations électrophysiologiques programmées (EPS) .....	99
3.8 Perspectives du projet .....	100
3.8.1 Comparaison des remodelages auriculaires entre les souris mâles et les femelles induits par la surexpression d'AT1R .....	100
5. BIBLIOGRAPHIE .....	102
6. ANNEXES .....	119
Annexe 1 : Liste des gènes impliqués dans la fibrose.....	119
Annexe 2 : Résultats de qPCR des gènes impliqués dans la formation de fibrose .....	120
Annexe 3 : Projet sur l'expression de la connexine 43 dans les ventricules de souris AT1R.....	121
Annexe 3.1 : L'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire.....	122
Annexe 4 : Expression génique et protéique de la connexine 43 dans les ventricules des souris AT1R mâles et femelles. ....	124
Annexe 5 : Interrelation entre la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire et de l'insuffisance cardiaque .....	125
Annexe 6 : Curriculum vitae abrégé .....	126

**LISTE DES TABLEAUX**

ANNEXE

Annexe 1 : Liste des gènes impliqués dans la fibrose.....119

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1 : Propagation de l'influx électrique cardiaque et paramètres de l'électrocardiogramme de surface .....	19
Figure 2 : Facteurs de risque multiples de la fibrillation auriculaire .....	21
Figure 3 : Formation d'une réentrée.....	22
Figure 4 : Résumé des principaux mécanismes de la fibrillation auriculaire.....	23
Figure 5 : Représentation simplifiée de la formation de la fibrose .....	26
Figure 6 : Altération de la conduction électrique par les myofibroblastes.....	27
Figure 7 : Structure et localisation des isoformes des connexines cardiaques.....	29
Figure 8 : Potentiel d'action auriculaire par phase.....	32
Figure 9 : Diminution de la durée du potentiel d'action induite par les courants calciques et potassiques .....	35
Figure 10 : Synthèse et effets de l'angiotensine II par le récepteur AT1 .....	38
Figure 11 : Simplification de la signalisation du récepteur AT1 .....	40

### DISCUSSION

Figure 12 : Simplification des mécanismes proposés du développement de fibrose à 50 jours et 6 mois basés sur les résultats de qPCR (présentés en Annexe 2).....	85
Figure 13 : Impact de l'angiotensine II (ANGII) et d'un peptide inhibiteur de la translocation de la PKC $\alpha$ ( $\alpha$ V5-3) sur le courant sodique de cellules hiPSC-CM.....	89

### ANNEXES

Annexe 2 : Résultats de qPCR des gènes impliqués dans la formation de fibrose .....	120
Annexe 4 : Expression génique et protéique de la connexine 43 dans les ventricules des souris AT1R mâles et femelles. ....	124
Annexe 5 : Interrelation entre la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire et de l'insuffisance cardiaque .....	125

## FIGURES DE L'ARTICLE

Figure 1. Structural remodeling is only present in 6m AT1R mice .....	72
Figure 2. Electrophysiological properties of $I_{Na}$ in left atrial myocytes of AT1R and CTL mice .	73
Figure 3. AT1R overexpression does not affect sodium channel expression, but increases PKC $\alpha$ sarcolemmal protein expression .....	74
Figure 4. $I_{CaL}$ density and Cacna1 mRNA expression are reduced only by hypertrophy .....	75
Figure 5. $K^+$ currents in left atrial myocytes of CTL and AT1R mice.....	76
Figure 6. Cx40 mRNA and protein expression is reduced to similar extent in AT1R mice of both age groups but Cx43 protein expression is not affected.....	77
Figure 7. Alteration of ECG and AP parameters related to atrial conduction in 50d and 6m CTL and AT1R mice .....	78
Figure 8. AT1R overexpression tends to favor AF vulnerability.....	79

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ANGI : angiotensine I

ANGII : angiotensine II

ANP : facteur natriurétique auriculaire (*atrial natriuretic peptide*)

APD : durée du potentiel d'action

ARA : antagonistes des récepteurs AT1

ARNm : acide ribonucléique messenger

AT1R : récepteur de type 1 à l'angiotensine II

AT2R : récepteur de type II à l'angiotensine II

AV: atrio-ventriculaire

AVC : accident vasculaire cérébral

Ca<sup>2+</sup> : ion calcium

Col1a1 : gène du collagène 1

Col3a1 : gène du collagène 3

CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif (*connective tissue growth factor*)

CTL : souris contrôle de lignée AT1R

Cx : connexines

DAG : diacylglycérol

ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine II

ECG : électrocardiogramme

eNOS : oxyde nitrique synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*)

EPS : protocoles de stimulations électrophysiologiques (*electrophysiological programmed stimulations*)

ERK : kinase régulée par un signal extracellulaire (*extracellular signal-regulated kinases*)

FA : fibrillation auriculaire

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

hiPSC-CM : cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (*human induced pluripotent stem cells derived in cardiomyocytes*)

$I_{CaL}$  : canaux calciques de type L

iECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II

$I_{K1}$  : courant potassique à rectification entrante

$I_{KAch}$  : courant potassique dépendant de l'acétylcholine

$I_{Kr}$  : composante rapide du courant potassique à rectification retardée

$I_{Ks}$  : composante lente du courant potassique à rectification retardée

$I_{Kur}$  : courant potassique ultra-rapide à rectification retardée

$I_{Na}$  : courant sodique

IP3 : inositol triphosphate

$I_{to}$  : courant potassique transitoire sortant indépendant du calcium

$K^+$  : ion potassium

kDa : kilo dalton

MAPK ou MAP kinase : protéines kinases activées par le mitogène (*Mitogen-activated protein kinases*)

MMP : métalloprotéase

ms : milliseconde

mV: millivolt

$Na^+$  : ion sodium

Nav1.5 : sous-unité  $\alpha$  du canal sodique cardiaque

NCX: échangeur sodium-calcium

pA : picoampère

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

pF : picofarad

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PKC $\alpha$  : protéine kinase C alpha

PKC $\epsilon$  : protéine kinase C epsilon

PLC : phospholipase C

PMA : *phorbol 12-myristate 13-acetate*, composée activant les PKC

qPCR : réaction en chaîne polymérase quantitative (*quantitative polymerase chain reaction*)

QTc : intervalle QT corrigé pour la fréquence cardiaque

RGS : protéine régulatrice de la signalisation des protéines G

RSN : rythme sinusal normal

Scn5a : gène codant pour le canal Nav1.5

SRA : système rénine-angiotensine

TGF $\beta$  : facteur de croissance transformant bêta

TIMP : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases

$\mu$ g : microgramme

V<sub>max</sub> : vitesse maximale de la montée du potentiel d'action

$\alpha$ -MHC : myosine à chaîne lourde (*alpha-myosine heavy chain*)

$\alpha$ V5-3 : peptide inhibiteur de la translocation de PKC $\alpha$

*Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui m'ont encouragée à  
atteindre mes objectifs.*



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Dre Fiset pour m'avoir permis de découvrir le milieu de la recherche fondamentale. Dès mon premier stage d'été dans son laboratoire, l'enthousiasme contagieux de Céline pour la recherche m'a motivée et encouragée dans cette voie. Dans son laboratoire, j'ai eu l'occasion d'acquérir des compétences techniques et théoriques. À ma surprise, je ressors de cette aventure avec beaucoup plus que des connaissances scientifiques. En effet, Céline a su me guider et à ses côtés, j'ai développé une confiance en moi, une autonomie et une patience que je ne croyais pas possible. Ces nouvelles aptitudes m'aideront à relever les défis qui se présenteront à moi et me permettront de continuer à viser plus haut que les attentes. Merci Céline pour votre grande disponibilité, votre soutien et surtout pour votre implication dans la réussite de vos étudiants.

Pendant mes années dans le laboratoire de Dre Fiset, j'ai côtoyé des personnes motivées et compétentes qui m'ont beaucoup aidée dans la réalisation de mon projet. J'aimerais spécialement remercier Simon Thibault qui m'a prise sous son aile lors de mes stages au laboratoire. Sa curiosité scientifique est remarquable et avec son aide, j'ai pu commencer ma maîtrise avec confiance et autonomie. Également, un merci particulier à Valérie Long qui m'a épaulée, guidée et rassurée pendant ces années, ainsi qu'à Amélie Bourget pour son aide précieuse et pour avoir partagé son expérience technique avec moi. J'aimerais aussi mentionner toutes les personnes que j'ai côtoyées au fil du temps dans le laboratoire et avec qui il a été agréable de travailler, dont Maxime Lorenzini, Nathalie Éthier, Édouard Marcoux, Clara Girard, Anne-Sophie Otis, Samuel Cyr et Béatrice Motok.

J'aimerais aussi souligner l'apport de Marie-Élaine Clavet, Louis Villeneuve, Dr Patrice Naud et Marc-Antoine Gillis pour leur soutien technique et leurs conseils. Un merci spécial aux membres de mon comité de parrainage, Dre Catherine Martel et Dr Simon-Pierre Gravel, pour vos commentaires et vos conseils. J'aimerais aussi remercier Dr Gaétan Mayer et Dr Angelo Calderone, qui ont accepté de faire partie de mon comité évaluateur de mémoire.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille et mes amis pour leur soutien et leur encouragement tout au long de ce cheminement. J'aimerais particulièrement remercier mes parents de leur support constant et pour m'avoir toujours encouragée à poursuivre dans la voie qui me motivait.

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 La fibrillation auriculaire

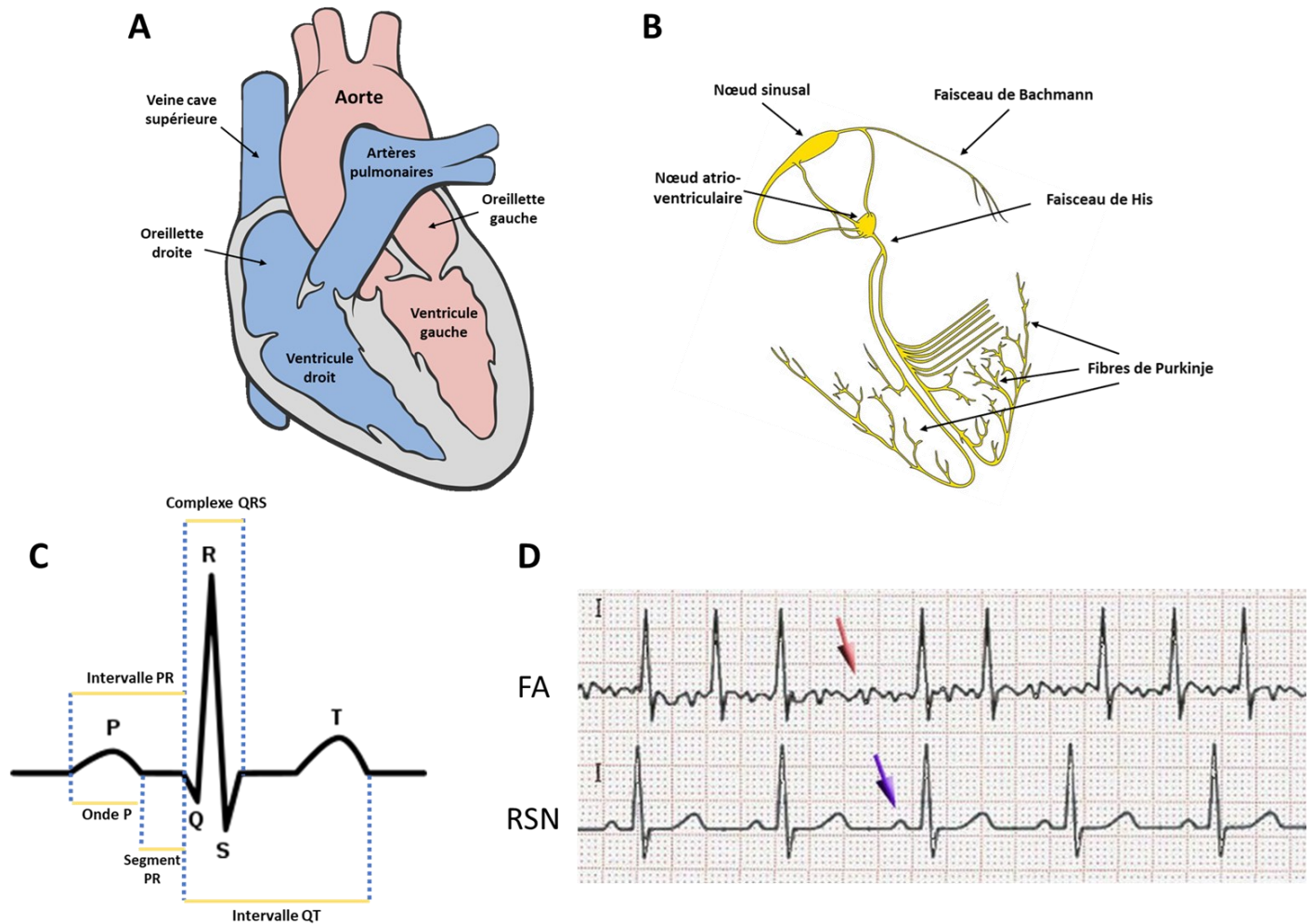
#### 1.1.1 Épidémiologie

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie cardiaque soutenue la plus fréquemment observée en clinique, touchant plus de 1% de la population, soit environ 500 000 canadiens.(1) La prévalence de cette arythmie est inférieure à 1% chez les personnes âgées de moins de 40 ans, mais augmente rapidement avec l'âge pour atteindre une prévalence allant de 10% à 17% chez les personnes de 80 ans.(1–3) Au Canada, 583 hospitalisations par 100 000 individus sont reliées à la fibrillation auriculaire, apportant un fardeau économique annuel d'environ 900 millions de dollars canadiens.(1,4) Il est à noter que la prévalence réelle de cette arythmie est estimée être substantiellement plus grande puisque seuls les cas de fibrillation auriculaire diagnostiqués par électrocardiogrammes (ECG) sont rapportés. Ainsi, en incluant les cas de fibrillation auriculaire paroxysmale qui sont souvent peu diagnostiqués, la prévalence est estimée à près d'un million de canadiens.(1)

#### 1.1.2 Diagnostique et types de fibrillation auriculaire

Bien qu'une certaine portion des patients soit asymptomatique, les principaux signes cliniques de la fibrillation auriculaire sont les palpitations, la dyspnée, la fatigue, l'angine ou l'accident vasculaire cérébral.(1) Un ECG de surface, qui recueille l'activité électrique du cœur à l'aide d'électrodes apposées sur la peau du patient, est nécessaire pour diagnostiquer la fibrillation auriculaire et évaluer la fréquence des épisodes ainsi que leurs durées.

Sur un enregistrement d'ECG de surface, l'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes et elle est suivie d'un complexe QRS, qui correspond à la dépolarisation des ventricules (**Figure 1A-C**). En présence de fibrillation auriculaire, l'ECG montre une perte de l'onde P et des QRS irréguliers, correspondant à un rythme ventriculaire désordonné (**Figure 1D**). L'activité électrique désorganisée empêche les contractions efficaces des oreillettes nuisant donc à l'éjection du sang vers les ventricules. Ce phénomène favorise la survenue d'événements thrombotiques.



**Figure 1 : Propagation de l'influx électrique cardiaque et paramètres de l'électrocardiogramme de surface**

Représentation simplifiée de la structure du cœur (A) et du système de conduction cardiaque (B). Brièvement, l'influx électrique est généré au niveau du nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite. L'influx électrique dépolarise l'oreillette droite, ainsi que l'oreillette gauche, grâce à son passage par le faisceau de Bachmann. L'influx se rend ensuite au nœud atrio-ventriculaire, puis passe à travers les faisceaux de His et dans les fibres de Purkinje pour dépolariser les ventricules. (C) Paramètres d'ECG de surface. L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes. Le segment PR montre le temps nécessaire à l'influx électrique pour traverser le nœud atrio-ventriculaire. L'intervalle PR est le temps nécessaire à l'influx électrique pour dépolariser les oreillettes jusqu'à son passage à travers le nœud atrio-ventriculaire. Le complexe QRS correspond à la dépolarisation des ventricules et l'intervalle QT à la repolarisation des ventricules. (D) Exemple d'ECG de surface normal (en bas) par rapport à un ECG en fibrillation auriculaire (en haut). En fibrillation auriculaire, l'onde P n'est plus visible et les complexes QRS sont à intervalle irrégulier. FA; fibrillation auriculaire, RSN; rythme sinusal normal (Figure adaptée de commons.wikimedia.org)

Il existe plusieurs formes de fibrillation auriculaire dont les principales sont la fibrillation auriculaire paroxysmale, persistante et permanente. La fibrillation auriculaire paroxysmale dure moins de 7 jours, se termine spontanément ou avec une intervention et elle est souvent définie comme un épisode de fibrillation auriculaire. La forme persistante dure entre 7 jours et un an, tandis que la permanente est non résolue après un an, même suite à une cardioversion.(1) La cardioversion est une technique qui consiste à administrer une petite décharge électrique au cœur afin de rétablir un rythme sinusal.

Une progression de la fibrillation auriculaire est souvent observée chez les patients en FA. Ceux-ci commencent généralement par souffrir de fibrillation auriculaire paroxysmale et qui avec le temps évolue en des épisodes plus longs et persistants, qui sont plus difficiles à traiter. Le phénomène de la FA qui induit la FA, décrit en 1995 par Wijffels, suggère que les épisodes de fibrillation auriculaire peuvent eux-mêmes altérer les propriétés des oreillettes, ajoutant ainsi aux substrats pro-arythmiques déjà présents chez le patient. Ces remodelages favorisent la stabilisation de l'arythmie, expliquant ainsi la durée plus longue des épisodes de fibrillation auriculaires subséquents.(5)

### **1.1.3 Risques associés à la fibrillation auriculaire**

Les patients souffrant de fibrillation auriculaire observent généralement une diminution de leur qualité de vie et sont plus à risque de morbidité et de mortalité. Bien que rarement mortelle en elle-même, la fibrillation auriculaire augmente d'environ cinq fois les risques d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) chez les patients non traités avec des anticoagulants et cette arythmie serait la cause de 20% de tous les AVC.(1,6) De plus, les AVC associés à la fibrillation auriculaire seraient généralement plus sévères et fréquents que les ceux de d'autres causes.(1) Comme mentionné précédemment, en fibrillation auriculaire, les oreillettes ont une activité électrique désorganisée qui réduit les contractions efficaces ce qui entraîne la stase du sang dans les oreillettes. Ceci augmente le risque de formation de caillots qui peuvent être expulsés dans la circulation sanguine causant des embolies, dont les AVC qui sont souvent associés avec une perte des habiletés, une diminution de la qualité de vie et qui peuvent être même mortel.

### 1.1.4 Facteurs de risque de la fibrillation auriculaire

Plusieurs facteurs de risque sont associés avec la fibrillation auriculaire (**Figure 2**). Parmi les principaux facteurs de risque intrinsèques, on retrouve notamment l'âge avancé et le sexe masculin. Cependant, plusieurs facteurs de risque modifiables contribuent aussi à augmenter les risques de fibrillation auriculaire. Parmi les risques modifiables, on retrouve l'obésité, le tabagisme, le diabète et l'hypertension. Spécifiquement, les patients hypertendus ont un risque 70% plus élevé de souffrir de FA que les normotendus.(7) Il est important de comprendre comment ce facteur de risque favorise la fibrillation auriculaire puisque plus d'une personne sur six souffre d'hypertension.(7) Cependant, les mécanismes responsables de l'arythmie sont parfois difficiles à identifier car les patients souffrent souvent de plusieurs facteurs de risque interreliés. Ainsi, le traitement des patients avec des thérapies personnalisées selon leurs risques spécifiques est difficile puisque les mécanismes de remodelage induits par chacun des facteurs de risque menant à la FA sont encore partiellement incompris.



**Figure 2 : Facteurs de risque multiples de la fibrillation auriculaire**

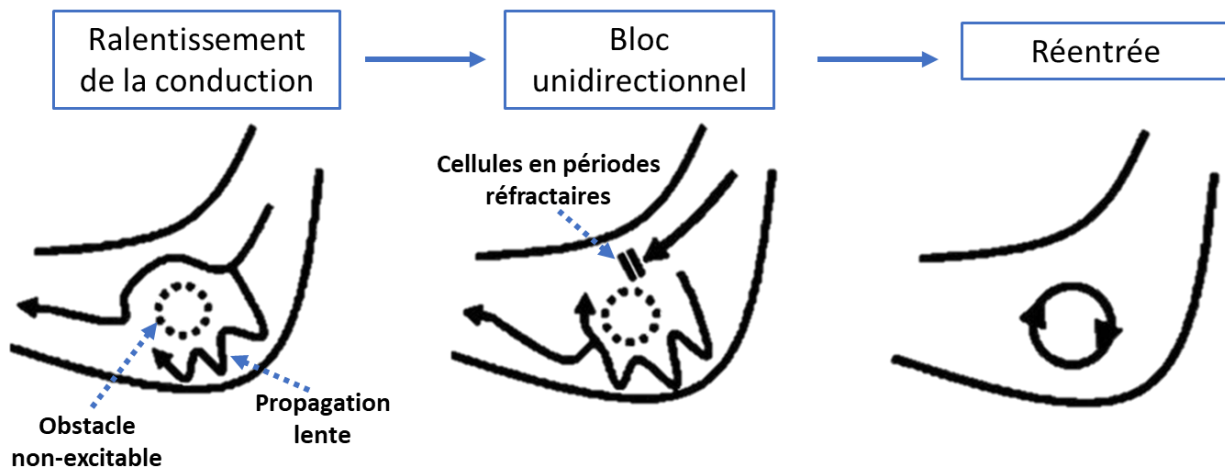
Les facteurs de risque favorisant le développement de la fibrillation auriculaire sont multiples et interreliés. Ainsi les causes sous-jacentes l'arythmie sont difficiles à traiter puisque les mécanismes reliant les différents

facteurs de risque à la fibrillation auriculaire ne sont pas tous connus. C'est pourquoi la principale avenue thérapeutique est actuellement symptomatique (voir **Section 1.3**). Les facteurs de risque de la fibrillation auriculaire peuvent être intrinsèques au patient ou modifiables.

## 1.2 Mécanismes de la fibrillation auriculaire

### 1.2.1 La réentrée

La réentrée est communément acceptée comme le principal mécanisme de la fibrillation auriculaire (**Figure 3**). Ce phénomène subvient lorsque l'onde de propagation de l'influx électrique rencontre plus d'une voie de conduction possible et que celles-ci ont des durées de périodes réfractaires distinctes.(8) Ainsi, l'onde de propagation va rencontrer un bloc unidirectionnel et initié une réentrée autour de l'obstacle physique non excitable, comme du tissu fibrosé ou autour de cellules encore en période réfractaire. La réentrée peut être maintenue si la vitesse de conduction est suffisamment lente pour ne pas redépolariser à nouveau les cellules encore en période réfractaire ou si les périodes réfractaires des cellules dans le circuit de réentrée sont raccourcis. La présence de plusieurs circuits de réentrées simultanées, induites par des altérations de l'oreillette, comme l'hypertrophie, la présence de fibrose ou des changements dans l'électrophysiologie auriculaire, favorise le maintien de la FA dans le temps.(9)

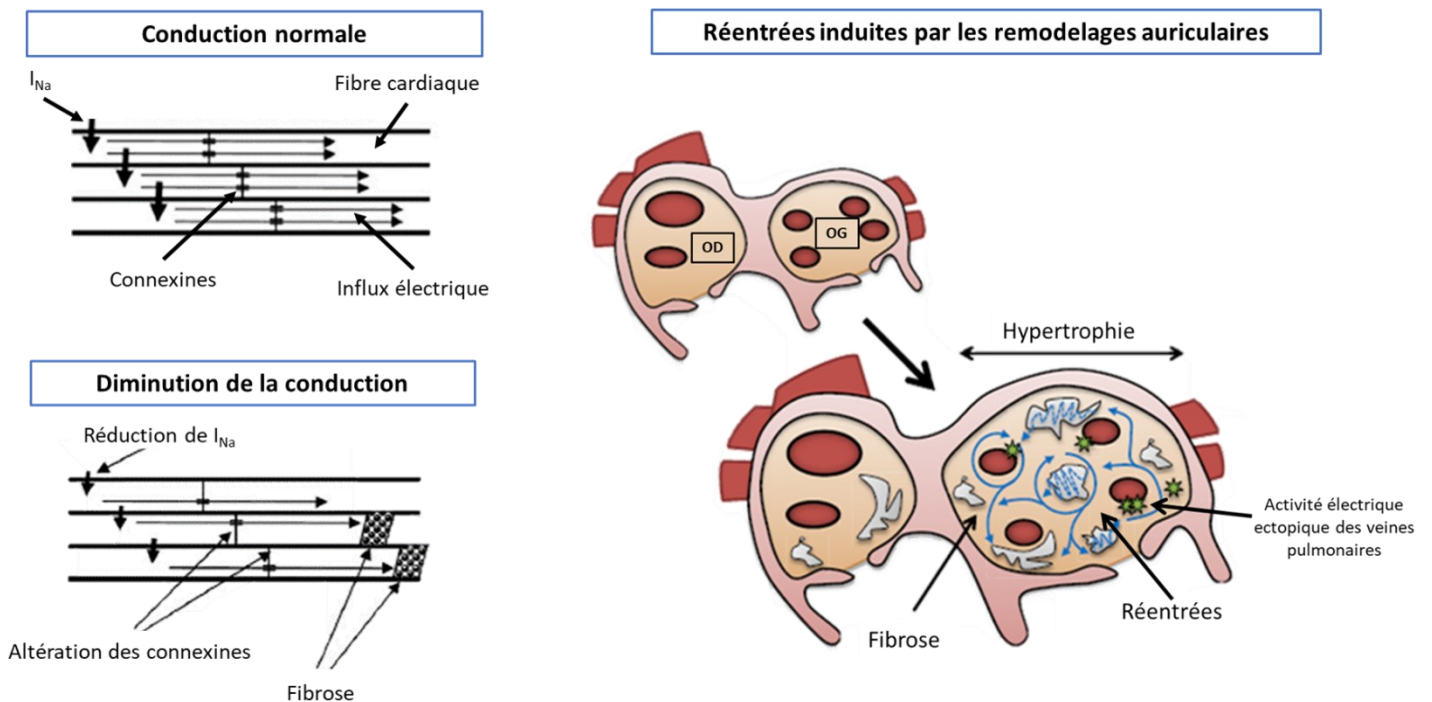


**Figure 3 : Formation d'une réentrée**

L'onde de propagation de l'influx électrique rencontre plus d'une voie possible de propagation qui mène au développement de circuits de réentrée. La réentrée est souvent engendrée par la présence de fibrose, qui est non-excitable. La variabilité dans les vitesses de conduction autour de l'obstacle, crée un bloc

unidirectionnel lorsque qu'une des ondes de propagation rencontre des cellules encore en périodes réfractaires, qui sont alors non-excitables. Ceci induit une réentrée où l'onde plus lente pourra ultimement dépolariser ces cellules qui sortiront de leur période réfractaire. (Figure adaptée de O'Grady et al. (10))

La fibrillation auriculaire est généralement associée avec des remodelages électriques et structurels importants des oreillettes. Ces remodelages peuvent ralentir la conduction électrique auriculaire et permettre l'initiation et le maintien de l'arythmie par des mécanismes de réentrées (**Figure 4**). (1) La vitesse de conduction électrique auriculaire correspond au temps nécessaire à l'influx électrique pour dépolariser les oreillettes. Sur un ECG, le ralentissement de la conduction électrique dans les oreillettes se traduit par une prolongation de la durée de l'onde P, souvent biphasique. (5)



**Figure 4 : Résumé des principaux mécanismes de la fibrillation auriculaire**

La conduction électrique intercellulaire se produit normalement de manière longitudinale. L'altération de certains paramètres électriques et structurels entraîne un ralentissement de la vitesse de conduction, entre autres la réduction du courant sodique, un remodelage des connexines et la présence d'hypertrophie et de fibrose. Ces altérations et la présence d'activités ectopiques peuvent initiées et stabilisées des circuits de réentrées dans les oreillettes. OD; oreillette droite, OG; oreillette gauche,  $I_{Na}$ ; courant sodique (Figure adaptée de Nattel, Burstein et Dobrev (8) et de Nattel et al.(11))

La conduction électrique auriculaire est anisotrope, c'est-à-dire qu'elle est dépendante de la direction de la propagation de l'influx électrique dans le tissu. En conditions normales, la propagation rapide de l'influx électrique entre les cellules adjacentes se fait de manière majoritairement longitudinale, c'est-à-dire dans le sens de la fibre cardiaque. La conduction transversale, donc perpendiculaire à la fibre cardiaque, est beaucoup plus lente et moins fréquente que la conduction longitudinale. Ainsi, la conduction électrique auriculaire normale est décrite comme étant une anisotropie uniforme, dû à la conduction principalement longitudinale et faiblement transversale.(12–15)

Cependant, des altérations structurelles et électriques peuvent induire une augmentation de la conduction transversale dans le tissu, au dépend de la conduction longitudinale, créant une anisotropie non-uniforme dans l'oreillette. Ce phénomène résulte en une diminution de la vitesse de conduction puisque la conduction transversale est plus lente que la conduction longitudinale et favorise la formation de courants de réentrée dans l'oreillette.(12–15)

L'oreillette gauche est considérée comme étant plus à risque d'initier la fibrillation auriculaire.(16) En effet, la jonction entre les veines pulmonaires et l'oreillette gauche constitue une région vulnérable à la génération d'activités électriques ectopiques et de courants de réentrée dans l'oreillette (**Figure 4**).(17,18) Certaines études ont rapporté une hétérogénéité dans la conduction électrique à cet endroit qui favorise les réentrées. En effet, une vitesse de conduction beaucoup plus lente à la jonction des veines pulmonaires par rapport avec le reste de l'oreillette gauche est observée.(17,18) De plus, l'automaticité des veines pulmonaires peut induire des foyers ectopiques qui altèrent l'activité électrique normale dans l'oreillette. Des remodelages auriculaires sont toutefois nécessaires pour maintenir les réentrées induites par ces foyers ectopiques, comme la fibrose, l'hypertrophie ou les changements dans les courants ioniques. Ainsi, l'oreillette gauche est associée à une susceptibilité plus grande au développement de la fibrillation auriculaire.

### **1.2.2 Remodelage structurel auriculaire**

Les principaux remodelages structurels associés à la fibrillation auriculaire sont la fibrose interstitielle et l'hypertrophie. Ces paramètres favorisent l'hétérogénéité de la conduction électrique dans l'oreillette, la rendant susceptible à l'initiation et au maintien de l'arythmie.



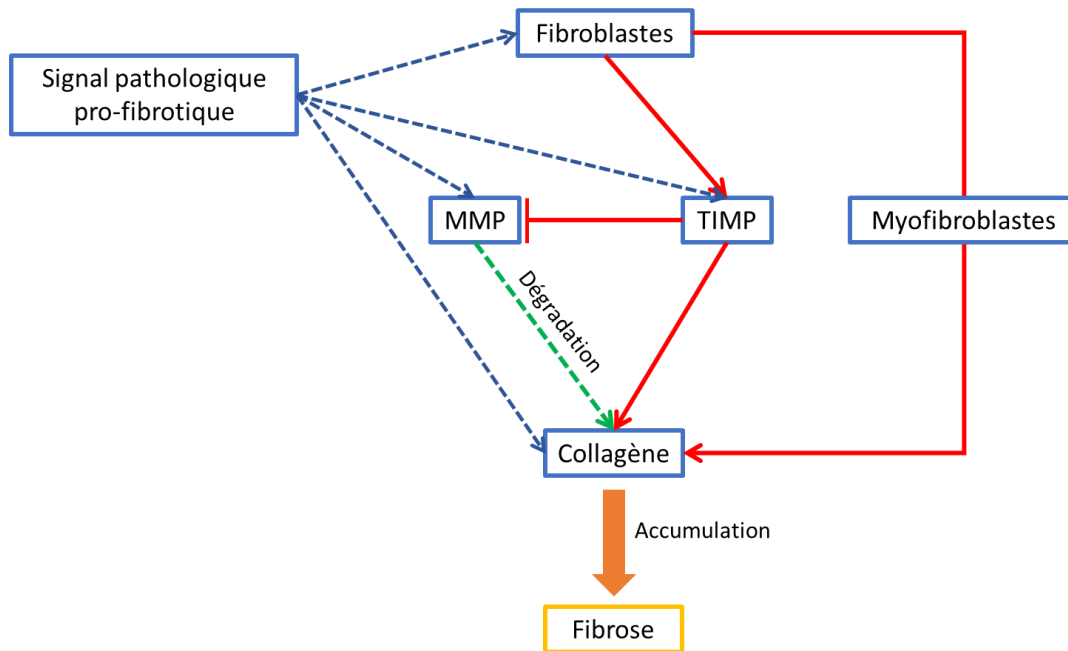
### 1.2.2.1 Hypertrophie

L'hypertrophie auriculaire est caractérisée par une augmentation anormale de la taille de l'oreillette et des cardiomyocytes, ainsi qu'avec une augmentation de certaines composantes tissulaires, dont la matrice extracellulaire. Au niveau de l'oreillette gauche, une surcharge de volume peut mener à l'hypertrophie auriculaire gauche qui augmente les risques d'événements cardiovasculaires, dont la fibrillation auriculaire et l'insuffisance cardiaque.(19) D'ailleurs, une augmentation de la taille de l'oreillette gauche est rapportée chez les patients souffrants de fibrillation auriculaire.(20) L'hypertrophie auriculaire favorise le développement de fibrillation auriculaire puisque le temps nécessaire à la dépolarisation du tissu est plus long, ce qui augmente les risques de réentrées. De plus, le risque d'induire de multiples circuits de réentrée, qui stabilisent la FA, est plus important lorsque la taille de l'oreillette est augmenté.(8)

### 1.2.2.2 Fibrose

En conditions normales, la matrice extracellulaire représente 75% de toutes les cellules cardiaques mais seulement 10 à 15% de la masse du myocarde.(21) La matrice extracellulaire est principalement constituée de collagène et de protéines régulatrices. Elle contient, entre autres, les fibroblastes qui sont une composante importante du myocarde, principalement pour le maintien de la structure tridimensionnelle du tissu. En conditions pathologiques, les fibroblastes prolifèrent et se différencient en myofibroblastes, qui sont des cellules mésenchymateuses participant à la réparation tissulaire pouvant produire des composantes de la matrice extracellulaire, dont les fibres de collagène.(22,23).

La fibrose interstitielle est décrite comme l'accumulation de collagène autour des cardiomyocytes par les myofibroblastes ou à un changement dans les protéines régulatrices de l'homéostasie de la matrice extracellulaire, soit principalement les métalloprotéases (MMP) et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) (**Figure 5**). Ces protéines s'assurent de la balance entre la production et la dégradation du collagène produit.(24) Plusieurs isoformes de ses protéines sont présentes dans le myocarde et leurs expressions et leur fonction peuvent être modulées par plusieurs cascades de signalisation pathologiques.

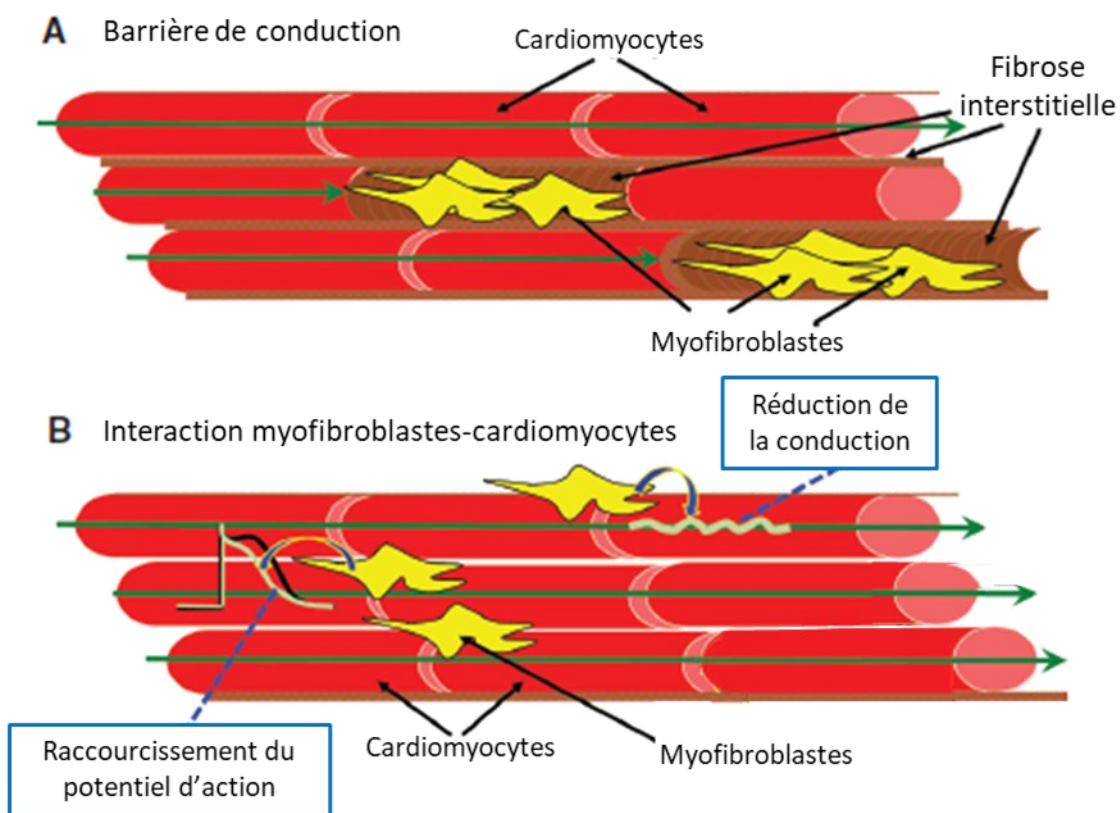


**Figure 5 : Représentation simplifiée de la formation de la fibrose**

Suite à un signal pathologique, l'homéostasie de la matrice extracellulaire est altérée. Les fibroblastes différenciés en myofibroblastes produisent du collagène et peuvent aussi modifier l'expression et l'activité des protéines régulatrices comme les MMPs et les TIMPs. La cascade de signalisation induite par la pathologie peut également cibler l'expression des MMPs, des TIMPs et même du collagène. En conditions normales, la matrice extracellulaire se renouvelle et les MMP/TIMP forment une balance dynamique qui équilibre la formation et la dégradation du collagène. Ainsi, les MMPs ont comme principale fonction de dégrader du collagène et les TIMPs inhibent l'activité des MMPs pour éviter une perte anormale de la matrice extracellulaire. Si le signal pathologique induit une augmentation de l'expression ou de l'activité des TIMP ou une diminution des MMPs, une accumulation de collagène mènera à des dépôts de fibrose. Sur le schéma, les flèches bleues indiquent l'induction des gènes par le signal pro-fibrotique. Les flèches en vert montrent une action menant à la dégradation du collagène et en rouge une action menant à l'accumulation du collagène. MMP; métalloprotéases, TIMP; inhibiteurs des métalloprotéases.

La fibrose interstitielle présente dans le myocarde altère la conduction en créant une barrière isolante entre les cellules ce qui augmente l'anisotropie non-uniforme et qui résulte en une diminution de la vitesse de conduction menant aux blocs pro-arythmiques.(11,22,25) À noter qu'une interaction entre les myofibroblastes et les cardiomyocytes peut aussi réduire la vitesse de conduction dans l'oreillette.(11,26,27) Bien qu'il s'agisse de cellules non-excitables, les

myofibroblastes ont une activité contractile puisque qu'elles expriment de l' $\alpha$ -actine ( *$\alpha$ -smooth muscle actin;  $\alpha$ -SMA*) ainsi que certains canaux ioniques à leur membrane.(11,23,26,27) En effet, les myofibroblastes ont un potentiel de repos plus dépolarisé que les cardiomyocytes et ils expriment des connexines à leur membrane. Ainsi, le couplage myofibroblaste-cardiomyocyte dépolarise le potentiel de repos membranaire des cardiomyocytes menant à l'inactivation de certains canaux ioniques, dont les canaux sodiques qui ont un rôle important dans la conduction électrique auriculaire. (27,28)



**Figure 6 : Altération de la conduction électrique par les myofibroblastes**

(A) Les myofibroblastes produisent la fibrose qui forme une barrière de conduction physique entre les cardiomyocytes. Cet obstacle non-excitabile empêche l'influx électrique de se propager de manière linéaire. (B) Les myofibroblastes peuvent influencer l'activité électrique des cardiomyocytes en modifiant la durée du potentiel d'action, le potentiel de repos membranaire et la vitesse de conduction. (Figure adaptée de Andrade et al. (29))

Plusieurs études montrent la présence de fibrose auriculaire chez les patients souffrants de fibrillation auriculaire.(15,25,30) D'ailleurs, des facteurs de risque de la fibrillation auriculaire, comme la suractivation du système rénine-angiotensine (SRA), peuvent mener à la formation de fibrose en activant des voies de signalisation pro-fibrotique. En effet, la voie des protéines kinases activées par le mitogène (MAP kinases) (11,21) et du facteur de croissance transformant bêta (TGF $\beta$ ) peuvent être induite, entre autres, par le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R) (23,31). Ainsi, l'implication de plusieurs voies de signalisation simultanées menant au développement de la fibrose est probable.(11)

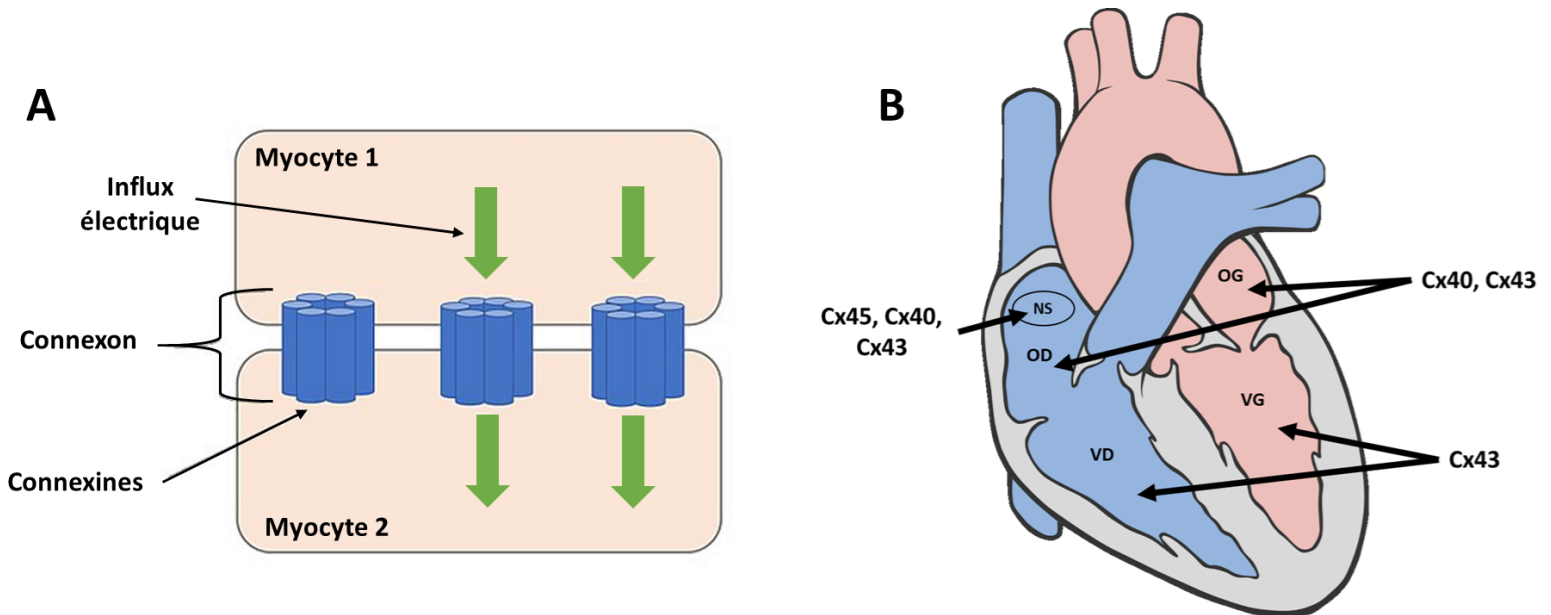
Par exemple, l'expression et l'activité de TGF $\beta$  peuvent être modulées autant par les cardiomyocytes que par les fibroblastes, en réponse à une suractivation du SRA. Le TGF $\beta$  mène à la différenciation des fibroblastes et induit la production de collagène, augmentant les risques de fibrillation auriculaire. Dans le contexte de l'angiotensine II, des modifications post-traductionnelles augmentent l'activité du TGF $\beta$ , menant au développement de la fibrose. Plus spécifiquement, l'activation d'AT1R mène à l'ubiquitination de Smad7, une protéine antagoniste du TGF $\beta$ .(32) Cette modification post-traductionnelle sur Smad7 permet de libérer TGF $\beta$  et ainsi augmenter son activité fibrotique. Simultanément, la suractivation du SRA peut aussi activer la voie des MAP kinases qui par l'action de DAG/IP3, contribue au remodelage structurel, notamment à la formation de fibrose (voir **Section 1.4.1**). Ainsi, plusieurs voies de signalisation pro-fibrotique peuvent contribuer au remodelage structurel et augmenter les risques de fibrillation auriculaire, en réponse à une suractivation du SRA.

Des études ont d'ailleurs démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (iECA) ou des antagonistes des récepteurs AT1 (ARA) retardait le développement de remodelage structurel et réduisait la stabilité de l'arythmie.(33,34) Cependant, il semblerait que l'efficacité des traitements de la fibrillation auriculaire qui vise le remodelage structurel dépendent du degré de remodelage structurel déjà établi et des autres facteurs de risque aussi présents.(22)

### **1.2.2.3 Disques intercalaires**

Les disques intercalaires, qui se situent aux extrémités des cardiomyocytes adjacents, sont essentiels aux couplages des cellules et à la conduction électrique longitudinale menant aux

contractions cardiaques. Les disques forment une jonction mécanique qui permettent la continuité du tissu cardiaque grâce à des protéines comme les desmosomes et les jonctions adhérentes. Ils contiennent également une composante électrique; les connexines (Cx). Elles forment deux connexons hexamériques qui s'organisent à travers l'espace extracellulaire pour laisser passer l'influx électrique responsable de la propagation de l'influx électrique entre les cardiomyocytes adjacents (**Figure 7A**).<sup>(35)</sup> Il existe plusieurs isoformes des connexines, dont l'abondance varie selon le tissu (**Figure 7B**). Au niveau cardiaque, la Cx43 est la plus abondante et majoritairement retrouvée dans les ventricules. La Cx43 est aussi présente au niveau des oreillettes, mais c'est la Cx40 qui y est retrouvée en plus grande proportion. En effet, la Cx40 est spécifique aux oreillettes et au système de conduction, comme les faisceaux de His et les fibres de Purkinje.<sup>(36)</sup> La Cx45 est, quant à elle, retrouvée uniquement dans le nœud sinusal. Ainsi, ce sont la Cx40 et la Cx43 qui sont responsables de la propagation de l'influx électrique longitudinale entre les myocytes auriculaires.



**Figure 7 : Structure et localisation des isoformes des connexines cardiaques**

(A) Les isoformes des connexines forment des connexons hexamériques qui permettent le passage de l'influx électrique entre deux myocytes adjacents. Ces connexons se retrouvent à la jonction des cellules, soit principalement aux disques intercalaires. (B) Localisation des différents isoformes cardiaques. La Cx43 est majoritaire dans les ventricules mais est aussi retrouvée dans les oreillettes et au niveau du nœud sinusal. La Cx40 est spécifique aux oreillettes et au système de conduction. La Cx45 est, quant à elle, retrouvée dans

le nœud sinusal. Cx; connexine, NS; nœud sinusal, OG; oreillette gauche, OD; oreillette droite, VG; ventricule gauche, VD; ventricule droit. (Figure adaptée de commons.wikimedia.org)

La résistance intercellulaire est définie par la séparation physique entre deux cellules, par la disponibilité des connexines à la jonction et par l'activité du courant sodique dépolarisant ( $I_{Na}$ ) présent à proximité de la jonction. Lorsque la quantité de connexines dans les disques intercalaires diminue, la résistance intercellulaire augmente rendant la propagation de l'influx électrique plus difficile entre les cellules adjacentes. De plus, la présence de fibrose influence la séparation physique des cellules, augmentant aussi la résistance. Ces conditions produisent un ralentissement de la conduction puisque l'influx prendra plus de temps à stimuler suffisamment la cellule adjacente pour qu'elle atteigne un seuil permettant sa dépolarisation. L'influx pourra également se propager à un moins grand nombre de cellules puisque l'intensité de la propagation diminuera à chaque passage entre les cellules. Ce phénomène de dissipation de l'onde de propagation explique le ralentissement de la vitesse de conduction électrique qui favorise la réentrée.(8,12,37)

Ainsi, la présence des connexines à la jonction est une composante essentielle à la bonne propagation de l'influx. Une diminution de leur expression pourrait affecter la conduction et favoriser les arythmies. D'ailleurs, Hagendorff et al. ont démontré que les souris déficientes en Cx40 présentaient une prolongation de l'onde P ainsi qu'une plus grande réponse arythmique auriculaire aux protocoles de stimulations, suggérant une altération de la conduction électrique dans l'oreillette.(36) Cependant, un modèle murin déficient en Cx43 cardiaque ne montrait aucune prolongation de l'intervalle PR, suggérant que la Cx40 est principalement responsable de la conduction dans l'oreillette.(38)

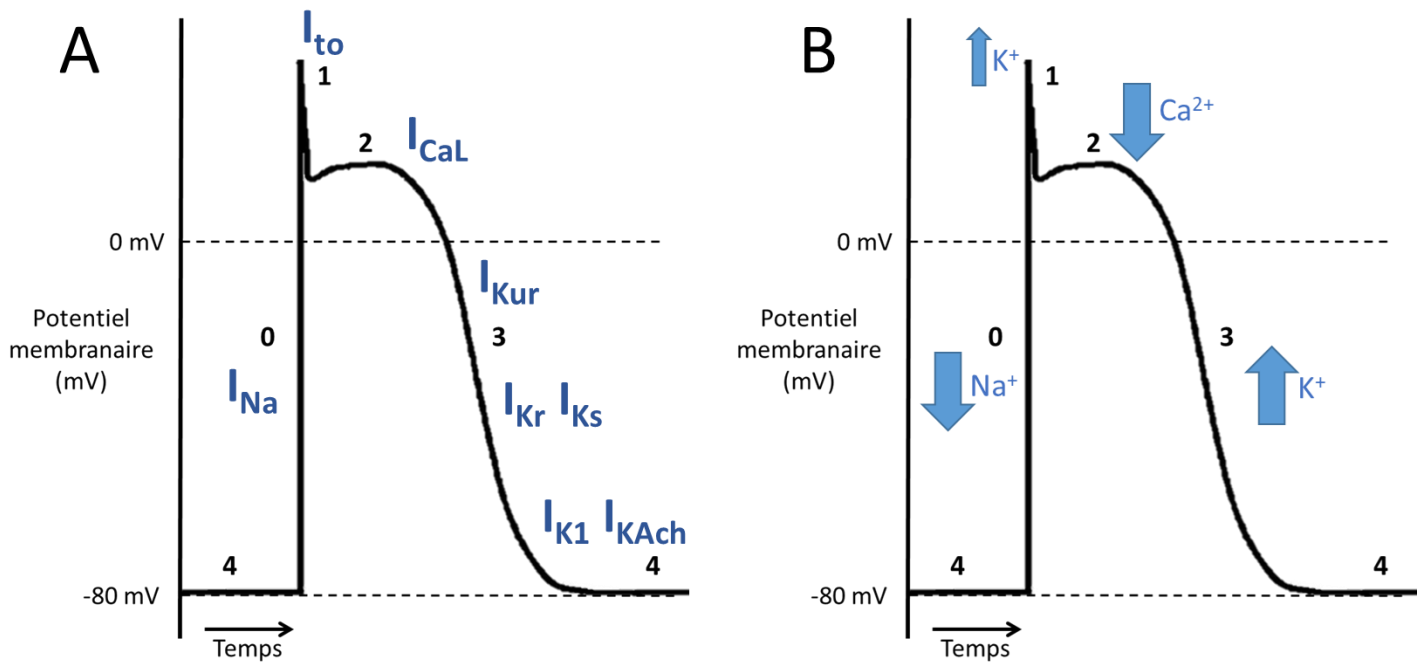
Une autre composante importante de la propagation linéaire est l'organisation spatiale des connexines dans la cellule. En effet, la latéralisation des connexines, c'est-à-dire le déplacement des connexines sur les côtés latéraux des myocytes, favorise la propagation transversale de l'influx électrique ce qui crée une hétérogénéité dans la conduction et favorise l'anisotropie non-uniforme. Plusieurs études ont rapporté une augmentation de la latéralisation des Cx40 et Cx43 associée avec la fibrillation auriculaire.(12,15,30) Ce repositionnement des connexines crée un motif de propagation susceptible d'induire des réentrées, notamment par des changements dans la direction de la conduction auriculaire.(12,15,30)

### 1.2.3 Remodelage électrique auriculaire

L'activité des canaux ioniques auriculaire est finement régulée et est essentielle à la bonne fonction cardiaque. Un changement des canaux ioniques, soit par leur expression ou leur activité, engendre des changements sur l'activité électrique des myocytes. Les remodelages électriques peuvent ainsi créer des substrats importants de la fibrillation auriculaire, d'autant plus que leur modulation peut être très rapide.(26) En effet, les remodelages électriques apparaissent plus rapidement et sont plus facilement réversibles que les remodelages structurels. Le développement de remodelages structurels est un processus qui prend plus de temps et qui est souvent associé à des formes plus persistantes de l'arythmie.(26,39,40)

#### 1.2.3.1 Le potentiel d'action auriculaire

Le potentiel d'action représente le potentiel membranaire d'une cellule en fonction du temps. Chacune des phases du potentiel d'action est médiée par des courants ioniques précis. La **Figure 8** montre les différentes phases du potentiel d'action auriculaire et les mouvements d'ions qui y sont associés. Certains paramètres du potentiel d'action peuvent être mesurés afin d'établir l'impact d'une pathologie, comme la fibrillation auriculaire, sur des courants spécifiques. Par exemple, la durée du potentiel d'action informe principalement sur la repolarisation de la cellule. Tandis que le  $V_{max}$ , soit la vitesse ascendante maximale du potentiel d'action correspond à l'étendue de la dépolarisation causée par le courant sodique. (41)



**Figure 8 : Potentiel d'action auriculaire par phase**

(A) Pendant la phase 0, les canaux sodiques s'ouvrent rapidement afin de laisser entrer les ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule. Ce courant sodique ( $I_{\text{Na}}$ ) dépolarise la membrane. La phase 1 correspond à l'ouverture de certains canaux potassiques qui laissent sortir les ions  $\text{K}^+$  qui forment le courant  $I_{\text{to}}$ . Dans cette phase, les courants sodiques s'inactivent. Ainsi, la membrane se repolarise partiellement. Dans la phase 2, les canaux calciques de type L ( $I_{\text{CaL}}$ ) s'ouvrent, laissant entrer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. La phase 3 est caractérisée par la repolarisation de la membrane par des courants potassiques ultra-rapides à rectification retardée ( $I_{\text{Kur}}$ ), ainsi que les composantes rapide et lente du courant potassique à rectification retardée ( $I_{\text{Kr}}$  et  $I_{\text{Ks}}$ ) qui font sortir les ions  $\text{K}^+$ . De plus, les courants calciques s'inactivent. Vers la fin de la phase 3, le courant  $I_{\text{K1}}$ , un courant potassique à rectification entrante, ainsi que  $I_{\text{KAch}}$ , un courant potassique dépendant de l'acétylcholine, s'ouvrent. La phase 4 correspond au retour à l'équilibre du gradient électrochimique membranaire par l'action de l'échangeur sodium-calcium (NCX) et de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase. Le potentiel de repos est maintenu par  $I_{\text{K1}}$  et  $I_{\text{KAch}}$  qui s'étaient activés pendant la phase 3.(41) (B) Les flèches en bleu indiquent les principaux mouvements des ions pendant le potentiel d'action, les flèches vers le bas signifient une entrée d'ions dans le cardiomyocytes et les flèches vers le haut indiquent une sortie d'ions. mV; potentiel membranaire en millivolt,  $\text{Na}^+$ ; ions sodium,  $\text{Ca}^{2+}$ ; ions calcium,  $\text{K}^+$ ; ions potassium (Figure adaptée de Nattel et al. (8))



### 1.2.3.1.1 Rôle du courant sodique dans la conduction électrique auriculaire

Le canal sodique voltage-dépendant, présent au niveau cardiaque, est formé de la sous-unité  $\alpha$ ,  $Na_v1.5$ , constituée de quatre domaines homologues comprenant chacun six passages transmembranaires. Cette protéine d'environ 220 kDa, qui est codée par le gène *SCN5A*, est responsable du courant sodique cardiaque ( $I_{Na}$ ). Ce courant entrant s'active lors de la phase 0 du potentiel d'action, entraînant la dépolarisation rapide de la cellule. Le  $I_{Na}$  est une composante importante qui détermine la vitesse de conduction puisqu'il est responsable de la grande majorité de l'influx électrique qui est propagé aux cellules adjacentes par les disques intercalaires.(11) D'ailleurs une proportion importante des canaux sodiques est située dans la région des disques intercalaires, facilitant l'excitation de la cellule adjacente.(35,42) Les canaux sodiques sont aussi présents sur les membranes latérales ainsi que dans les tubules T des cardiomyocytes. Un modèle de souris ayant une altération hétérozygote du gène *SCN5A* a montré une augmentation importante de la durée de l'intervalle PR ainsi que de l'onde P, soulignant l'importance du courant sodique dans la conduction auriculaire.(43)

Plusieurs études ont montré le rôle du  $I_{Na}$  dans la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire. Comme brièvement expliqué à la **Section 1.2.2.3**, une altération du courant sodique peut créer un ralentissement de la propagation de l'influx électrique dans l'oreillette qui se traduit par un conduction électrique auriculaire plus lente, souvent associée à la fibrillation auriculaire.(39) Dans un modèle canin de fibrillation auriculaire, Gaspo et al. ont démontré une diminution du  $I_{Na}$  associée à un ralentissement de la vitesse de conduction.(44) De plus, Yagi et al. ont rapporté une diminution similaire de la densité du  $I_{Na}$ , soit de plus de 50%, dans leur modèle canin de FA chronique.(45) Chez l'humain, une réduction du  $I_{Na}$  et de l'expression protéique de  $Na_v1.5$  sont rapportées chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire par rapport aux patients avec un rythme sinusal normal.(46)

### 1.2.3.1.2 Régulation du courant sodique auriculaire

Plusieurs mécanismes peuvent moduler l'activité des canaux ioniques. Ceux-ci inclut notamment la régulation traductionnelle du gène codant pour le canal et la régulation post-traductionnelle du canal, comme la phosphorylation.(41,42) D'ailleurs, certaines études ont

identifié une diminution de l'expression génique et protéique de  $Na_v1.5$  pouvant expliquer la diminution du  $I_{Na}$  observée en fibrillation auriculaire.(46,47)

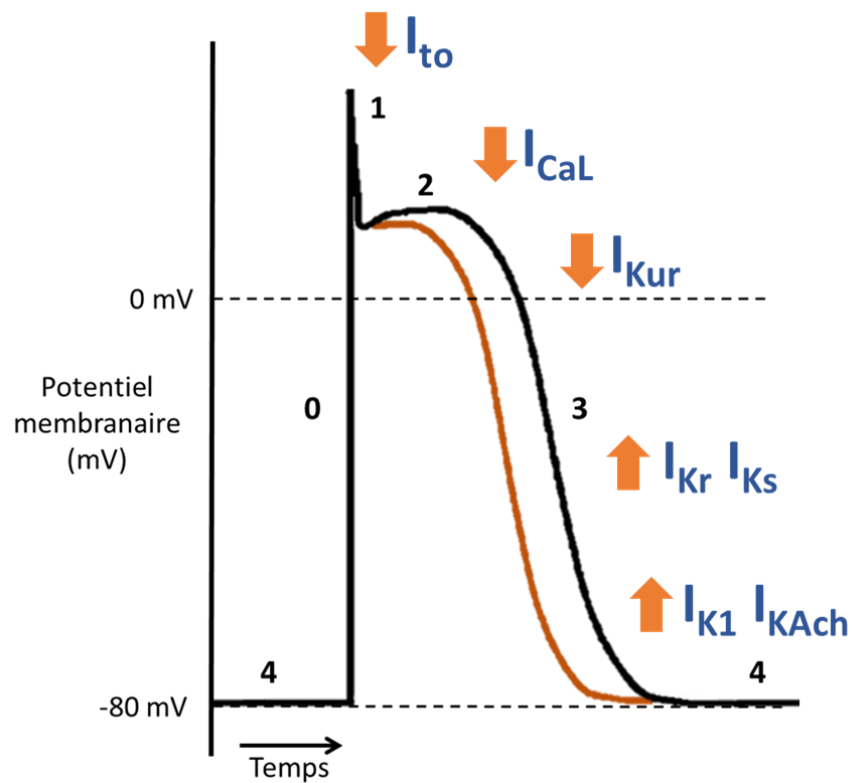
Les protéines kinases C (PKC) semblent également avoir un rôle majeur dans la régulation de l'électrophysiologie cardiaque et ont été associées avec plusieurs maladies cardiovasculaires.(48–50) Les différents isoformes de la PKC ont pour fonction de phosphoryler des acides aminés sérines et thréonines de d'autres protéines, ce qui modifie leur activité. Les PKC ont été catégorisés en sous-groupes dont les principaux isoformes, présents chez l'humain, sont de type **(A)** « classiques » (PKC :  $\alpha$ ,  $\beta I$  et  $\beta II$ ), dont l'activation est dépendante du diacylglycérol (DAG) et du calcium ou encore de type **(B)** « nouveaux » (PKC :  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\eta$ ) qui nécessitent uniquement le DAG pour s'activer.(51)

Certaines études ont montré que certains isoformes de la PKC, dont l'isoforme alpha (PKC $\alpha$ ) et delta (PKC $\delta$ ) pouvaient réguler l'activité de  $Na_v1.5$  et ainsi moduler le courant sodique.(50,52,53) En conditions normales, la PKC est principalement inactive dans le cytosol des cardiomyocytes. Lorsqu'activée, la PKC transloque à la membrane sarcolemmale où elle se trouve en étroite proximité avec  $Na_v1.5$  permettant sa phosphorylation.(42,48,49,53) D'ailleurs, Qu et al. ont démontré que la phosphorylation du canal  $Na_v1.5$  par la PKC $\alpha$  diminuait la densité de  $I_{Na}$  dans des myocytes ventriculaires de rats (54). Ces données sont similaires à celles rapportées précédemment par notre laboratoire sur l'effet de la PKC $\alpha$  sur  $I_{Na}$  ventriculaire de souris transgénique surexprimant le récepteur AT1.(53)

### 1.2.3.1.3 Courants calciques et potassiques

Les canaux calciques et potassiques peuvent aussi être impliqués dans la fibrillation auriculaire, puisqu'ils peuvent modifier la durée du potentiel d'action (**Figure 9**). Certaines études ont démontré que la durée du potentiel d'action était diminuée dans les myocytes auriculaires en fibrillation auriculaire, favorisant les réentrées. (26,39,55) Le raccourcissement du potentiel d'action peut s'expliquer par la diminution du courant calcique de type L ( $I_{CaL}$ ), de  $I_{to}$  et de  $I_{Kur}$ . Une augmentation des courants potassiques  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$  et  $I_{KAch}$  est aussi associée avec une diminution de la durée du potentiel d'action en fibrillation auriculaire.(26,56) Bosch et al. ont d'ailleurs rapporté que la durée du potentiel d'action plus courte des patients en FA était accompagnée d'une diminution de  $I_{CaL}$ .(55) La fibrillation auriculaire est une tachyarythmie qui

peut induire des mécanismes compensatoires qui vont moduler l'activité des courants ioniques, particulièrement  $I_{CaL}$ . En bref, à chaque potentiel d'action qui est généré, des ions  $Ca^{2+}$  entrent dans la cellule pendant la phase 2 et initient le processus menant à la contraction cellulaire. Lors d'une tachyarythmie, la fréquence des potentiels d'action est trop rapide et mène à l'accumulation de  $Ca^{2+}$  dans le cardiomyocyte. Ainsi, l'accumulation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire est néfaste et peut mener à des arythmies. Ainsi un mécanisme compensatoire réduit le  $I_{CaL}$ , visant à diminuer l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Cependant, ce phénomène contribue au raccourcissement du potentiel d'action et ultimement à la stabilisation des réentrées.(26)



**Figure 9 : Diminution de la durée du potentiel d'action induite par les courants calciques et potassiques**

La diminution du courant calcique de type L ( $I_{CaL}$ ) affecte le plateau du potentiel d'action puisque moins d'ions positifs vont entrer dans la cellule pendant la phase 2, résultant en une repolarisation plus rapide. La diminution des courants potassiques  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$  ont aussi été associés avec un raccourcissement du potentiel d'action dans la fibrillation auriculaire. L'augmentation des courants potassiques  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$  et  $I_{KACh}$  va faciliter la repolarisation puisque qu'une plus grande quantité d'ions positifs vont sortir de la cellule, sur la même période de temps. (Figure adaptée de Nattel et al. (8))

### 1.3 Gestion thérapeutique de la fibrillation auriculaire

Actuellement, les objectifs des traitements de la fibrillation auriculaire sont principalement liés à l'atténuation des symptômes, à l'amélioration de la qualité de vie et à la prévention des événements thrombotiques.

Il est possible de contrôler la fréquence ventriculaire afin d'éviter les symptômes liés à une tachycardie ventriculaire secondaire à la fibrillation auriculaire. Ceci se fait par l'utilisation de médicaments, comme des bêta-bloquants ou des bloqueurs des canaux calciques, ou encore en dernier recours par l'ablation du nœud AV.(1) Le contrôle du rythme est également une stratégie thérapeutique utilisée en fibrillation auriculaire, qui consiste à rétablir le rythme sinusal, soit par une cardioversion électrique, chimique (antiarythmiques)(4,7) ou encore de manière chirurgicale par une ablation par cathéter.(57) Dans tous les cas, un aspect important de la stratégie thérapeutique de la fibrillation auriculaire consiste à réduire les risques d'événements thrombotiques par l'utilisation d'anticoagulant oraux.

Ces options thérapeutiques peuvent généralement prévenir ou interrompre les nouveaux épisodes de fibrillation auriculaire mais ne constituent pas un traitement pour cette maladie. Un besoin important subsiste pour réduire la morbidité, la mortalité et les coûts liés à la fibrillation auriculaire. La complexité et les nombreuses causes possibles rendent ardue la gestion de la fibrillation auriculaire. L'amélioration des facteurs de risque modifiables de la fibrillation auriculaire est aussi privilégiée pour augmenter la survie et la qualité de vie. Cibler les facteurs de risque est parfois complexe considérant l'hétérogénéité de la pathophysiologie de la maladie. Cependant, des études récentes ont démontré qu'une bonne gestion de l'hypertension, améliorait l'état des patients FA et qu'une diminution de l'indice de masse corporelle réduisait la sévérité des effets de la FA.(1) Ceci démontre que les facteurs de risque peuvent directement influencer la progression de la maladie.

D'ailleurs, une méta-analyse récente rapporte une diminution de l'incidence de la fibrillation auriculaire chez des patients hypertendus recevant un traitement hypertenseur. Il est à noter que les patients recevant des médicaments inhibant le système rénine-angiotensine étaient significativement moins à risque de fibrillation auriculaire que ceux recevant d'autres antihypertenseurs. Cette analyse rapporte donc un bénéfice associé au contrôle de la pression

artérielle et suggère une implication du système rénine-angiotensine indépendante de ces effets hémodynamiques. Les auteurs suggèrent que le bénéfice des bloqueurs de SRA, comparativement aux bloqueurs des canaux calciques ou des bêtabloqueurs, réside dans la capacité de l'angiotensine II à remodeler l'électrophysiologie et la structure des oreillettes.(58) Cependant, les mécanismes par lesquels le SRA affectent le cœur et son implication directe dans la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire sont encore peu connus.

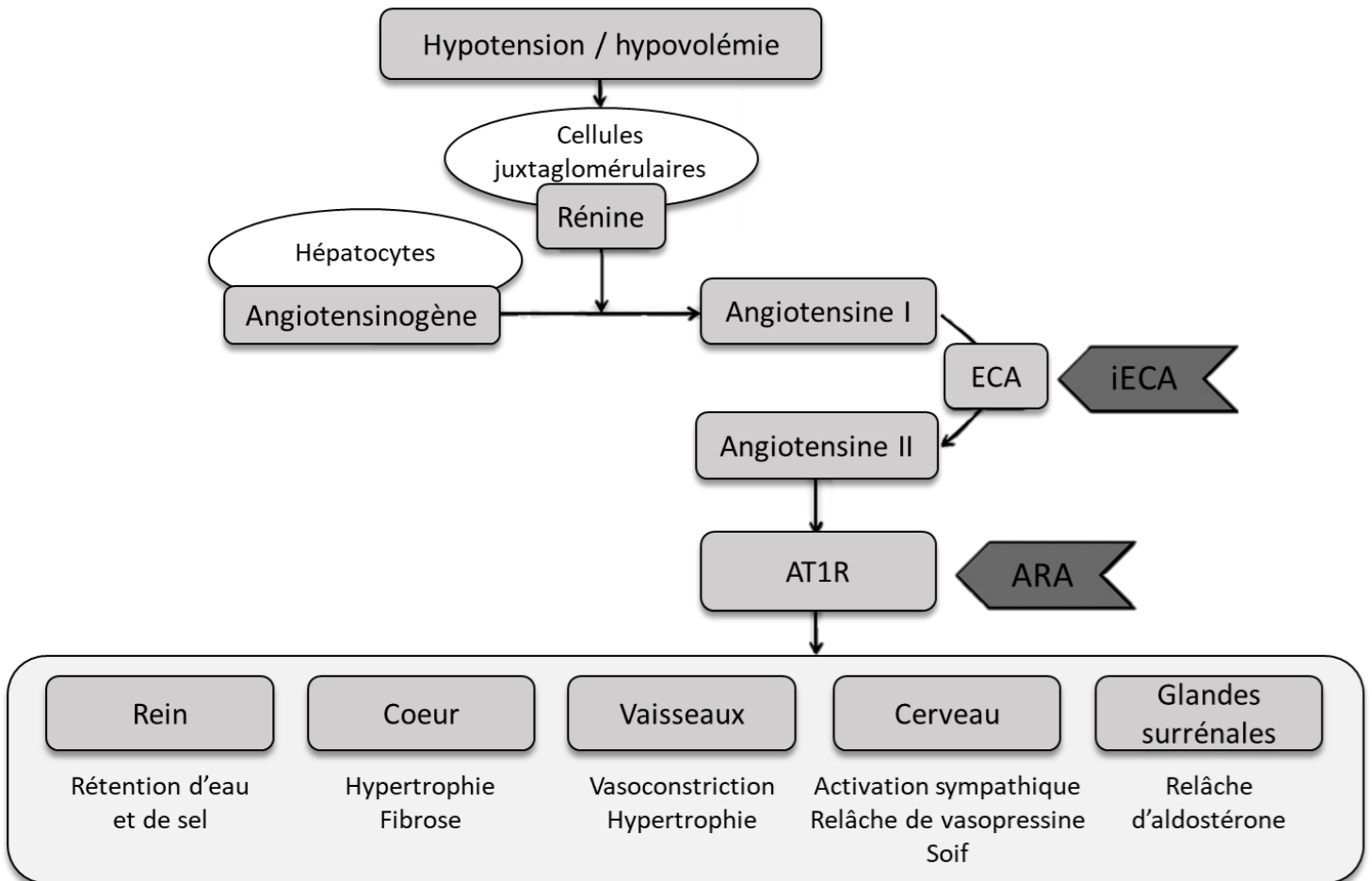
## **1.4 Le système rénine-angiotensine**

L'angiotensine II est l'effecteur principal du système rénine-angiotensine, qui joue un rôle physiologique crucial dans le système cardiovasculaire, principalement pour le maintien de la pression artérielle et de l'homéostasie hydrosodée, par son action vasoconstrictrice. En conditions physiologiques, la rénine est produite en réponse à une diminution du flux rénal sanguin. La rénine, relâchée dans la circulation systémique, est responsable du clivage de l'angiotensinogène, produite par le foie, en une protéine inactive, l'angiotensine I. C'est toutefois l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II au niveau pulmonaire.(24) Cette voie de synthèse classique de l'angiotensine II permet donc la vasoconstriction et l'augmentation du volume et de la pression sanguine par sa liaison avec le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (**Figure 10**).

### **1.4.1 Les récepteurs de l'angiotensine II**

Il existe deux principaux récepteurs couplés aux protéines G liant l'angiotensine II, soit les récepteurs de type I à l'angiotensine II (AT1R) et les récepteurs de type II à l'angiotensine II (AT2R). Bien qu'ils soient tous deux exprimés au niveau cardiaque, la cascade de signalisation induite par leur activation chronique résulte en des effets antagonistes. Le récepteur AT2 est beaucoup moins abondant que le AT1 et il est associé avec des effets chroniques plus protecteurs, tels qu'une action anti-fibrotique et anti-inflammatoire.(57) L'action chronique du AT2R est vasodilatatrice par l'activation PKA dépendante de eNOS.(24) Le récepteur AT1 est quant à lui responsable de la vaste majorité des effets néfastes engendrés par l'angiotensine II. En effet, l'activation chronique d'AT1R favorise le développement de pathologies, telles que l'insuffisance

cardiaque et l'hypertension, deux maladies étroitement liées au développement de la fibrillation auriculaire. Le récepteur AT1 est retrouvé, entre autres, dans le cerveau, les reins, le myocarde et dans le réseau vasculaire périphérique (**Figure 10**).



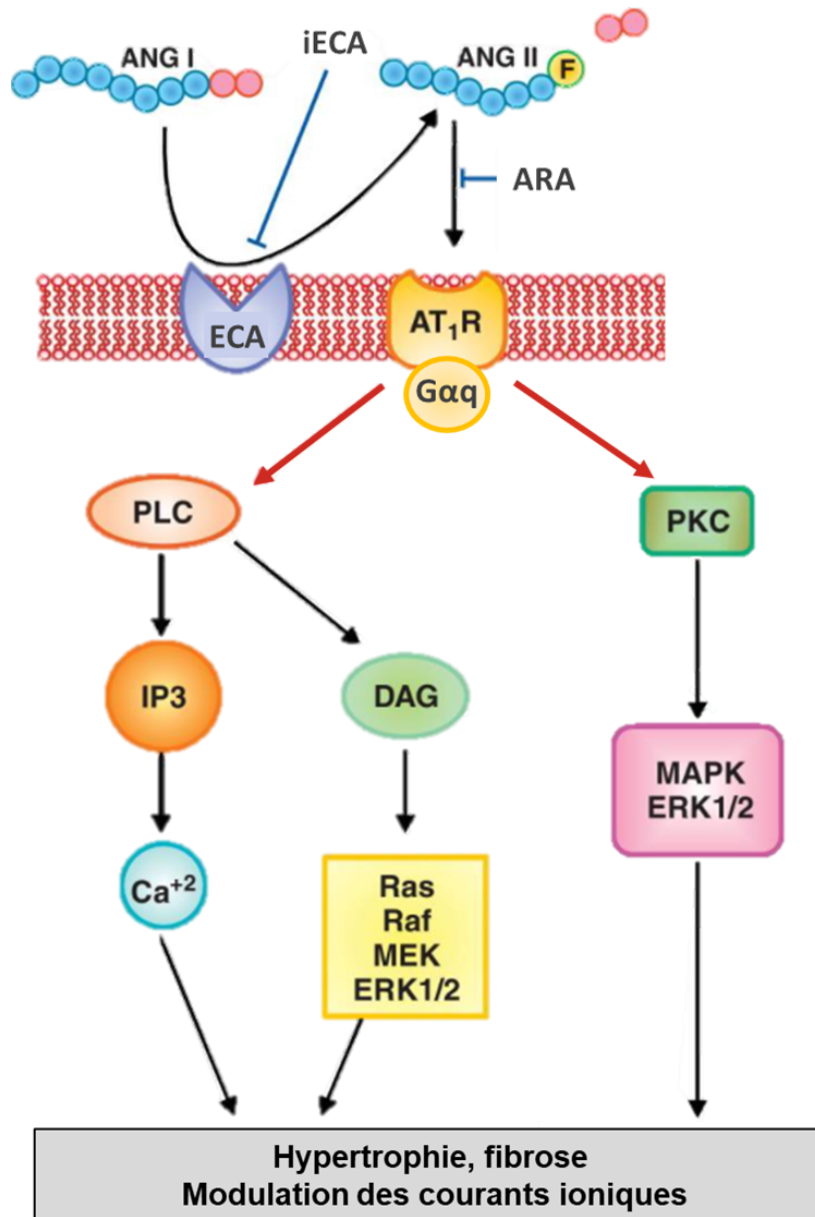
**Figure 10 : Synthèse et effets de l'angiotensine II par le récepteur AT1**

La synthèse de l'angiotensine II mène à des effets systémiques. En bref, la rénine clive l'angiotensinogène en angiotensine I, qui sera ensuite transformé en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA). Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (iECA) et les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II (ARA) empêchent l'action de l'angiotensine II. AT1R; récepteur de type 1 à l'angiotensine II, ECA; enzyme de conversion de l'angiotensine II (Figure adaptée de Orsborne et al. (59))

L'activation du récepteur AT1 par l'angiotensine II peut induire des mécanismes de remodelages électriques et structurels cardiaques menant à des conséquences néfastes. Dans les

cardiomyocytes, les récepteurs AT1 sont principalement couplés à la protéine Gαq/11 qui stimule la voie de la phospholipase C-diacylglycérol (PLC/DAG) et de la protéine kinase C (PKC) (**Figure 11**). Cependant, il est à noter que plusieurs autres voies complexes et interreliées sont aussi induites par l'activation d'AT1R.(60,61) Les cascades de signalisation DAG et PKC mènent, entre autres, à l'activation des protéines kinases activées par le mitogène et des kinases extracellulaires (MAP kinases-ERK1/2) qui induisent des facteurs de transcription impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. (16,24,60–62) Comme expliqué à la **Section 1.2.2.2**, l'angiotensine II peut induire l'activité des fibroblastes et moduler l'activité et l'expression des MMP et des TIMP, altérant ainsi l'homéostasie de la matrice extracellulaire menant aux dépôts de collagène.(24) D'ailleurs, Goette et al. ont rapporté une augmentation des ERK phosphorylés, chez les patients en FA, associée avec une augmentation de fibrose interstitielle et de l'expression de l'ECA.(62) De plus, la quantité de ERK activés diminuait suite à un traitement avec un inhibiteur de l'ECA, montrant l'implication du SRA dans la signalisation de la fibrose.(62)

Des études ont aussi démontré la capacité de la signalisation d'AT1R à moduler l'électrophysiologie cardiaque.(63–67) Par exemple, Zankov et al. ont observé une diminution de l'amplitude d'I<sub>Ks</sub> induit par l'infusion d'angiotensine II sur des myocytes auriculaires de cochons d'Inde. Ce remodelage électrique résultait en un raccourcissement du potentiel d'action associé à l'activation de la voie PLC/PKC.(64) L'activation d'AT1R peut également induire des signaux pro-inflammatoires et des cytokines pouvant moduler l'activité électrique du cœur.(24,57,68). De plus, IP3, qui est activé par la signalisation de la protéine Gαq, peut moduler la contractilité cardiaque.(60) Ainsi, l'activation du récepteur AT1R résulte en une cascade de signalisation capable d'induire des remodelages électriques et structurels.



**Figure 11 : Simplification de la signalisation du récepteur AT1**

Les récepteurs AT1 produisent leurs effets néfastes principalement par la cascade de signalisation de la protéine Gαq. La signalisation mène à la production de facteurs de transcription impliqués dans le remodelage structurel, ainsi qu'à l'activation de protéines pouvant moduler l'électrophysiologie cardiaque. ANGI; angiotensine I, ANGII; angiotensine II, ARA; antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II, ECA; enzyme de conversion à l'angiotensine II, iECA; inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, PKC; protéine kinase C, PLC; phospholipase C, DAG; diacylglycérol, IP3; inositol triphosphate, MAPK; protéine kinase activée par le mitogène, ERK; kinase régulée par un signal extracellulaire (Figure adaptée de Patel et al. (69))



## **1.5 Implication du système rénine-angiotensine dans la fibrillation auriculaire**

L'activation chronique du système rénine-angiotensine est retrouvée chez les patients atteints de fibrillation auriculaire. En effet, Boldt et al. ont démontré que l'expression protéique du récepteur AT1 était augmenté d'environ deux fois dans les oreillettes gauches de patients FA par rapport aux patients ayant un rythme sinusal normal, sans changement dans l'expression d'AT2R.(16) Il est à noter que ces changements n'étaient pas observé dans l'oreillette droite, qui est moins impliquée dans l'initiation de l'arythmie. De plus, Tsai et al. ont observé que les patients avec un polymorphisme de l'angiotensinogène produisaient une plus grande concentration d'angiotensine II circulante et étaient plus à risque de développer un épisode de fibrillation auriculaire.(70) Ces études s'ajoutent à d'autres mentionnées précédemment qui rapportaient un lien entre l'activation du SRA et la fibrillation auriculaire.(58,62)

### **1.5.1 Bloqueurs du système rénine-angiotensine pour traiter la fibrillation auriculaire**

Plusieurs études ont rapporté des avantages à l'utilisation de médicaments ciblant le SRA dans le contexte de la fibrillation auriculaire. Par exemple, la méta-analyse, mentionnée à la **Section 1.3**, rapporte qu'une utilisation de bloqueurs du SRA, principalement les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (iECA) et les antagonistes des récepteurs AT1 (ARA), diminuait la survenue de fibrillation auriculaire.(57,58) Les effets positifs étaient plus importants pour prévenir la fibrillation auriculaire chez les patients étant à un stade précoce d'hypertension ou d'insuffisance cardiaque, avec peu de remodelage structurel établi.(57) De plus, les bienfaits des bloqueurs du SRA semblaient indépendant des effets hémodynamiques, puisque les autres antihypertenseurs étaient moins efficace pour prévenir les épisodes de fibrillation auriculaire.(58) De plus, une autre étude clinique a démontré qu'un traitement utilisant l'irbesartan, un antagoniste du récepteur AT1, en combinaison avec l'amiodarone, un antiarythmique, réduisant la fréquence des épisodes de FA chez les patients comparativement à l'utilisation seule de l'antiarythmique.(71)

Les résultats d'études précliniques semblent associer les effets positifs des bloqueurs du SRA sur le développement de la fibrillation auriculaire, à leur capacité à réduire les remodelages structurels auriculaires. Par exemple, l'utilisation d'enalapril, un iECA, dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque menant à la fibrillation auriculaire, montrait une diminution du remodelage structurel par rapport au groupe non-traité.(33,72) Une autre étude, aussi menée sur un

modèle canin de fibrillation auriculaire, a montré une diminution du remodelage structurel auriculaire avec l'utilisation du candesartan, un ARA.(34) Finalement, Li et al. ont démontré que dans leur modèle de FA canin, seuls les médicaments hypertenseurs ciblant le SRA avait un effet bénéfique sur le remodelage auriculaire, alors que les autres médicaments vasodilatateurs en n'avait peu.(33)

Ainsi, ces données précliniques et cliniques renforcent l'hypothèse que l'angiotensine II a un effet directement sur le cœur et que ses effets vasculaires sont peu impliqués dans la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire.

## **1.6 Modèle expérimental de souris transgéniques pour étudier la fibrillation auriculaire**

Afin d'étudier les mécanismes reliant la fibrillation auriculaire à l'activation chronique du système rénine-angiotensine, des souris transgéniques qui surexpriment de manière cardiomyocyte-spécifique le récepteur AT1R humain ont été utilisées. Le promoteur  $\alpha$ -MHC (myosine à chaîne lourde - *alpha-myosine heavy chain*), confèrent à ces souris, identifiées souris AT1R, un effet chronique de l'activation du SRA uniquement au niveau cardiaque.(73) Ainsi, les souris AT1R n'ont aucun effet hémodynamique ou systémique associé avec la suractivation du SRA (73) et ont des niveaux normaux d'angiotensine II circulants (**Supplemental table 1 de l'article**). Les souris AT1R permettent donc d'étudier l'effet direct du SRA sur le cœur et son implication dans le développement de pathologies, comme la fibrillation auriculaire.

La souris transgénique AT1R est de lignée C57BL/6 et a été développée par le laboratoire de Dre Mona Nemer à l'Institut de recherches cliniques de Montréal.(73) Les souris AT1R développent une hypertrophie cardiaque sans aucune altération de leur pression artérielle.(73) Ceci est particulièrement intéressant compte tenu que les effets vasculaires, normalement associés à l'angiotensine II, peuvent induire des remodelages cardiaques. L'avantage de ce modèle est donc d'étudier les effets directs de la surexpression du récepteur AT1 sur le remodelage électrique et structurel auriculaire en absence de changements hémodynamiques.

Précédemment, notre laboratoire a utilisé ce modèle de souris afin d'étudier les remodelages ventriculaires induits par la surexpression du AT1R menant à des arythmies ventriculaires et à

l'insuffisance cardiaque.(63,65–67) Ainsi, il a été observé qu'un remodelage structurel ventriculaire était présent chez les souris de 6 mois d'âge mais absent chez celles de 50 jours.(65) Ces données démontrent qu'il est donc possible de distinguer les remodelages électriques qui sont directement induits par la suractivation du SRA (50 jours), de ceux secondaires à la présence de remodelage structurel (6 mois). Comme mentionné précédemment, l'électrophysiologie cardiaque peut être modulée par la présence de remodelage structurel, particulièrement par la fibrose.

Brièvement, les études sur les ventricules des souris AT1R ont montré, dès l'âge de 50 jours, une altération des courants potassiques régulant la repolarisation associée à la prolongation du potentiel d'action ventriculaire, à une durée plus longue de l'intervalle QT corrigée pour la fréquence cardiaque (QTc) ainsi qu'à des arythmies ventriculaires.(65) Une altération de la contractilité des cellules ventriculaires a aussi été rapportée.(66) De plus, le laboratoire a récemment démontré que la conduction électrique ventriculaire était affectée par la surexpression d'AT1R et que la diminution du  $I_{Na}$  était médiée par la PKC $\alpha$ .(63) Les changements électrophysiologiques observés dans les ventricules coïncident avec la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque, dont souffrent les souris AT1R. De plus, l'implication du sexe sur le remodelage ventriculaire a aussi été étudié puisqu'une plus grande proportion des souris AT1R femelles décédaient subitement, mettant en lumière le phénotype ventriculaire beaucoup plus sévère des souris femelles AT1R.(67)

Les remodelages structurels et électriques sont connus pour être chambre cardiaque spécifique et pour être influencé par le sexe. Ainsi, il est important d'étudier les oreillettes des souris AT1R afin de comprendre les mécanismes menant à la fibrillation auriculaire dans le contexte de l'angiotensine II. Afin de diminuer les facteurs confondants en lien avec le sexe, ce projet de maîtrise a été effectué uniquement sur des souris mâles. La comparaison des remodelages auriculaires induits par la surexpression d'AT1R entre les souris mâles et les femelles fera l'objet d'un projet futur (voir **Section 3.8**)

### 1.6.1 La souris comme modèle pour la fibrillation auriculaire

La souris est un bon modèle facilement accessible et peu coûteux pour étudier les remodelages cardiaques induits par une stimulation pathologique, comme l'angiotensine II. Les courants responsables du potentiel d'action chez l'homme et la souris sont similaires, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude de l'électrophysiologie cardiaque. Cependant, quelques différences existent, notamment, le potentiel d'action est d'une durée plus courte chez la souris que chez l'humain et les courants potassiques impliqués dans la repolarisation sont aussi partiellement différents. En effet, bien que plusieurs courants potassiques soient les mêmes tels que  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{K1}$  et  $I_{KAch}$ , la composante rapide et lente du courant rectifiant retardé ( $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ ) sont présents chez l'humain mais n'ont pas de rôle fonctionnel chez la souris adulte. Les autres courants impliqués dans le potentiel d'action sont toutefois similaires entre la souris et l'homme.

Bien que son électrophysiologie cardiaque soit semblable à l'humain, la souris ne développe généralement pas spontanément d'arythmies, comme la fibrillation auriculaire. Cela semble s'expliquer par le fait que les oreillettes de la souris sont trop petites pour soutenir spontanément les réentrées qui sont induites par les stimulations ectopiques, telles que celles produites par les veines pulmonaires.(36,74) En effet, la petite taille des oreillettes rendrait difficile la formation de plusieurs réentrées qui permettent de stabilisées la fibrillation auriculaire.(74) Une stimulation électrique plus puissante peut être imposée au cœur afin d'induire la fibrillation auriculaire et permettre à la présence de substrats de maintenir l'arythmie. Ainsi, les protocoles de stimulations électrophysiologiques (*electrophysiological programmed stimulations* - EPS), sont fréquemment utilisés pour déterminer la vulnérabilité d'une souris à développer la fibrillation auriculaire.

## 1.7 Mise en contexte

Récemment, des efforts de recherche se sont concentrés sur la compréhension des mécanismes reliant les différents facteurs de risque au développement de la fibrillation auriculaire. Si les mécanismes sous-jacents les remodelages auriculaires induit par les facteurs de risque modifiables (hypertension, diabète, ...) et non-modifiables (âge, sexe, ...) sont mieux connus, des thérapies plus personnalisées pour chaque patient pourraient être développées.

L'activation chronique du SRA apparaît comme un facteur de risque important de la fibrillation auriculaire mais les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus. En effet, les remodelages directement induits par l'activation du SRA au niveau des oreillettes, indépendamment de ses effets hémodynamiques, restent encore à être élucidés. Une bonne compréhension de ces mécanismes pourrait faciliter le traitement de la fibrillation auriculaire en ciblant les facteurs de risque spécifiques à chaque patient.

## 1.8 Hypothèse

L'hypothèse de ce mémoire est que la surexpression d'AT1R altère l'activité électrique auriculaire favorisant le développement de fibrillation auriculaire et ce, même en absence de remodelage structurel et d'effets hémodynamiques délétères.

Une altération des courants ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ ), résultant directement de l'activation chronique du SRA, pourrait altérer l'activité électrique auriculaire modifiant le potentiel d'action (courants  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ ) et la conduction auriculaire ( $\text{Na}^+$ ), favorisant la fibrillation auriculaire. Le remodelage structurel amplifierait les effets délétères induit par le SRA et résulterait en une plus grande vulnérabilité à la fibrillation auriculaire. Ainsi, le remodelage électrique ne serait pas une conséquence du remodelage structurel mais bien directement induit par la suractivation du SRA.

## 1.9 Objectifs

1. Évaluer la présence de remodelage structurel chez les souris mâles AT1R de 50 jours et de 6 mois.
2. Évaluer et distinguer les remodelages électriques directement induits par la suractivation du SRA (50 jours) et ceux secondaires au remodelage structurel (6 mois) et les mécanismes régulateurs sous-jacents.
3. Déterminer l'impact des remodelages structurels et électriques sur l'activité électrique auriculaire.
4. Déterminer si les remodelages augmentent la vulnérabilité des souris à la fibrillation auriculaire.

## 1.10 Présentation de l'article

L'article présenté dans ce mémoire s'intitule « Atrial Electrical Remodeling in Mice with Cardiac-Specific Overexpression of Angiotensin II Type 1 Receptor ». Cet article, soumis en 2021 au Journal of American Heart Association (JAHA), intègre le travail de plusieurs personnes, dont mes co-premier auteurs, Anh-Tuan Ton et François Huynh, qui ont respectivement obtenus leur grade de PhD et MSc dans notre laboratoire. Leur contribution à l'article a permis d'établir l'impact de l'activation chronique du SRA sur les principaux courants ioniques auriculaires dans notre modèle de souris AT1R. Anh-Tuan Ton a réalisé la majorité des expériences d'électrophysiologie sur les courants potassiques et sodiques en collaboration avec François Huynh qui a principalement effectué les expériences relatives aux courants calciques et à leur régulation transcriptionnelle.

Basée sur les données recueillies par mes collègues, j'ai pu investiguer les principaux mécanismes responsables de la réduction du courant sodique, par des expériences de biologie moléculaire. Particulièrement, j'ai réalisé, entre autres, des analyses d'expression sur le canal  $Na_v1.5$  et ainsi que des Western Blots sur une kinase pouvant être impliquée dans la régulation du courant sodique, la PKC $\alpha$ . De plus, j'ai étudié l'expression des connexines, au niveau génique et protéique, chez les souris AT1R.

J'ai aussi confirmé que les groupes d'âge discriminaient la présence de remodelage structurel dans les oreillettes, comme il avait été précédemment observé dans les ventricules.(73) Pour ce faire, j'ai développé, pour notre laboratoire, un protocole pour la technique histologique de rouge Sirius qui permet de quantifier la fibrose tissulaire.

Finalement, j'ai complété et compilé les expériences d'EPS, qui avait été amorcées par Anh-Tuan Ton, afin d'établir la susceptibilité à la fibrillation auriculaire des souris AT1R à 50 jours et à 6 mois.

L'article qui suit inclut donc les principales données recueillies pendant ma maîtrise. Cet article permet de mieux comprendre les mécanismes induits par le SRA sur l'électrophysiologie auriculaire ainsi que sa contribution dans la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire.

## 2. ARTICLE

### **Atrial Electrical Remodeling in Mice with Cardiac-Specific Overexpression of Angiotensin II Type 1 Receptor**

Julie Demers<sup>1,2\*</sup>, Anh-Tuan Ton<sup>1,2\*</sup>, François Huynh<sup>2\*</sup>, Simon Thibault<sup>1,2</sup>, Anique Ducharme<sup>1,3</sup>,  
Pierre Paradis<sup>4</sup>, Mona Nemer<sup>5</sup>, and Céline Fiset<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>4</sup>Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

<sup>5</sup>University of Ottawa, Ottawa, Canada

\*These authors contributed equally to this study

Article soumis au Journal of American Heart Association (JAHA)



## **Abstract**

**Background-** Elevated angiotensin II (ANGII) levels are thought to play an important role in atrial electrical and structural remodeling associated with atrial fibrillation (AF). However, the mechanisms by which these remodeling occur are still unclear. **Objective-** Accordingly, we explored the effects of ANGII on atrial remodeling using transgenic mice overexpressing ANGII type 1 receptor (AT1R) specifically in cardiomyocytes. **Methods-** Voltage-clamp techniques, surface ECG, programmed electrical stimulations along with qPCR, Western blot and Picrosirius red staining were used to compare the atrial phenotype of AT1R mice and their controls (CTL) at 50 days (50d) and 6 months (6m). **Results-** Atrial cell capacitance and fibrosis were increased only in 6m AT1R mice, indicating the presence of structural remodeling.  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CaL}}$ ) and  $\text{K}^+$  currents were not altered by AT1R overexpression (50d AT1R). However,  $I_{\text{CaL}}$  density and  $\text{Ca}_v1.2$  mRNA expression were reduced by structural remodeling (6m AT1R). Conversely,  $\text{Na}^+$  current ( $I_{\text{Na}}$ ) was reduced (-65%) by AT1R overexpression (50d AT1R) and the presence of structural remodeling (6m AT1R) yields no further effect. The reduced  $I_{\text{Na}}$  density was not explained by lower  $\text{Na}_v1.5$  expression but was rather mediated by increased  $\text{PKC}\alpha$  activation as indicated by the increase in sarcolemmal  $\text{PKC}\alpha$  expression. Furthermore, connexin 40 expression was reduced to a similar extent in 50d and 6m AT1R mice. These changes were associated with delayed atrial conduction time, as evidenced by prolonged P-wave duration.

**Conclusion-** Chronic AT1R activation leads to slower atrial conduction due to reduced  $I_{\text{Na}}$  density and connexin 40 expression.

**Key words:** Angiotensin II type 1 receptor; Sodium current, Connexins; Atrial conduction; Atrial Fibrillation

## Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia, affecting 1 to 4% of the world's population, and increases risk of strokes and mortality.(1) Substantial atrial electrophysiological and structural remodeling are associated with AF.(2) Indeed, changes in atrial ionic currents and connexins can affect atrial conduction time, which, along with atrial fibrosis, can favor the development of AF. Chronic increase in angiotensin II (ANGII) levels, as commonly found in hypertension, have been identified as one of the major risk factors of AF, although underlying mechanisms are not completely understood.

ANGII, the main effector of the renin-angiotensin system (RAS), plays a key role in regulating physiological processes within the cardiovascular system. Its overactivity, mediated through the ANGI type 1 receptor (AT1R), can lead to several detrimental effects such as heart failure and ventricular arrhythmias.(3–5) Accumulating evidence suggests that ANGI is also involved in atrial structural and electrical remodeling, which may act as triggers for the initiation and maintenance of AF.(6,7) For instance, Xiao *et al.* demonstrated in a mouse model that cardiac-specific overexpression of angiotensin-converting enzyme (ACE) produces atrial enlargement causing AF.(8) It has also been shown that AF patients have increased ACE and AT1R levels in the left atrium.(9,10) In addition, ACE inhibitors (ACEI) and angiotensin receptor antagonists have been shown to reduce the risk of developing AF in heart failure patients, while other antihypertensive drugs have no effect.(6,11,12) These data suggest that RAS may directly influence atrial structure and function and that the beneficial effects of RAS blockade may not be solely due to hemodynamic effects.(13–15)

Previously, using transgenic mice with cardiomyocyte-specific overexpression of ANGI type 1 receptor (AT1R mice), we investigated the influence of chronic AT1R activation on ventricular electrophysiology. We found significant ventricular electrophysiological remodeling, with a marked reduction of several  $K^+$  currents as well as sodium and L-type calcium currents ( $I_{Na}$  and  $I_{CaL}$ ). (3,16–18) Importantly, we demonstrated that there was no evidence of ventricular hypertrophy before the age of 60 days in the AT1R mice; however, significant hypertrophy and fibrosis were present at 6 months of age without any hemodynamic changes.(3,5) We therefore

used these mice at two different ages to distinguish the direct effects of AT1R overexpression (50 days; 50d) from the effects of hypertrophy (6 months; 6m) on electrical ventricular function.(3,16–18) We found in these studies that AT1R mice exhibited significant ventricular electrical remodeling attributable to AT1R signaling and not secondary to ventricular hypertrophy.

Accordingly, we hypothesized that chronic AT1R activation also alters ionic currents in mouse atrial myocytes. Given that conduction delay is a common feature of AF, we also examined the effect of AT1R overexpression on connexins (Cx40 and Cx43) expression. PR interval and P-wave duration were also determined to establish whether changes at the cellular level were reflected by a slower atrial conduction time and an increased AF vulnerability.

## Methods

### Animals

Heterozygous male C57BL/6 overexpressing AT1R mice aged  $50 \pm 5$  days (50d; no hypertrophy) and 6-8 months (6m; presence of hypertrophy) and age-matched male wild-type littermate controls (CTL) were used in this study. The generation of the AT1R mice was described previously.(6) Briefly, human AGT1R was expressed under the control of the murine  $\alpha$ -myosin heavy chain (Myh6) promoter, which directs transgene expression specifically in cardiomyocytes. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Research Council (8th ed. National Academies 2011). Experiments were also approved by the Montreal Heart Institute Animal Care Committee (Protocol 2015-80-03, 2018-80-01 and 2019-80-01).

### Isolation of atrial mouse myocytes

Single atrial myocytes were isolated from the left atrium of male mice by enzymatic dissociation as previously described.(19,20) Left atrium was used as it has been described to be more susceptible to AF.(2) Mice were heparinized (100 U heparin (1000 U/mL) 15 min before removal of the heart to prevent blood coagulation. Mice were then anesthetized by isoflurane inhalation and killed by cervical dislocation. The hearts were rapidly removed, and retrogradely perfused through the aorta (2 ml/min) on a modified Langendorff apparatus with the following solutions: 1) 5 min with HEPES-buffered Tyrode's solution containing (in mM): 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.33 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 HEPES, and 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH); 2) 10 minutes with a Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode's solution; 3) 35 minutes with a Tyrode's solution containing 0.03 mM Ca<sup>2+</sup>, 20 mM taurine, 0.1% BSA (Fraction V; Sigma Chemicals, St-Louis, MO), and 73.7 U/ml type II collagenase (Worthington, Free-hold, NJ); and 4) 5 minutes with a Kraft-Brühe (KB) solution containing (in mM): 100 K<sup>+</sup>-glutamate, 10 K<sup>+</sup>-aspartate, 25 KCl, 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 20 taurine, 5 creatine base, 0.5 EGTA, 5 HEPES, 20 glucose, and 0.1% BSA (pH adjusted to 7.2 with KOH). All solutions were maintained at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . At the end of the perfusion, the left atrium was removed and placed in KB solution. The tissue was minced and triturated for 3-5 minutes in order to isolate individual atria myocytes. Atrial myocytes cells were stored in KB at 4°C until

being used 2-6 h later. Only rod-shaped myocytes were used for electrophysiological experimental studies.

### Cellular electrophysiology

The voltage-clamp protocols, recording methods and data acquisition have already been described elsewhere.(17,21,22) In brief, the myocytes were placed in a recording chamber (volume ~ 200  $\mu$ l) on the stage of an inverted microscope, and given 10 minutes to adhere to the bottom of the bath. The cells were perfused with a solution at 2 ml/min. Pipettes were made from borosilicate glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), and had resistances in the range of 2–4 M $\Omega$  when filled with pipette solutions. For Na<sup>+</sup> current measurements, cells were perfused with a solution containing (in mM): 132.5 CsCl, 10 glucose, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, and 5 NaCl (pH adjusted to 7.4 with CsOH). Patch pipettes were filled with the following solution (mM): 132.5 CsF, 5 NaCl, 5 Mg-ATP, 10 EGTA, and 5 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH).(17,18,22) For K<sup>+</sup> current and action potential measurements, cells were perfused with HEPES-buffered Tyrode's solution as previously described.(21,23) Patch pipettes were filled with the following solution (mM): 110 K<sup>+</sup>-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 4 K<sub>2</sub>-ATP, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with KOH).(21,23) For L-type Ca<sup>2+</sup> current recordings, atrial cells were perfused with a solution containing (in mM): 10 CsCl, 5.5 glucose, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, and 145 TEACl (pH adjusted to 7.4 with CsOH). Patch pipettes were filled with the following solution (in mM): 100 aspartic acid, 70 CsOH, 40 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 4 Mg-ATP, 10 EGTA, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH).(16,24)

Whole-cell current- and voltage-clamp recordings were obtained using ruptured patch-clamp technique with an AxoPatch 200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Only cells with a compensated series resistance (R<sub>s</sub>) (compensation set at 50-70%) of 10 M $\Omega$  or less were kept for analysis. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 2 kHz with a 4-pole Bessel analog filter, digitized at 4–10 kHz using pCLAMP 10.2 (Molecular Device). Recorded membrane potentials were corrected by -10 mV to compensate for the liquid junction potential. Briefly, the peak Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>) was elicited by a series of 40-ms test potentials varying from -90 mV to +15 mV in 5 mV increments from a holding potential of -90 mV at a frequency rate of 0.1 Hz.(17) Total K<sup>+</sup> current was elicited by a series of 500-ms test potentials varying from

-110 mV to +50 mV in 10 mV increments from a holding potential of -80 mV at a frequency rate of 0.1 Hz.(21) Action potential were recorded at frequency rate of 4 Hz with whole-cell current-clamp protocol by injection of brief (1-3ms) stimulus currents (0.4-0.7 nA). L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{CaL}}$ ) was elicited by a series of 250-ms test potentials at a frequency of 0.1Hz varying from -50 mV to +60 mV in 5 to 10 mV increments from a holding potential of -90 mV preceded by a prepulse of 50 ms at -50 mV in order to inactivate  $\text{Na}^+$  current and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{CaT}}$ ). (16,24) All cellular electrophysiological experiments were carried out at room temperature (20-22°C).

### Elisa experiments

Plasma concentrations of ANGII were measured using an *Assay Max Human Angiotensin II Elisa Kit* (AssayPro LLC, St-Charles, MO, United States), following the manufacturer's instructions.

### Surface electrocardiograms (ECG)

Surface ECG recordings were obtained as previously described.(3) Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (2%) and their body temperature was monitored and maintained at 37°C using a heating pad. Platinum electrodes positioned subcutaneously were connected to a Biopac System MP100 (EMKA Technologies, France). Surface ECG in lead I configuration were recorded at a rate of 2 kHz for 5 minutes of continuous experimental recording. The signal was filtered at 100 Hz (low pass) and 60 kHz (notch filter). Data were analyzed using ECG auto 1.7 (EMKA Technologies). The PR interval was calculated manually by a blinded observer from signal averaged ECG recordings (on 500-1000 cardiac cycles).

### Programmed electrical stimulation (EPS) protocols

Atrial fibrillation susceptibility was assessed using EPS in anaesthetized mice (2% isoflurane). EPS protocols were used as previously described.(25) Briefly, a heating pad was used to monitor and keep at 37°C the mice body temperature. A 1.2F or a 1.9F octapolar electrophysiology catheter (Transonic Scisense Inc.), for 50d and 6m mice respectively, was introduced into the heart via the right jugular vein and slowly lowered towards the right atria. Bipolar recordings were obtained from the distal two electrode pairs. Pacing of the right atrium was performed by triggering a stimulus at twice the diastolic threshold using a custom-built computer-based stimulator (509

Stimulator, Grass-Telefactor). The induction of arrhythmias was tested through 8-atrial burst stimulation protocols (5s at S1S1: 50-10 ms, 10 ms stepwise reduction). AF was defined as a rapid, irregular atrial rhythm lasting for at least 1 s, measured from the end of the last stimulation burst-spike to the first sinus rhythm P wave on the ECG. All mice underwent identical pacing stimulation protocols in the same controlled conditions. “n” for EPS experiments were 50 days: CTL: 13, AT1R: 12 and 6 months: CTL:10, AT1R: 13.

### Picrosirius Red

The atrial interstitial collagen was quantified using the Picrosirius Red staining technique adapted from Boldt *et al.* protocol.(26) Mice were anesthetized with 2% isoflurane and then sacrificed by cervical dislocation. The left atria were removed and fixed in 10% buffered formalin overnight at 4°C. The tissues were then embedded in paraffin and cut longitudinally at a thickness of 8 µm using a microtome. The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol series before being stained using a Picrosirius Red solution (0.1% Direct Red 80 (Sigma-Aldrich Corp) in saturated aqueous picric acid) for 1 hour. Slides were washed twice with acidified water (0.5% acetic acid) and dehydrated before cover slipping with Permount medium (Fisher Chemical). The images of the sections were taken in brightfield using the Qicam optic camera (Teledyne Qimaging). Endocardium fibrosis quantification was performed using the software ImageJ.

### Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

*Nppa* (coding for ANP) and *Cacna1c* (coding for Cav1.2) mRNA quantification was performed as previously published.(3,17) Reverse transcription and qPCR were performed on total RNA isolated from left atria of CTL and AT1R mice. Total RNA was isolated from the left atria with a RNeasy fibrous tissue kit (Qiagen) and treated with DNase I to prevent contamination by genomic DNA. cDNA were synthesized with the Maxima Reverse Transcriptase enzyme kit (Fermentas) and primers specific for the genes of interest. The qPCR was then performed using DyNAmo Color Flash SYBR Green qPCR kit (Thermo Scientific) and a real-time PCR system (MX3005P QPCR system; Stratagene). Each sample was analyzed in triplicate and the analysis of mRNA expression was quantified relative to the mean level of two housekeeping genes (murine

cyclophyllin and succinate dehydrogenase complex subunit A (*SDHA*) mRNA) signal. For these qPCR experiments, two left atria were used per sample (n).

qPCR experiments for the following genes: *Gja5* (encoding Cx40), *Gjal* (encoding Cx43) and *Scn5a* (encoding Nav1.5) were performed according to the following protocols. In brief, total RNA was isolated from left atria of CTL and AT1R mice using Trizol Reagent (Sigma-Aldrich) and chloroform. Total RNA was then treated with DNase Kit Nucleospin RNA (Machery-Nagel) to prevent contamination by genomic DNA. cDNA was synthesized with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qPCR experiments were performed using Sybr Select Master Mix (Applied Biosystems) and a real-time PCR system (Quantstudio 3; Applied Biosystems). Primers specific for the genes of interest were used and relative mRNA expression was quantified according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  analysis technique using the mean level of three housekeeping genes (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), Beta-2 microglobulin (*B2M*) and cyclophilin mRNA) and the mean level of the corresponding CTL group. Each sample was analyzed in duplicate and one left atrium was used per sample (n).

#### Sarcolemmal-enriched protein isolation

Protocols used for sarcolemmal-enriched protein fraction isolation and Western blot experiments have been previously described.(3,17,27) In brief, atria were pooled and homogenized in an ice-cold extraction buffer which contains a mix of protease and phosphatase inhibitors. Preparation was centrifuged at 10 000 g for 10 minutes to remove cell debris. Supernatant was collected and centrifuged at 200 000 g for 20 minutes. The pellet was resuspended in the KCl (0.6M) supplemented-homogenizing buffer and incubated for 10 minutes to dissociate myofibrillar proteins. Samples were then centrifuged at 200 000 g and pellets were washed three times with the homogenizing buffer and subsequently centrifuged at 200 000 g. Samples were used as sarcolemmal-enriched proteins and preserved for short-time storage at -20°C.

#### Western Blot experiments

Nav1.5, Cx40 and Cx43 western blot experiments were carried using 30 µg of protein isolated from both left and right atria of 8 mice (16 atria/n, n=3/group, 24 mice per group). Protein concentration



was assessed using the standard Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). For each sample, 30  $\mu$ g of protein were loaded in separate wells and separated in stain-free gel (TGX 7.5% Stain-free, Bio-Rad Laboratories). Following migration, the gel stain-free photoactivation was performed using a ChemiDoc apparatus (Bio-Rad Laboratories). Proteins were then electrophorically transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Membrane's stain-free imaging was used to quantify total protein per sample and confirm uniformity of loading and transfer. The membranes for Nav1.5 were blocked in Tris-buffered saline Tween-20 solution (TBST) containing 5% nonfat dry milk for 4h at room temperature while the membranes for Cx40 and Cx43 were blocked in TBST containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 4 hours. Primary antibodies (Nav1.5 1:250, Abcam; Cx40 1:1000, Invitrogen; Cx43 1:2500, Invitrogen) were added to a TBST/5% nonfat dry milk or 5% BSA solution and incubated at 4°C overnight. The membranes were washed in TBST/5% nonfat dry milk solution and then incubated for 2 hours with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature. Immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence reagents (ECL plus, Perkin Elmer) and bands were visualized in film-free chemiluminescence using ChemiDoc apparatus (Bio-Rad Laboratories). The total protein content in each lane, as revealed by the stain-free quantification, was determined and used to normalize the quantity of sarcolemmal protein immunoreactivity as determined using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

For PKC $\alpha$ , sarcolemmal proteins from 50-day and 6-month-old mice were isolated from left atrial tissues. **At 50 days**, 10 left atria were pooled per n (n=3/group for a total of 30 left atria per group). Protein concentration was assessed using the standard Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). 10  $\mu$ g of protein for each sample was loaded into separate wells and separated in a precast gradient stain-free gel (TGX 4-15% Stain-free, Bio-Rad Laboratories). **At 6 months**, 7 left atria were pooled per n (n=3/group for a total of 21 left atria per group). Due to the limited amount of material available, protein assays were not performed. For each experimental condition, tissue was extracted at a constant ratio of sample buffer to tissue mass and, following centrifugation, the entire volume of sample extract was applied to the appropriate wells of 7.5% stain-free gels. Following migration, the gels stain-free photoactivation were performed using a ChemiDoc apparatus (Bio-Rad Laboratories). Proteins were then electrophorically transferred onto a PVDF membrane. Membrane's stain-free imaging was used to quantify total protein per sample and confirm loading

and transfer uniformity. The membranes were blocked in Tris-buffered saline Tween-20 solution (TBST) containing 5% nonfat dry milk for 2 hours at room temperature. Primary antibodies (PKC $\alpha$  1:2000, Cell signaling) were added to a TBST/3% nonfat dry milk solution and incubated at 4°C overnight. The membranes were washed in TBST/5% nonfat dry milk solution and then incubated for 2 hours with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature. Immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence reagents (ECL plus, Perkin Elmer) and bands were visualized in film-free chemiluminescence using ChemiDoc apparatus (Bio-Rad Laboratories). The total protein content in each lane, as revealed by the stain-free quantification, was determined and used to normalize the quantity of sarcolemmal protein immunoreactivity as determined using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

### Statistical analysis

All the results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), “n” indicates the number of cells. Unpaired two-tailed Student *t*-test or Pearson's chi-squared test were used when appropriate. Statistical analysis was performed using Origin 8.0 (OriginLab Corporation). A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Atrial cellular hypertrophy and fibrosis in 6m AT1R mice

We first determined whether, using AT1R mice at 50 days and 6 months, we could discriminate the effects of AT1R overexpression from those resulting from atrial structural remodeling. Fig.1A shows that atrial cell capacitance of 50d AT1R mice ( $54.5 \pm 1.6$  pF) was comparable to CTL mice ( $53.0 \pm 1.6$  pF). However, in 6m AT1R mice there was a 44% increase in cell capacitance ( $68.5 \pm 2.7$  pF) compared to CTL ( $47.9 \pm 1.3$  pF). Nppa gene expression (encoding atrial natriuretic peptide, ANP) was comparable in 50d AT1R and CTL mice, but a two-fold increase in Nppa transcripts was observed in 6m AT1R mice compared to CTL (\* $p < 0.01$ ) (Fig.1B). Atrial fibrosis was not different between left atrial tissues from 50d AT1R ( $3.1 \pm 0.8\%$ ) and CTL ( $3.6 \pm 0.3\%$ ) mice. However, collagen deposits were significantly increased in 6m AT1R mice ( $17.2 \pm 2.5\%$ ) compared to CTL ( $3.7 \pm 0.8\%$ , \* $p < 0.01$ ) (Fig.1C-D). These data demonstrate clear evidence of hypertrophy at the cellular and molecular levels and presence of fibrosis in left atrium of AT1R mice at 6 m but not at 50d. Therefore, these age groups are suitable to discriminate the effects induced by AT1R overexpression from those secondary to structural remodeling. Of note, ANGII circulating levels were unchanged by AT1R overexpression (Supplementary Table.1).

### AT1R overexpression reduces atrial $I_{Na}$ density in AT1R mice

Data illustrated in Fig.2A show a clear reduction of about 65% of  $I_{Na}$  density in atrial myocytes from 50d AT1R mice (at  $-40$  mV:  $-9.6 \pm 1.4$  pA/pF) relative to their age-matched CTL ( $-27.1 \pm 2.1$  pA/pF). In 6m AT1R mice,  $I_{Na}$  density was reduced by 60% (at  $-40$  mV, CTL:  $-29.2 \pm 3.9$  pA/pF; AT1R:  $-11.6 \pm 2.0$  pA/pF) (Fig.2B). AT1R overexpression had no effects on the  $I_{Na}$  activation and inactivation kinetics properties (Supplemental Fig.1), ruling out the possibility that a change in the fraction of available sodium channels explained the reduced  $I_{Na}$  density.

### AT1R overexpression have no impact on sodium channel expression but increases sarcolemmal PKC $\alpha$ protein expression

The cardiac Na<sup>+</sup> channel gene transcript (*Scn5a*, encoding Nav1.5) was only reduced in 6m AT1R mice. However, the sarcolemmal protein expression of Nav1.5 was similar in AT1R mice of both age groups compared to their respective CTL (Fig.3A-B), indicating that change in sodium channel protein expression is not responsible for the lower I<sub>Na</sub> density observed in AT1R mice.

Protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) is known to be activated by ANGII signaling(28,29) and to play major roles in cardiac electrophysiology, <sup>21,31</sup> including modulation of Nav1.5.(17,30) Notably, we previously demonstrated that ventricular I<sub>Na</sub> is modulated by PKC $\alpha$  activity in AT1R mice.(17) Since PKC $\alpha$  activation requires translocation to the sarcolemmal membrane, we compared the sarcolemmal expression of PKC $\alpha$  using Western blot analysis. Sarcolemmal PKC $\alpha$  levels were higher in AT1R mice compared to CTL at both 50d and 6m (7-10 left atria were pooled per n, n=3/group) (Fig.3C), suggesting that chronic AT1R stimulation induces PKC $\alpha$  activation.

#### Atrial structural remodeling decreases I<sub>CaL</sub> density in AT1R mice

The I<sub>CaL</sub> density was comparable between 50d AT1R (at 0mV, -3.7 $\pm$ 0.2pA/pF) and CTL (-4.2 $\pm$ 0.3pA/pF) mice (Fig.4A) and there was no significant difference in mRNA expression of L-type Ca<sup>2+</sup> channel gene (*Cacna1c*, encoding Cav1.2) between both groups (Fig.4B). However, data obtained in 6m AT1R myocytes (Fig.4C) show that I<sub>CaL</sub> density was reduced (at 0mV; AT1R: -3.6 $\pm$ 0.2pA/pF and CTL: -5.4 $\pm$ 0.4pA/pF). Consistent with lower I<sub>CaL</sub> density, there was a 30% reduction of *Cacna1c* transcript in 6m AT1R (\*p<0.05) (Fig.4D). These results indicate that unlike I<sub>Na</sub>, I<sub>CaL</sub> is not directly affected by the overexpression of AT1R. However, the presence of structural remodeling was associated with a reduced I<sub>CaL</sub> through *Cacna1c* transcriptional regulation.

#### Atrial K<sup>+</sup> currents are unchanged by AT1R overexpression

In 50d mice, the density of the outward (at +30mV, CTL: 18.6 $\pm$ 2.2pA/pF and AT1R: 15.1 $\pm$ 1.3pA/pF) and inward portion (at -110mV, CTL: -14.8 $\pm$ 3.7pA/pF and AT1R: -14.5 $\pm$ 2.8pA/pF) of total K<sup>+</sup> current were similar between CTL and AT1R atrial myocytes (Fig.5A). In 6m mice, the outward portion of total K<sup>+</sup> current was also similar between AT1R (at +30mV:

12.6±0.8pA/pF) and CTL mice (at +30mV; 14.1±0.9 pA/pF) (Fig.5B). However, there was a reduction in the inward current ( $I_{K1}$ ) between -110 and -90mV (6m: CTL: n=15, AT1R: n=9).

In 6m AT1R mice, the inward portion of the  $K^+$  currents was reduced between -90 and -110mV (at -110 mV: -17.8±1.7 pA/pF) compared to CTL mice (at -110mV: -12.9±0.8 pA/pF; \*p=0.0464). As these differences were observed only at voltages more negative than -90 mV, there was no impact on the resting membrane potential (RMP) (AT1R: -78.3±1.5 mV; n=9, CTL: -77.3±1.0 mV; n=15, p=0.6142). Taken together, these results indicate that AT1R overexpression had no impact on atrial  $K^+$  currents.

#### Atrial Cx40 expression is decreased in AT1R mice

The transcript level of Cx40 (Gja5) was reduced by 76% in AT1R mice of both age groups (Fig.6A) and a significant reduction in the mRNA expression of Cx43 (Gja1) was also observed in 50d (31%) and 6m (52%) AT1R mice (Fig.6C). The protein expression of Cx40 was also reduced by AT1R overexpression (50d: 40%, 6m: 47%) (Fig.6B). However, Cx43 protein expression levels remained similar between CTL and AT1R mice of both ages (Fig.6D). These results indicate that changes in Cx40 expression, which is the main isoform responsible for atrial cell-to-cell coupling, occur before the development of structural remodeling.

#### AT1R overexpression alters atrial action potential (AP) waveform and atrial conduction

We examined the atrial AP waveform, specifically the AP amplitude (APA) and the maximal velocity of the AP upstroke ( $V_{max}$ ) in AT1R mice. The results show that both parameters were significantly reduced in atrial myocytes from 50d and 6m AT1R mice (Fig.7A-B). Action potential durations measured at 90% of repolarization (APD<sub>90</sub>) were similar between AT1R and CTL mice at both ages, consistent with the  $K^+$  current data. Furthermore, surface ECG recordings reveal that P-wave duration and PR interval were significantly prolonged in 50d AT1R mice and further increased in the presence of hypertrophy (Fig.7C-D). These results demonstrate that the decrease in  $I_{Na}$  caused by AT1R overexpression leads to a reduction in APA and  $V_{max}$  and that these

alterations, associated with the lower Cx40 expression, delay atrial conduction time as evidenced by the prolonged p-wave duration and the corresponding prolongation of the PR interval.

#### Increase in AF susceptibility in AT1R mice

When subjected to the same EPS protocols, 50d AT1R mice developed AF slightly more often than CTL mice (CTL 38.5%; AT1R 50%, p=ns) (Fig.8) suggesting that AT1R-induced electrical remodeling tends to favor AF. In 6m AT1R mice, the presence of structural remodeling further increased AF susceptibility (CTL 40%; AT1R 69.2%, p=ns).

## Discussion

To determine whether ANGII directly influence atrial electrophysiological function, we used transgenic mice with cardiomyocyte-specific overexpression of ANGII type 1 receptor (AT1R mice) before (50d) and after (6m) the development of atrial structural remodeling. Our results show that chronic AT1R activation reduced  $I_{Na}$  through PKC $\alpha$  activation. Moreover, Cx40 expression was also decreased in AT1R mice, independently of structural remodeling. These alterations were associated with delayed atrial conduction and a relative increase in AF susceptibility.

Earlier studies have associated different heart diseases with a modulation of Nav1.5 channel by PKC isoforms.(17,28,29) We have previously been able to demonstrate that PKC $\alpha$  activation selectively downregulates Na<sup>+</sup> currents in the ventricles of AT1R mice, while other PKC isoforms were not involved.(17) PKC $\alpha$  is an effector present in the ANGII-AT1R signaling pathway that is translocated to the membrane when activated.(28,31) The kinase proximity allows the phosphorylation of Nav1.5 channel, resulting in a decrease of  $I_{Na}$  density.(17) Studies have shown that the use of a selective PKC $\alpha$  translocation blockers or PKC inhibitors restored  $I_{Na}$  density to control levels and that PKC activators such as PMA reduced Na<sup>+</sup> current.(17,30,31) Here, we showed increased PKC $\alpha$  expression in sarcolemmal protein isolated from atrial tissues of AT1R mice, suggesting that chronic AT1R stimulation leads to PKC $\alpha$  translocation and activation. These data, along with previous reports, strongly support the role of PKC $\alpha$  in reducing  $I_{Na}$  density in the atrial myocytes of AT1R mice. Additionally, this regulation occurs before the development of structural remodeling, similarly to what has been observed in the ventricles of AT1R mice.

We found that Scn5a mRNA expression was reduced only in 6m AT1R mice, suggesting that its transcription is only regulated by structural remodeling, but without effect on Nav1.5 protein expression or additional effect on  $I_{Na}$  density. The fact that atrial structural remodeling is often already present in AF patients and experimental models probably explains the reduction in Scn5a expression reported in some studies.(26,32)

In our study, we found that among the different atrial ionic currents and connexins examined, only  $I_{CaL}$  was decreased by the AT1R-induced atrial structural remodeling. Consistent with our results, Alvin *et al.* found that volume overload hypertrophy reduced  $I_{CaL}$  in rat myocytes and that 3 weeks treatment with captopril, an ACE inhibitor, restored current density.(33) Earlier studies, including ours, have reported an association between ANGII activity and lower  $I_{CaL}$  density. Indeed, we previously observed a reduced  $I_{CaL}$  density (and  $Cav1.2$  expression) in ventricular myocytes from AT1R mice.(16,18) Moreover, Laszlo *et al.* have shown that the use of enalapril (an ACE inhibitor), increased  $I_{CaL}$  density in rabbit atrial myocytes, but could not revert the decrease in  $I_{CaL}$  density caused by rapid atrial pacing.(34) Their results suggest that the benefits of RAS inhibition may depend on the involvement of RAS activation in the underlying mechanisms of AF generation.(35,36) Alternatively, the reduction of  $I_{CaL}$  can be a compensatory mechanism in response to the increased cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration following rapid atrial pacing, rendering the use of enalapril ineffective.

It has been reported that increased local production of ANGII in the heart leads to atrial morphological changes.(8) In addition, using a transgenic mouse model combining AT1R overexpression and angiotensinogen knockout (to block the synthesis of ANGII), Yasuda *et al.* found an increase in atrial dilatation accompanied by fibrosis and these effects were prevented by candesartan, an AT1R antagonist.(37) Here, we showed that younger mice overexpressing AT1R had shorter atrial conduction time, independent of structural remodeling, which led to a slight increase in AF vulnerability. However, the presence of structural remodeling found in older AT1R mice, further delayed atrial conduction, and leads to more episodes of AF. This is not surprising given that fibrosis worsens conduction heterogeneity, thereby promoting reentrant circuits and hence arrhythmias. It should be noted that atrial remodeling induced by ANGII signaling was independent of hemodynamic changes, thus highlighting the direct effect of RAS on the heart and in AF pathophysiology. Recently, Jansen *et al.* reported that ANGII-mediated hypertension was associated with significant atrial remodeling in mouse and enhance AF vulnerability.(30) Similar to our findings, they found that atrial conduction was impaired in association with a reduction in  $I_{Na}$  mediated by  $PKC\alpha$ . However, they described a more severe phenotype, with reduction of atrial



K<sup>+</sup> currents, more pronounced atrial fibrosis and a significant increase in AF occurrence. Their results suggest that in addition to the direct effects of ANGII, the presence of hypertension and related hemodynamic changes result in more severe electrical and structural remodeling. In our study, the exact mechanism by which AT1R overexpression leads to fibrosis is not entirely clear. However, a likely explanation is that the AT1R-induced loss of cardiomyocytes initiates fibroblasts proliferation leading to accumulation of collagen.(5)

This study reveals significant differences between atrial and ventricular remodeling mediated by chronic AT1R activation. We previously showed that ventricular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents were both reduced in AT1R mice independently of hypertrophy.(3,16–18) However, in atrial myocytes these ionic currents are not directly influence by ANGII signaling. In fact, our results show that atrial K<sup>+</sup> currents are unaffected by AT1R overexpression or structural remodeling, whereas I<sub>CaL</sub> is reduced only secondary to structural remodeling. These findings indicate that chronic AT1R activation regulates these ionic currents differently depending on the heart chamber. However, our studies show that chronic AT1R stimulation reduces I<sub>Na</sub> through PKC $\alpha$  activation in the ventricles and atria.(17) A better understanding of these distinct regulatory mechanisms between the heart chambers could help develop more specific pharmacological tools and thus improve the management of cardiac arrhythmias.

## **Conclusions**

This study shows that cardiac-specific AT1R overexpression decreased atrial I<sub>Na</sub> and connexins expression, which slowed atrial electrical conduction. Importantly, these changes occurred in the absence of hypertension and prior to the development of atrial structural remodeling. This study provides mechanistic insights into ANGII-induced atrial remodeling that can favor AF development.

## **Fundings**

This work was supported by operating grants to C. Fiset from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-89934) and the Montreal Heart Institute Foundation.

## **Acknowledgements**

The authors thank N. Ethier, M-A. Gillis, M-E. Matte and J. Panasci for skilled technical assistance and Dr. B.G. Allen for his valuable assistance with Western blot analysis.

## **Conflict of interest**

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

## References

1. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim Y-H, McAnulty JH, Zheng Z-J, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 25 févr 2014;129(8):837-47.
2. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 1 oct 2002;415(6868):219-26.
3. Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res*. 2008;78(1):53-62.
4. Iravanian S, Sovari AA, Lardin HA, Liu H, Xiao HD, Dolmatova E, Jiao Z, Harris BS, Witham EA, Gourdie RG, Duffy HS, Bernstein KE, Dudley SC. Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) reduces ventricular tachycardia risk by altering connexin43. *J Mol Med*. juill 2011;89(7):677-87.
5. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis F, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(2):931-6.
6. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo CA, Garfinkle M, Yusuf S, Connolly SJ. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 7 juin 2005;45(11):1832-9.
7. Suo Y, Zhang Y, Wang Y, Yuan M, Kariyawasam S, Tse G, Liu T, Fu H, Li G. Renin-angiotensin system inhibition is associated with reduced risk of left atrial appendage thrombosis formation in patients with atrial fibrillation. *Cardiol J*. 2018;25(5):611-20.
8. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC Jr, Kasi VS, Hoit BD, Keshelava G, Zhao H, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol*. sept 2004;165(3):1019-32.
9. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial

fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 19 nov 2003;42(10):1785-92.

10. Goette A, Staack T, Röcken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 1 mai 2000;35(6):1669-77.

11. Kasi VS, Xiao HD, Shang LL, Irvanian S, Langberg J, Witham EA, Jiao Z, Gallego CJ, Bernstein KE, Dudley SC Jr. Cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme overexpression causes conduction defects and connexin dysregulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* juill 2007;293(1):H182-92.

12. Maggioni AP, Latini R, Carson PE, Singh SN, Barlera S, Glazer R, Masson S, Cerè E, Tognoni G, Cohn JN, Val-HeFT Investigators. Valsartan reduces the incidence of atrial fibrillation in patients with heart failure: results from the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Am Heart J.* mars 2005;149(3):548-57.

13. Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA.* 10 mai 1995;273(18):1450-6.

14. Hattori Y, Atsushi S, Hiroaki F, Toyama J. Effects of cilazapril on ventricular arrhythmia in patients with congestive heart failure. *Clin Ther.* juin 1997;19(3):481-6.

15. Lindholm LH, Dahlöf B, Edelman JM, Ibsen H, Borch-Johnsen K, Olsen MH, Snapinn S, Wachtell K, LIFE study group. Effect of losartan on sudden cardiac death in people with diabetes: data from the LIFE study. *Lancet Lond Engl.* 23 août 2003;362(9384):619-20.

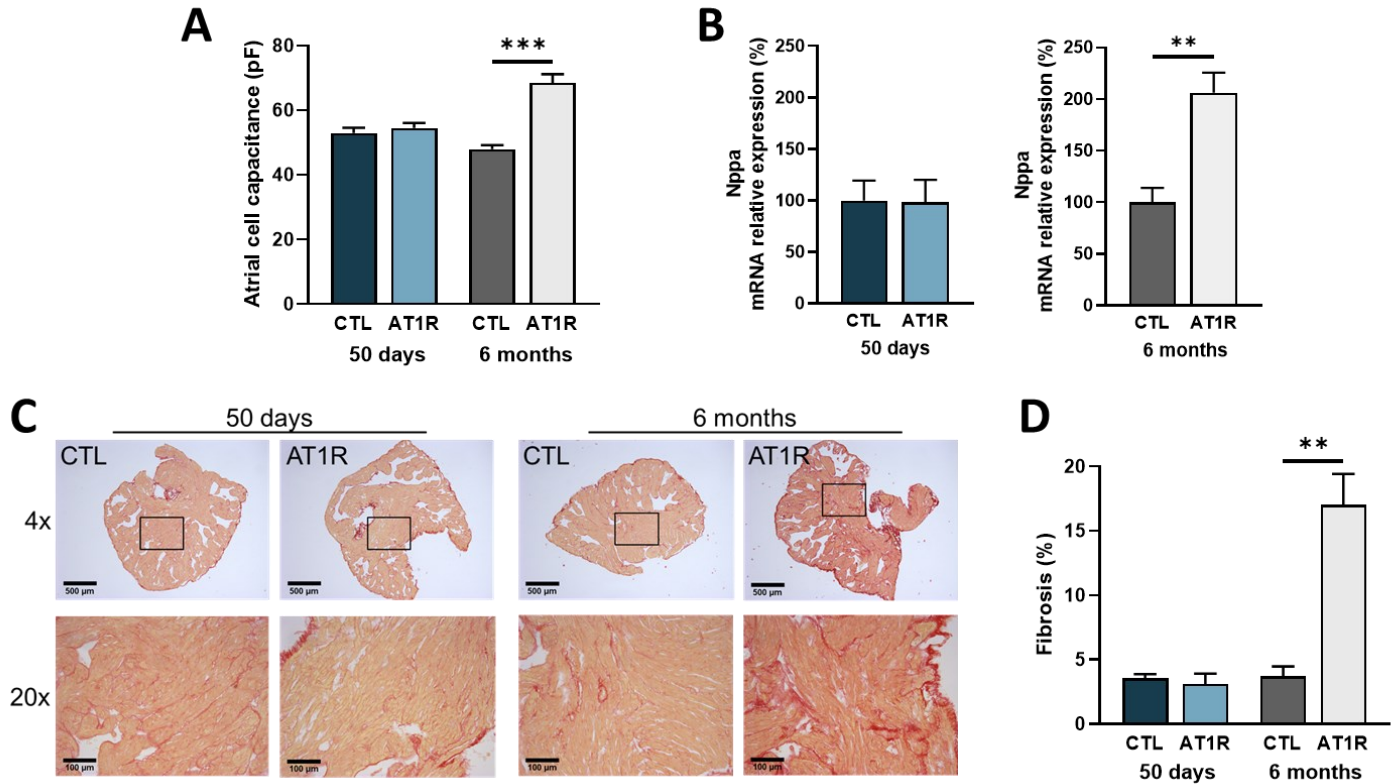
16. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 11 janv 2011;301(5):H2018-27.

17. Mathieu S, El Khoury N, Rivard K, Gélinas R, Goyette P, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Reduction in Na<sup>(+)</sup> current by angiotensin II is mediated by PKC $\alpha$  in mouse and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Heart Rhythm.* juin 2016;13(6):1346-54.

18. Mathieu S, Khoury NE, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Angiotensin II Overstimulation Leads to an Increased Susceptibility to Dilated Cardiomyopathy and Higher Mortality in Female Mice. *Sci Rep.* 17 janv 2018;8(1):952.
19. Trépanier-Boulay V, Lupien MA, St-Michel C, Fiset C. Postnatal Development of Atrial Repolarization in Mouse. *Cardiovasc Res.* 2004;64:84-90.
20. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 15 sept 2004;559(3):777-98.
21. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 15 sept 2004;559(3):777-98.
22. Grandy SA, Brouillette J, Fiset C. Reduction of ventricular sodium current in a mouse model of HIV. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1 août 2010;21(8):916-22.
23. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res.* 31 août 2001;89(5):437-44.
24. El Khoury N, Mathieu S, Fiset C. Interleukin-1 $\beta$  reduces L-type Ca<sup>2+</sup> current through protein kinase C $\epsilon$  activation in mouse heart. *J Biol Chem.* 8 août 2014;289(32):21896-908.
25. El Khoury N, Ross JL, Long V, Thibault S, Ethier N, Fiset C. Pregnancy and oestrogen regulate sinoatrial node calcium homeostasis and accelerate pacemaking. *Cardiovasc Res.* 1 oct 2018;114(12):1605-16.
26. Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dhein S. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart Br Card Soc.* avr 2004;90(4):400-5.
27. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal Biochem.* 1 oct 2005;345(1):47-54.
28. Malhotra A, Kang BPS, Cheung S, Opawumi D, Meggs LG. Angiotensin II Promotes Glucose-Induced Activation of Cardiac Protein Kinase C Isozymes and Phosphorylation of Troponin I. *Diabetes.* 1 août 2001;50(8):1918-26.

29. Murray KT, Hu N, Daw JR, Shin H-G, Watson MT, Mashburn AB, George AL. Functional Effects of Protein Kinase C Activation on the Human Cardiac Na<sup>sup</sup> + Channel. *Circ Res.* 1 mars 1997;80(3):370-6.
30. Jansen HJ, Mackasey M, Moghtadaei M, Belke DD, Egom EE, Tuomi JM, Rafferty SA, Kirkby AW, Rose RA. Distinct patterns of atrial electrical and structural remodeling in angiotensin II mediated atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 1 nov 2018;124:12-25.
31. Iqbal SM, Lemmens-Gruber R. Phosphorylation of cardiac voltage-gated sodium channel: Potential players with multiple dimensions. *Acta Physiol Oxf Engl.* mars 2019;225(3):e13210.
32. Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Belardinelli L, Maier LS. Altered Na<sup>+</sup>Currents in Atrial Fibrillation: Effects of Ranolazine on Arrhythmias and Contractility in Human Atrial Myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 25 mai 2010;55(21):2330-42.
33. Alvin Z, Laurence GG, Coleman BR, Zhao A, Hajj-Moussa M, Haddad GE. Regulation of L-type inward calcium channel activity by captopril and angiotensin II via the phosphatidyl inositol 3-kinase pathway in cardiomyocytes from volume-overload hypertrophied rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol.* mars 2011;89(3):206-15.
34. Laszlo R, Eick C, Rueb N, Weretka S, Weig H-J, Schreieck J, Bosch RF. Inhibition of the renin-angiotensin system: effects on tachycardia-induced early electrical remodelling in rabbit atrium. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* sept 2008;9(3):125-32.
35. Chaugai S, Meng WY, Ali Sepehry A. Effects of RAAS Blockers on Atrial Fibrillation Prophylaxis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016;21(4):388-404.
36. von Lewinski D, Kockskämper J, Rüberrus S-U, Zhu D, Schmitto JD, Schöndube FA, Hasenfuss G, Pieske B. Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT1 receptor blockade in human atrial myocardium. *Eur J Heart Fail.* déc 2008;10(12):1172-6.
37. Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Paradis P, Nemer

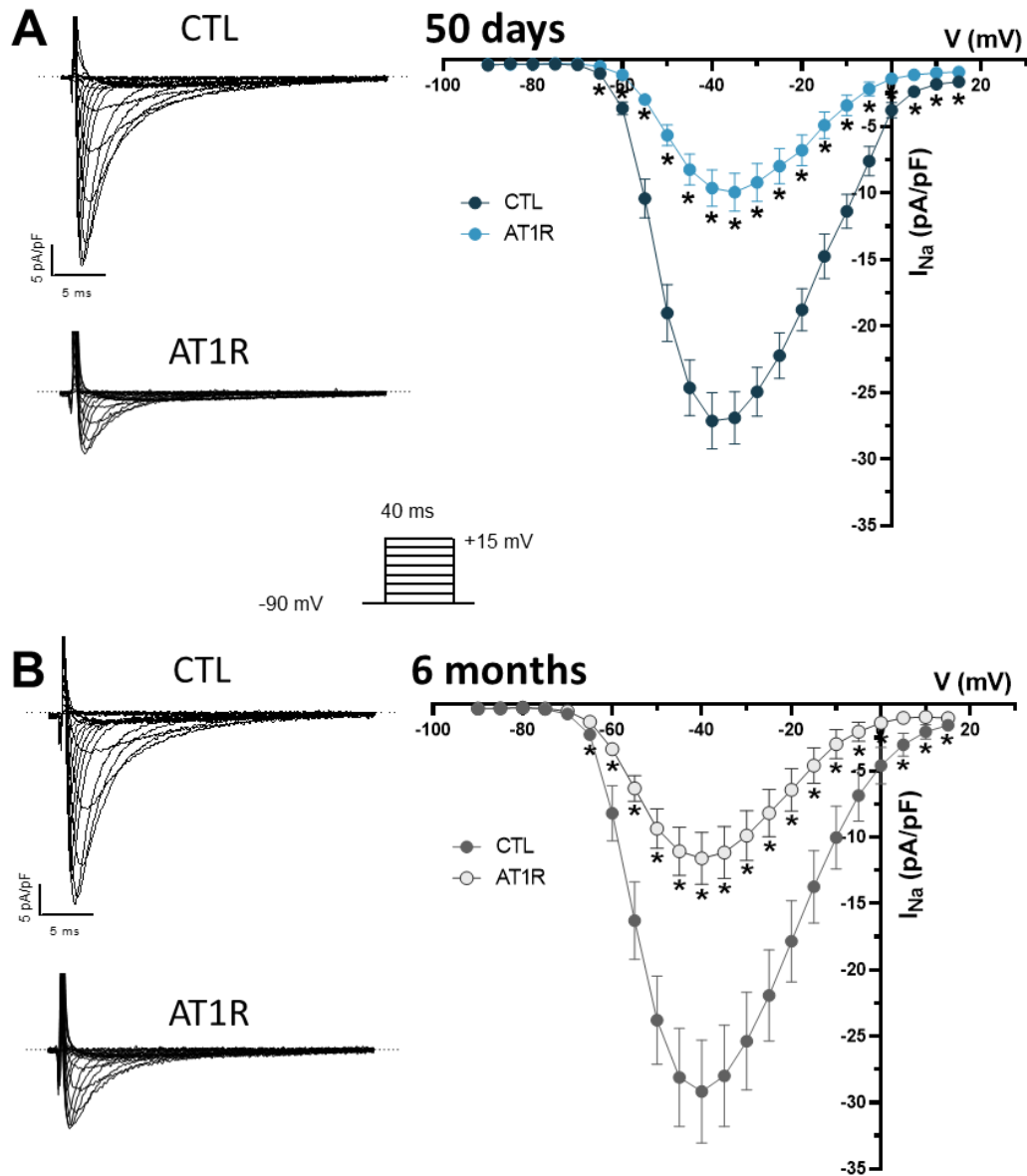
M, Komuro I. Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice. *Hypertension*. 1 mars 2012;59(3):627-33.



**Figure 1. Structural remodeling is only present in 6m AT1R mice**

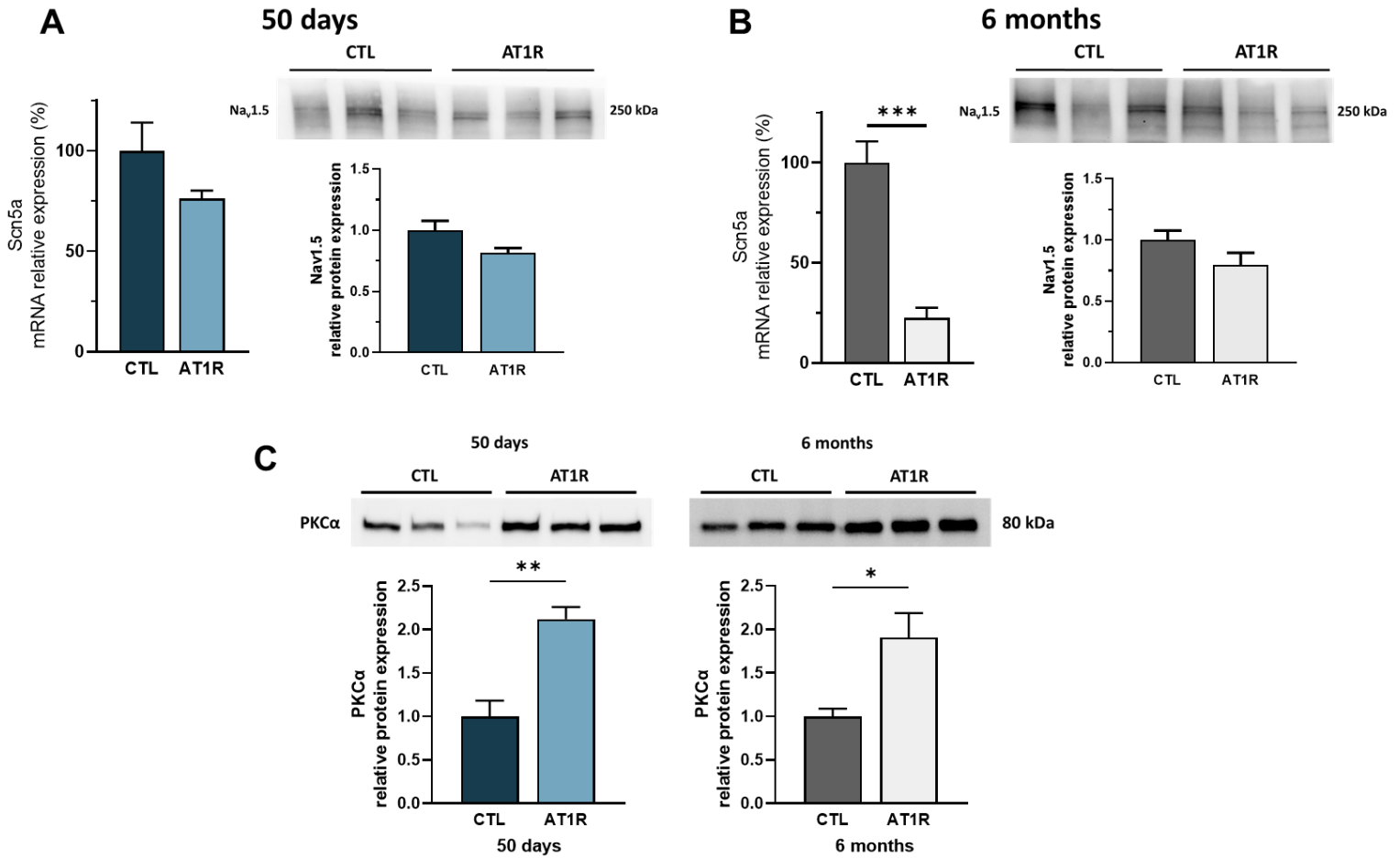
(A) Cell capacitance measurements in left atrial myocytes from 50d (CTL: n=60; AT1R: n=62; p=0.1918) and 6m (CTL: n=29; AT1R: n=20; \*p<0.0001) mice indicate that cellular hypertrophy is only observed in 6m AT1R mice. (B) The relative mRNA expression of Nppa was unchanged between AT1R and CTL mice of 50d (n=4; p=0.9517) but was increased in 6m AT1R mice compared to CTL (CTL: n=3; AT1R: n=4; \*p=0.0050). (C) Example of Picrosirius Red staining of paraffin-embedded left atrial sections of 50d and 6m CTL and AT1R mice at 4x and 20x magnification. Collagen deposits are stained in red, myocardium in yellow. (D) Interstitial fibrosis signal quantification (%) of 50d and 6m mice (n=3/group) shows an increase only in 6m AT1R mice (50d: p=0.5685; 6m: \*p=0.0030). Statistical analysis of Fig.1-7 was performed using a two-way Student t-test.





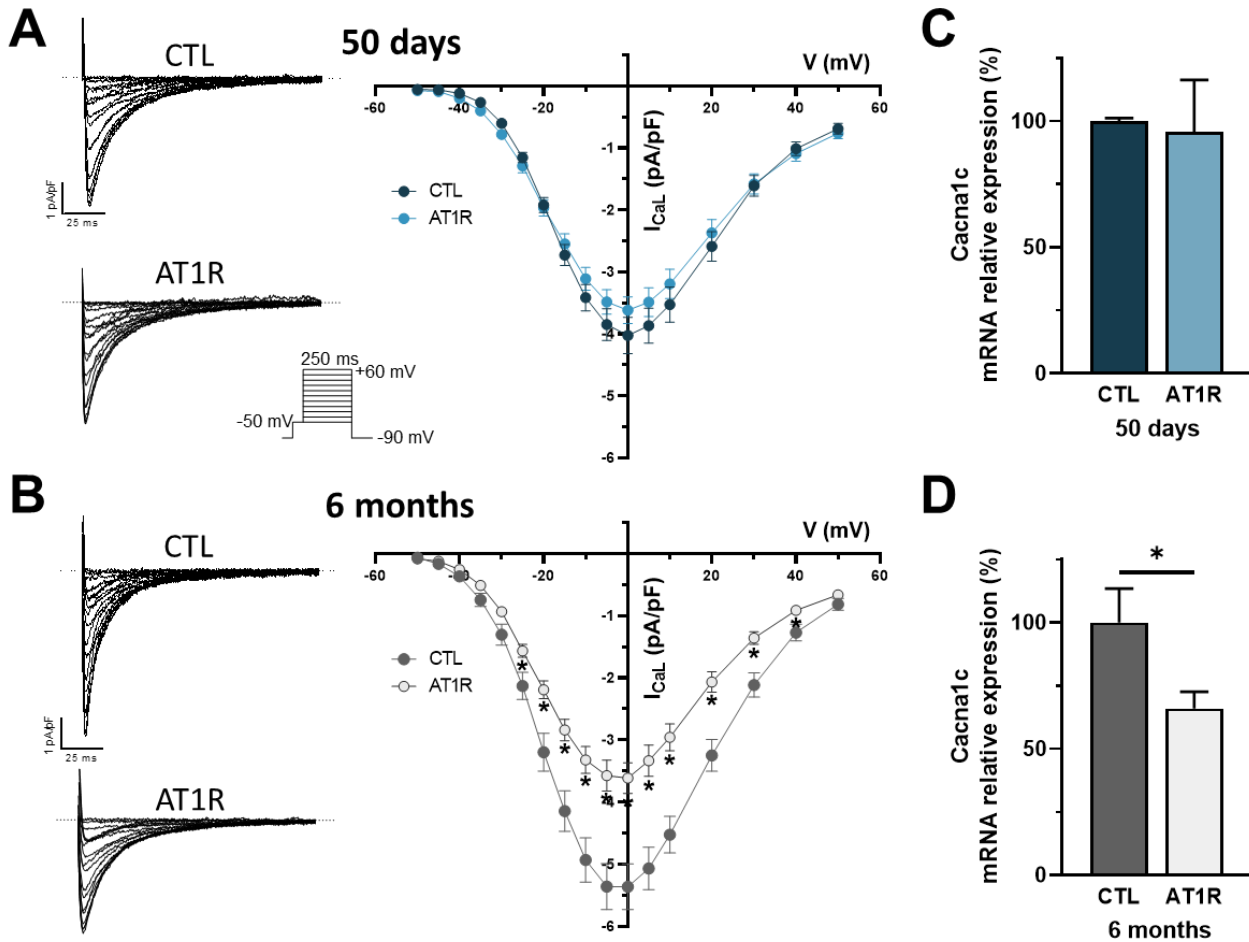
**Figure 2. Electrophysiological properties of  $I_{Na}$  in left atrial myocytes of AT1R and CTL mice**

**(A-B) (Left)** Typical current recordings of  $I_{Na}$  in left atrial myocytes from CTL and AT1R mice (voltage protocol shown in inset). The dotted lines indicate zero current in this figure. **(Right)** Mean  $I_{Na}$  current-voltage (I-V) relationships show a reduction of  $I_{Na}$  density in AT1R at 50d (CTL: n=13; AT1R: n=14; \* $p < 0.05$ ) and 6m (CTL: n=15; AT1R: n=15; \* $p < 0.05$ ).



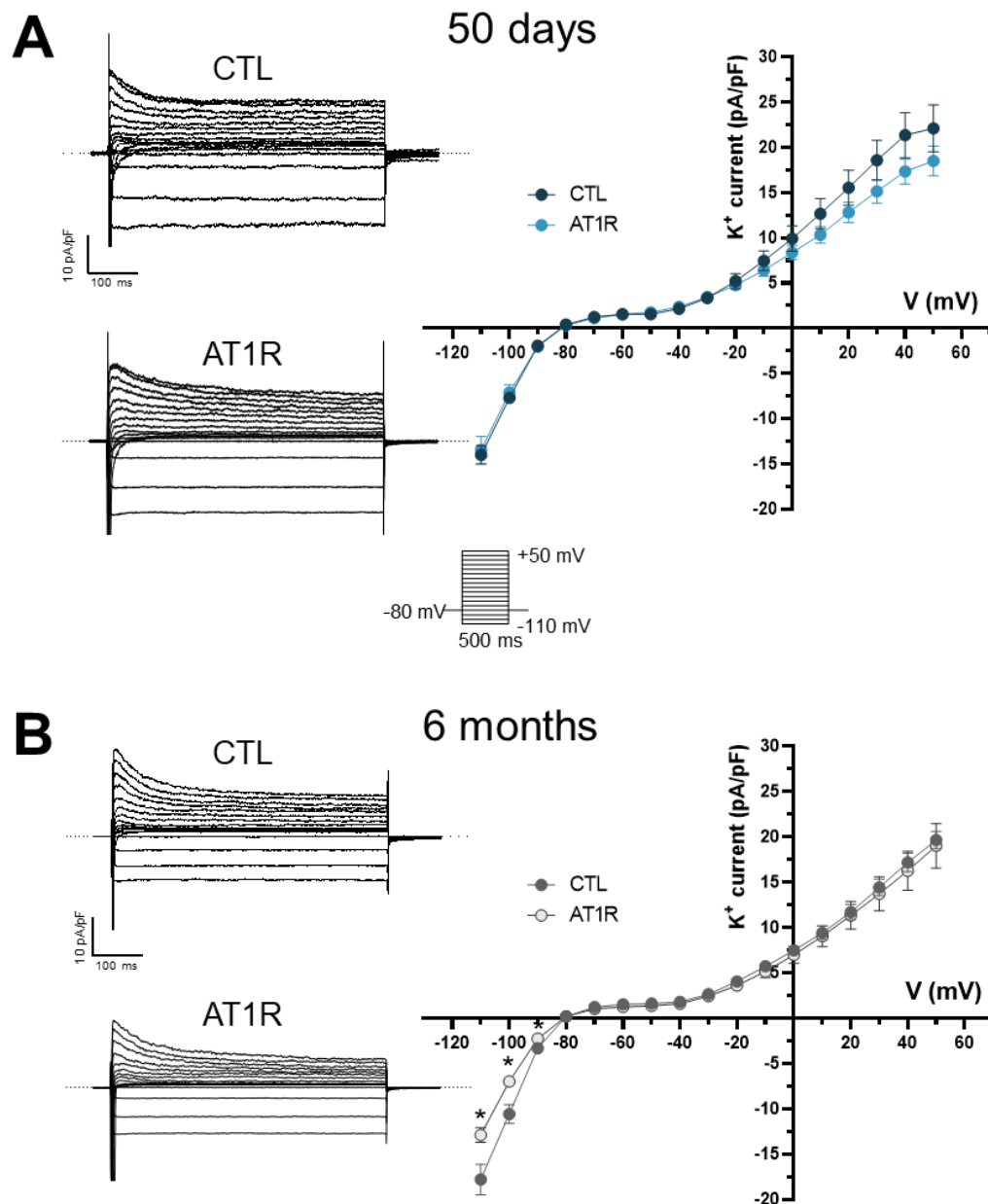
**Figure 3. AT1R overexpression does not affect sodium channel expression, but increases PKC $\alpha$  sarcolemmal protein expression**

(A-B) Scn5a mRNA expression is similar at 50d in AT1R mice compared to CTL (n=6; p=0.1053) but is reduced at 6m (n=6; \*p<0.0001). However, Nav1.5 protein expression is unaffected at both 50d (16 atria/n, n=3; p=0.1002) and 6m (p=0.1782). (C) Western blot analysis shows an increase in sarcolemmal PKC $\alpha$  protein expression AT1R mice compared to CTL at 50d (10 left atria were pooled per n; n=3/group; \*p=0.0081) and at 6m (7 left atria were pooled per n; n=3/group; \*p=0.0375). Film-free chemiluminescence protein signal was normalized by the total protein content using stain-free quantification for this figure and fig.6 (see methods supplements for details).



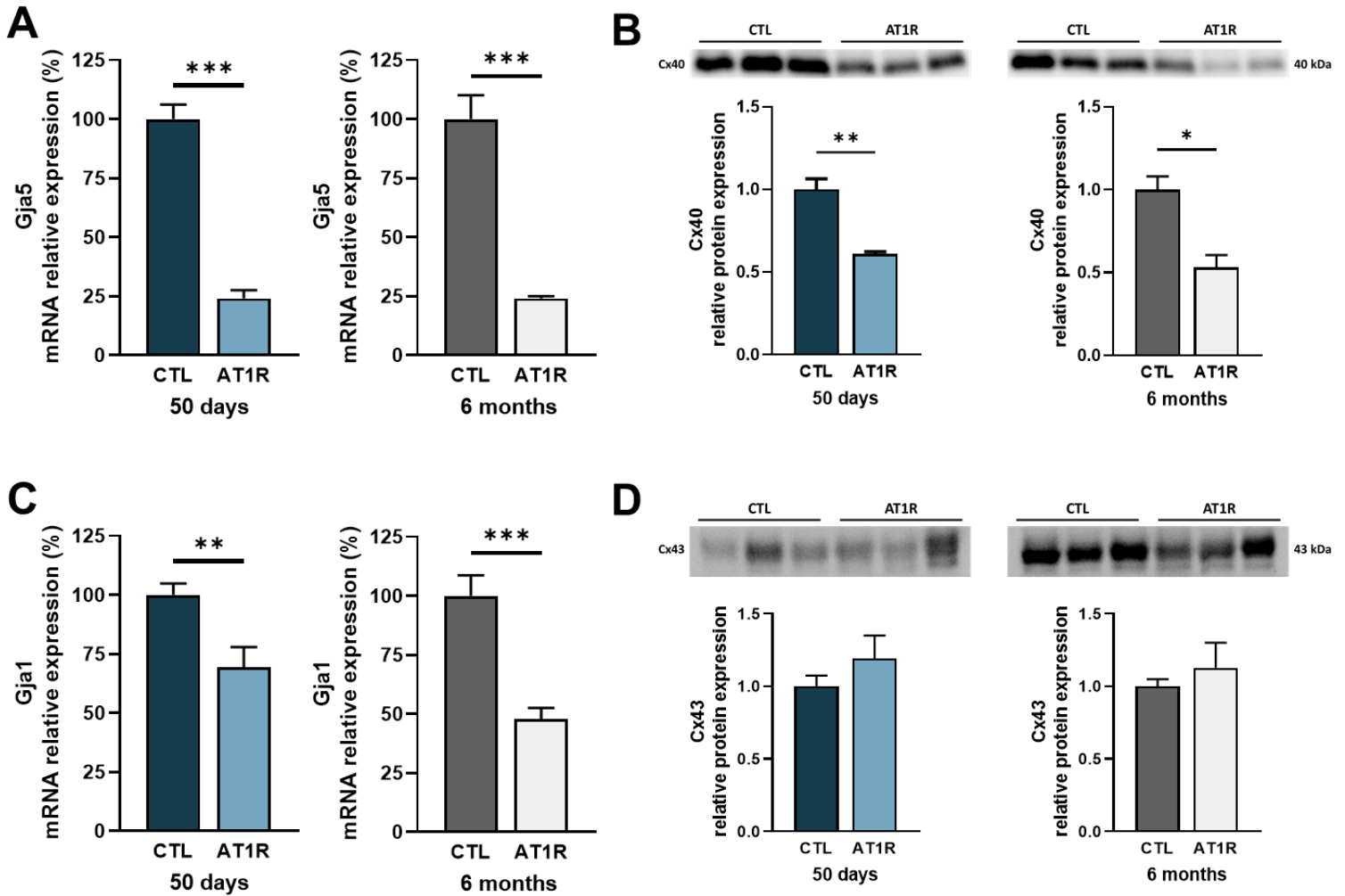
**Figure 4.**  $I_{CaL}$  density and *Cacna1c* mRNA expression are reduced only by hypertrophy

(A-B) (Left) Typical  $I_{CaL}$  recordings in left atrial myocytes of CTL and AT1R mice (voltage protocol shown in inset). (Right) Mean  $I_{CaL}$  I-V curve show a reduction of  $I_{CaL}$  density in AT1R only at 6m (CTL: n=28; AT1R: n=26; \* $p$ <0.05), whereas the current density is similar at 50d (CTL: n=21; AT1R: n=25;  $p$ =ns). (C-D) *Cacna1c* mRNA expression in AT1R mice compared to CTL is similar at 50d (CTL: n=3; AT1R: n=4;  $p$ =0.8247) and reduced at 6m (n=4; \* $p$ =0.0399).



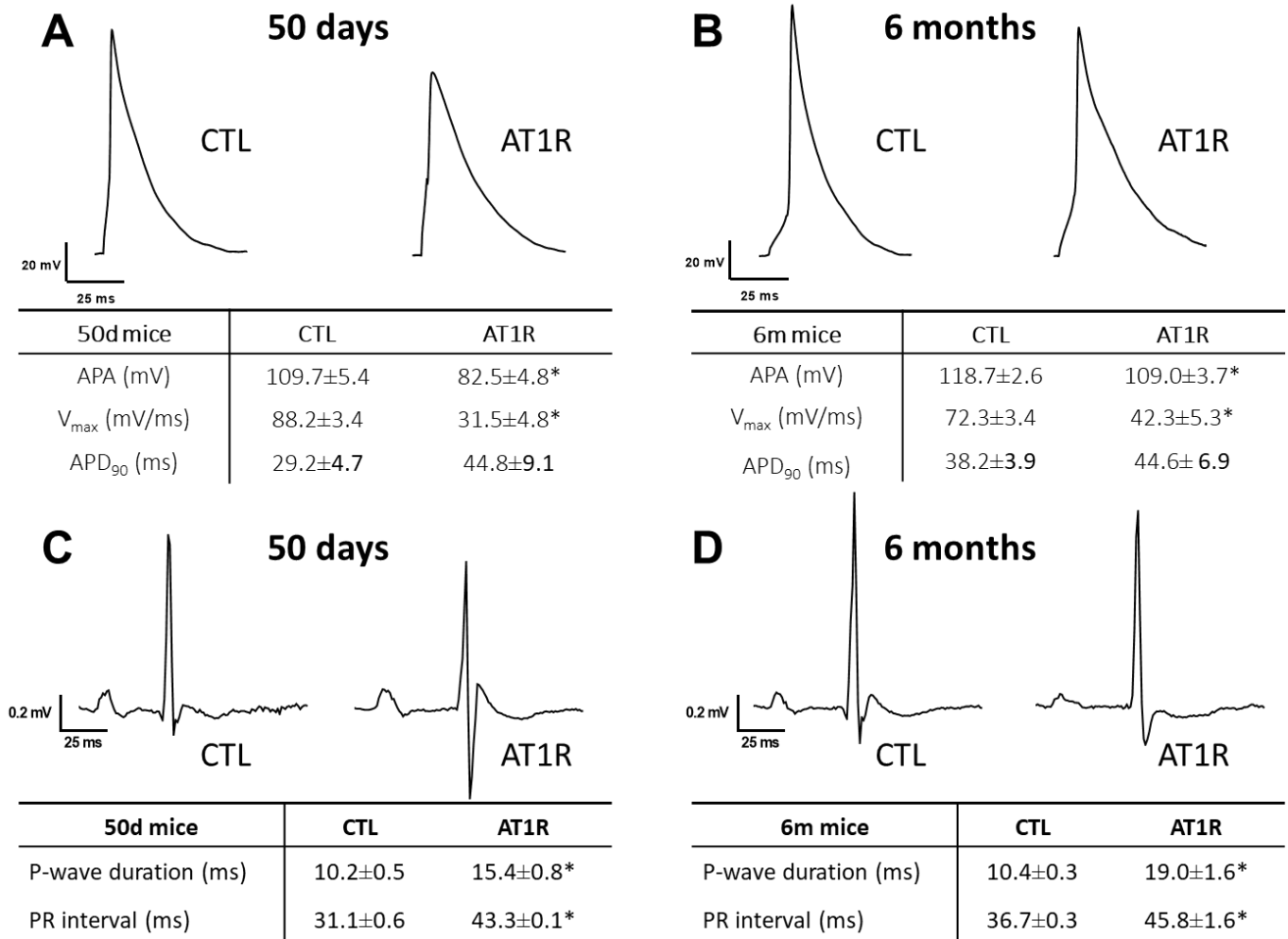
**Figure 5.** K<sup>+</sup> currents in left atrial myocytes of CTL and AT1R mice

(A-B) (Left) Typical recordings of total K<sup>+</sup> currents in left atrial myocytes of CTL and AT1R mice in both age groups obtained with the voltage protocol shown in inset. (Right) Mean K<sup>+</sup> I-V relationships show no difference in K<sup>+</sup> currents between CTL and AT1R mice at 50d (CTL: n=17, AT1R: n=13). At 6m, there was no difference in the density of the outward K<sup>+</sup> current between the two groups, but a significant reduction in the inward current (I<sub>K1</sub>) between -110 and -90mV (6m: CTL: n=15, AT1R: n=9) was observed in AT1R mice.



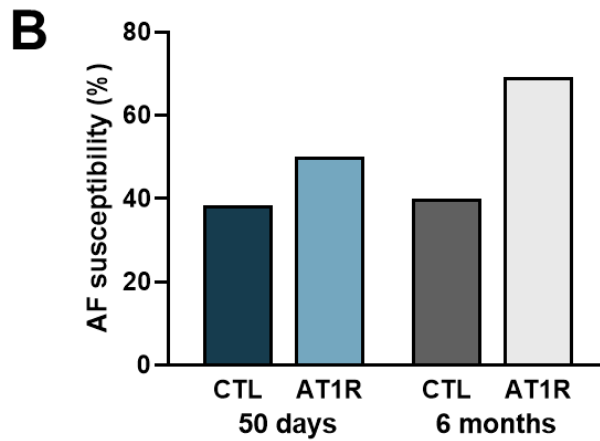
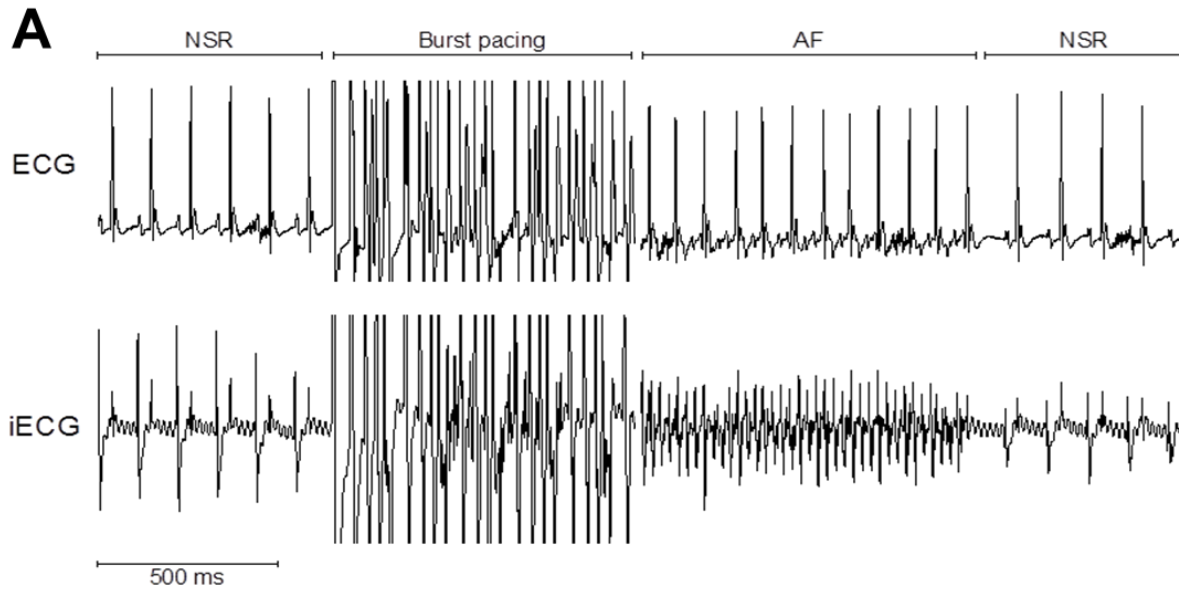
**Figure 6. Cx40 mRNA and protein expression is reduced to similar extent in AT1R mice of both age groups but Cx43 protein expression is not affected**

(A) Both atrial Gja5 (Cx40) mRNA expression (50d and 6m: n=6; \*p<0.0001) and (B) Cx40 protein expression (50d: \*p=0.0041, 6m: \*p=0.0129; n=3/group) are reduced in AT1R mice compared to their respective CTL at both ages. (C) qPCR results show a reduction in Gja1 (Cx43) mRNA expression in 50d and 6m AT1R mice (50d: \*p=0.0068, 6m: \*p=0.0002; n=6/group). (D) However, Cx43 protein expression was not changed by AT1R overexpression (50d: p=0.3329, 6m: p=0.5134; n=3/group).



**Figure 7. Alteration of ECG and AP parameters related to atrial conduction in 50d and 6m CTL and AT1R mice**

(A-B) Typical action potential (AP) recorded from isolated atrial myocytes of 50 days (CTL: n=15, AT1R: n=10) and 6 months (CTL: n=21, AT1R: n=15) mice. Associated tables show measurements of AP parameters (mean±SEM). AP amplitude (APA) and maximal velocity of AP upstroke ( $V_{max}$ ) were reduced at both ages by AT1R overexpression (APA: 50d: \*p=0.0012, 6m: \*p=0.0295) ( $V_{max}$ : 50d: \*p=0.0002, 6m: \*p<0.0001), while the AP duration at 90% of repolarization (APD<sub>90</sub>) was similar between AT1R and CTL mice (50d: p=0.0946, 6m: p=0.3801). (C-D) Typical recording of surface ECG from CTL and AT1R mice. The associated tables show mean±SEM values of PR interval and P-wave duration. AT1R overexpression is associated with prolonged PR interval (50d: \*p<0.0001, 6m: \*p=0.0008) and P-wave duration (50d and 6m: \*p<0.0001) in surface ECG at both 50 days (CTL: n=11, AT1R: n=7) and 6 months (n=9/group).



**Figure 8. AT1R overexpression tends to favor AF vulnerability**

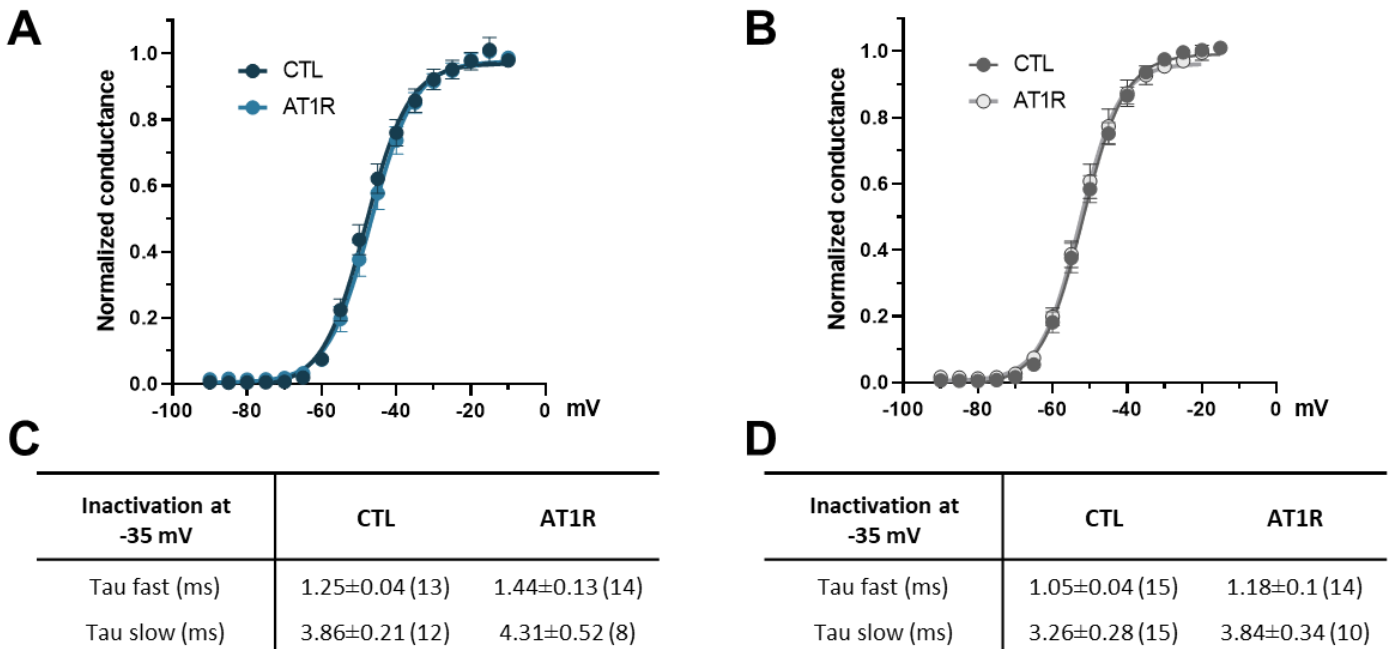
(A) Typical recordings of surface ECG and intracardiac electrophysiological recordings (iECG) on a 6m mouse that experiences AF episode after a burst pacing protocol followed by a return to normal sinus rhythm (NSR). (B) Although the increase did not reach statistical significance, AF incidence was slightly increased in 50d AT1R mice and more markedly at 6m. Pearson's chi-squared test was used to assess statistical significance.

Supplemental material

Supplemental table 1. Circulating ANGII levels are similar between CTL and AT1R mice at 50d and 6m

Plasma ANGII concentration (ng/mL)	50d	6m
CTL	0.20±0.04 (5)	0.10±0.04 (6)
AT1R	0.15±0.07 (3)	0.13±0.03 (6)

Values represent mean±SEM and p-values \*<0.05 vs CTL, “n” are in parenthesis.



Supplemental figure 1. Activation and inactivation kinetics parameters are not affected by AT1R overexpression

(A) and (B) At both ages, neither the voltage at half-maximal activation ( $V_{1/2}$ ) (50d: CTL: -47.2±1.4 mV, AT1R: -46.6±1.3 mV, p=0.7721; 6m: CTL: -51.6±1.1 mV, AT1R: -50.8±1.5 mV, p=0.6488) nor the slope factor (50d: CTL: 6.0±0.5, AT1R: 5.2±0.3, p=0.2208; 6m: CTL: 5.3±0.2, AT1R: 5.1±0.3, p=0.5430) were affected by AT1R overexpression. Activation kinetics parameters



were obtained from the activation curves fitted to Boltzmann equation. **(C) and (D)** Summary tables show that inactivation kinetics are similar between CTL and AT1R mice at both 50d (at -35 mV, Tau fast:  $p=0.1676$ , Tau slow:  $p=0.3526$ ) and 6m (at -35 mV, Tau fast:  $p=0.1817$ , Tau slow:  $p=0.1813$ ). Values represent mean $\pm$ SEM and p-values  $<0.05$  vs CTL, “n” are in parenthesis.

### 3. DISCUSSION

#### 3.1 Résumé des principaux résultats

La suractivation du système rénine-angiotensine est associée avec un risque accru de fibrillation auriculaire. Cependant, les mécanismes par lesquels l'angiotensine II affecte directement l'électrophysiologie cardiaque, indépendamment de ses effets hémodynamiques, sont encore peu connus. Ainsi, l'objectif principal de ce projet était d'étudier les remodelages électriques induits par le SRA chez les souris AT1R, avant et après le développement de remodelages structurels. De plus, ce projet visait à déterminer l'implication des remodelages auriculaires dans la susceptibilité à la fibrillation auriculaire. Plus spécifiquement, ma contribution à ce projet était centrée sur les paramètres pouvant modifier la conduction auriculaire, soit la fibrose, les connexines et les mécanismes modulant le courant sodique ( $I_{Na}$ ).

En bref, les souris AT1R de 50 jours n'expriment aucun remodelage structurel, bien qu'une réduction du courant sodique, ainsi qu'une réduction des connexines 40 est déjà présente à cet âge. Ces changements électrophysiologiques affectent la conduction auriculaire, qui se reflètent sur les ECG par la prolongation de la durée de l'onde P et de l'intervalle PR. Ces changements sont directement associés avec la surexpression d'AT1R.

À 6 mois, les souris AT1R ont un remodelage structurel bien présent et montrent une diminution du  $I_{Na}$  et des connexines 40 et 43 similaires à ce qui a été observé chez les souris AT1R de 50 jours. Ces remodelages électriques et structurels sont associés à une augmentation de la durée de l'onde P et de l'intervalle PR encore plus grande que dans le groupe 50 jours. Aussi, une diminution du courant calcique de type L ( $I_{CaL}$ ) est présent uniquement chez les souris AT1R de 6 mois, suggérant que le changement dans ce courant est induit par la présence de remodelage structurel, puisqu'il était inchangé à 50 jours. D'ailleurs les courants calciques de type L sont connus pour être modulés par la présence de fibrose.

Les remodelages auriculaires induits par la surexpression d'AT1R, qui sont observés dans les deux groupes d'âges, sont associés à une altération de la conduction électrique pro-arythmique, mais également avec une certaine augmentation de la susceptibilité à la fibrillation auriculaire en réponse aux stimulations électrophysiologiques programmées (EPS).

### 3.2 Développement de la fibrose chez les souris AT1R

Les souris AT1R développent un remodelage structurel ventriculaire qui apparaît graduellement après l'âge de 60 jours.(63,65,66,73) Dans les oreillettes, le remodelage structurel, présent uniquement chez les souris AT1R de 6 mois, a été défini par l'augmentation de la capacitance cellulaire, de l'expression en ARNm du facteur natriurétique auriculaire (ANP) et de la fibrose interstitielle. Le remodelage structurel est l'un des principaux substrats de la fibrillation auriculaire, puisqu'il a un rôle néfaste sur la conduction dans les oreillettes (voir **Section 1.2.2**). Brièvement, la présence de fibrose altère la propagation longitudinale normale de l'influx électrique et peut créer des blocs de conduction et l'initiation et le maintien de circuits de réentrées dans l'oreillette. Ainsi, les données de rouge Sirius ont permis de valider que les groupes d'âge choisis discriminaient adéquatement les effets qui sont induits directement par la suractivation du SRA (50 jours), de ceux secondaires à la présence de remodelage structurel (6 mois).

Les mécanismes menant au développement de fibrose dans les souris AT1R sont encore inconnus. L'hypothèse est que des changements dans la transcription de gènes sont déjà présents dans les souris plus jeunes, même si la fibrose n'est pas encore installée. Ainsi, j'ai étudié l'expression génique de plusieurs marqueurs de fibrose dans les groupes 50 jours et 6 mois afin de mieux comprendre quels mécanismes sont activés par AT1R, menant à la fibrose. L'**Annexe 1** montre la liste des gènes qui ont été étudiés dans ce projet de maîtrise et qui peuvent intervenir dans le remodelage de la matrice extracellulaire, ainsi que leurs séquences d'oligonucléotides utilisées en qPCR. Tel que mentionné dans l'introduction (**Section 1.2.2.2**), la fibrose est formée d'une accumulation de collagène dans la matrice extracellulaire en réponse à un signal profibrotique.

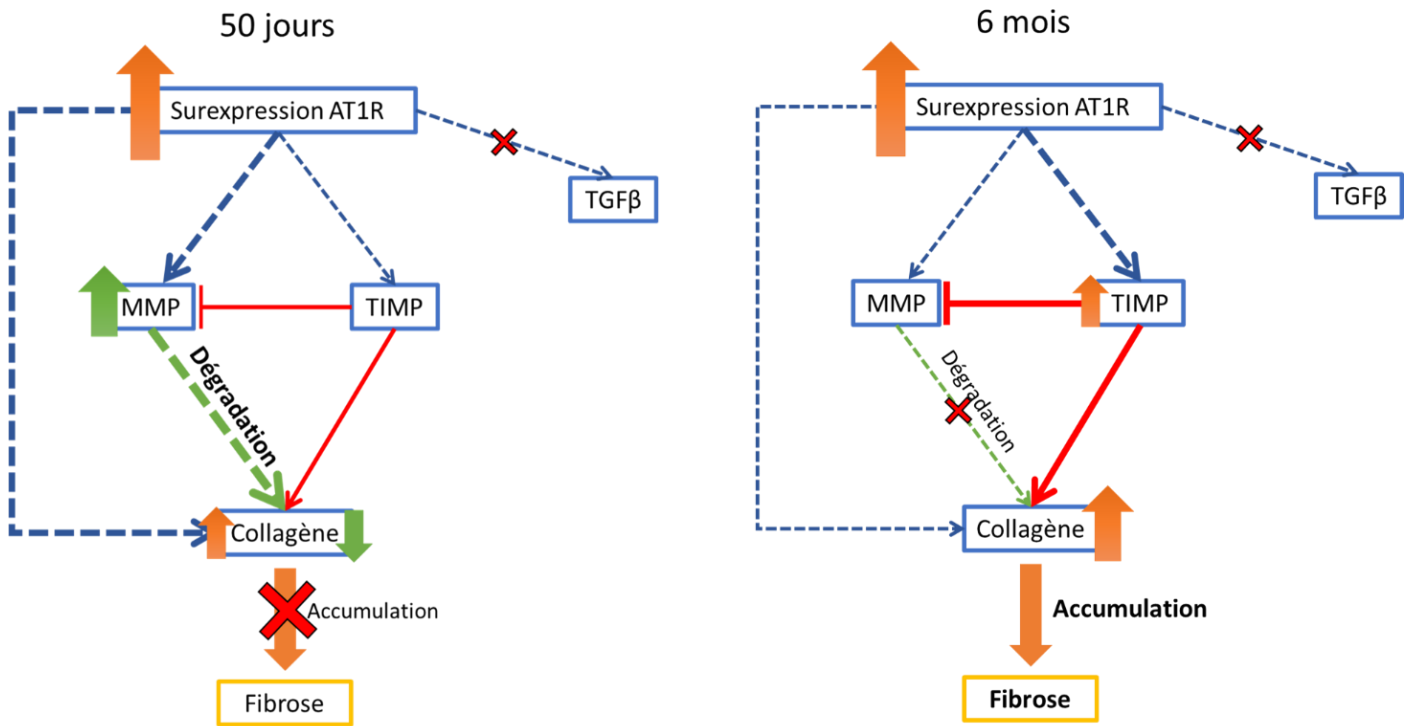
Brièvement, une augmentation de la transcription des gènes du collagène (Col1a1 et Col3a1) peut causer une accumulation de la matrice extracellulaire et former la fibrose. De plus, l'homéostasie du collagène dans la matrice extracellulaire peut être altérée par un déséquilibre de l'expression ou de l'activité des MMP/TIMP. Au niveau cardiaque, plusieurs types de MMP et TIMP sont retrouvés, dont les TIMP1, TIMP2 et TIMP3(108), ainsi que les MMP1, MMP2 et de nombreuses autres formes de MMP(109). Bien que le rôle spécifique de chaque isoforme des MMP et des TIMP varie légèrement, leur principale fonction reste conservée. En effet, les MMP

ont pour rôle la dégradation du collagène pour éviter l'accumulation pathologique de la matrice extracellulaire et l'activation des MMP peut induire une cascade inflammatoire néfaste.(109) Les TIMP régule l'activité des MMP afin d'éviter une trop grande protéolyse menant à une perte pathologique de la matrice extracellulaire. Il a été démontré qu'une augmentation pathologique des TIMP menait à l'accumulation de la matrice extracellulaire, plus spécifiquement au développement de fibrose.(108) La transcription de la MMP est finement régulée et mène à une protéine sous forme de proenzyme, soit une pro-MMP. Elle doit donc être activée en MMP pour dégrader la matrice extracellulaire. Il est à noter que des facteurs pro-fibrotique, incluant l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA) est capable d'activer les MMP.(109) D'ailleurs une étude suggère que l'utilisation d'inhibiteurs d'ECA pourrait réduire la dégradation exagérée de la matrice extracellulaire dans des cardiomyopathies dilatées et ralentir l'activation d'une cascade inflammatoire induite par les MMP.(109)

À la **Figure 12**, le mécanisme suggéré du développement de la fibrose chez les souris AT1R est présentée et est basée sur les résultats de qPCR obtenus à partir d'ARNm isolés d'oreillettes (**Annexe 2**). Pour ces expériences de qPCR, il est à noter que l'ARNm a été isolé des deux oreillettes alors que la quantification histologique n'a été réalisée que sur l'oreillette gauche. Brièvement, les résultats montrent que l'expression génique de plusieurs facteurs pro-fibrotique est déjà augmentée à 50 jours, bien que la quantification du rouge Sirius ne montre aucun changement de la fibrose tissulaire.

L'augmentation de l'expression des gènes codant pour les collagènes 1 et 3, mais l'absence de fibrose chez les souris 50 jours, peut s'expliquer par l'expression du MMP2 qui est aussi augmentée à cet âge. En effet, l'hypothèse est que l'excès de collagène est dégradé par les MMP et donc ne s'accumule pas dans la matrice extracellulaire. Cependant, à 6 mois, l'expression du TIMP1 est augmentée, suggérant une inhibition du MMP2 et donc une inhibition de la dégradation de l'excès de collagène. Ceci mènerait à la fibrose interstitielle observée en rouge Sirius à cet âge. De plus, l'expression du TGF $\beta$ 1 est inchangée dans les deux groupes d'âge, suggérant que la surexpression du AT1R n'affecte pas cette voie de signalisation au niveau transcriptionnel. Cependant, il est possible que des changements post-traductionnel dans la voie du TGF $\beta$  puissent être affectés par AT1R et mener au développement de fibrose, comme précédemment mentionné à

la **Section 1.2.2.2**. D'autres expériences seront nécessaires pour comprendre l'effet de la surexpression d'AT1R sur TGFβ, entre autres, au niveau protéique.



**Figure 12 : Simplification des mécanismes proposés du développement de fibrose à 50 jours et 6 mois basés sur les résultats de qPCR (présentés en Annexe 2)**

En bref, l'expression relative en ARNm pour les gènes du collagène est augmentée seulement à 50 jours. Cependant, l'augmentation de l'expression du MMP2 empêche l'accumulation de collagène dans la matrice extracellulaire. À 6 mois, l'augmentation de l'expression du TIMP1 inhibe la dégradation du collagène par les MMP, résultant en des dépôts de collagène tissulaire, même en absence d'augmentation de l'expression des gènes du collagène. L'expression génique de TGFβ n'est pas modifiée par la surexpression d'AT1R. Sur le schéma, les flèches bleues indiquent l'induction du gène par de la surexpression d'AT1R et lorsque les flèches sont en gras, il y a une augmentation de l'expression. Les flèches en vert montrent une action dégradative du collagène et en rouge une action accumulatrice. La conséquence sur le paramètre est indiquée par les grosses flèches vertes et orange. Les « X » signifient l'absence d'effets transcriptionnels entre les deux composantes. AT1R; récepteur de type I à l'angiotensine II, MMP; métalloprotéase, TIMP; inhibiteur des métalloprotéases, TGFβ; facteur de croissance transformant bêta.

Tel que mentionné, seules les composantes présentées dans l'**Annexe 1** ont été investiguées dans ce projet pour comprendre comment la suractivation d'AT1R mène au développement de fibrose. Cependant, de multiples autres voies de signalisation et d'autres composantes peuvent mener à des dépôts de collagène. Par exemple, il serait intéressant d'investiguer l'implication de la périostine, une protéine impliquée dans la production de matrice extracellulaire et dont l'augmentation a été associée à certaines maladies cardiovasculaires. En effet, Hakuno et al. ont montré une augmentation du MMP2 par la périostine dans un modèle de maladie dégénérative des valves cardiaques. De plus, leur souris déficiente en périostine avait une atténuation de la fibrose et n'avait pas d'augmentation du MMP2.(110) Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) sont également des cibles intéressantes puisqu'ils peuvent moduler la production de la matrice extracellulaire, entre autres par leur interaction avec les fibroblastes, particulièrement au niveau des oreillettes.(27,31) L'étude de ces composantes aiderait à mieux caractériser le développement de la fibrose dans les souris AT1R, bien que de nombreux autres facteurs puissent aussi l'influencer.

Une meilleure connaissance des mécanismes menant à la formation de fibrose permettrait de comprendre comment une surexpression cardiomyocyte-spécifique d'AT1R mène à la formation de fibrose et d'hypertrophie cardiaque. Une des hypothèse est l'action paracrine des cardiomyocytes sur les fibroblastes.(73) En effet, la cascade de signalisation d'AT1R dans les cardiomyocytes induit la transcription de plusieurs facteurs, dont certains pouvant modifier l'activité des fibroblastes en myofibroblastes. Ces derniers sont impliqués à la production de matrice extracellulaire.(31,111) Par exemple, l'activation du récepteur AT1 induit la signalisation des MAP kinases, des ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), des kinases Raf-1, des tyrosine kinases et plusieurs autres voies pro-fibrotiques. Ces voies induisent la transcription de gènes pro-fibrotiques, comme *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1*, ainsi que la transcription de l'ANP.(112)

Une autre hypothèse se base sur des données rapportées par certaines études qui montrent qu'une altération du courant sodique pouvait induire le développement de fibrose ainsi qu'induire l'apoptose cellulaire.(113–115). Or, dans notre modèle de souris AT1R, nous avons rapporté plusieurs changements dans l'électrophysiologie cardiaque, dont une diminution du courant sodique, présent dès 50 jours, soit en absence de remodelage structurel. Ainsi, Frustaci et al., ainsi que Coronel et al. ont observé une augmentation de la fibrose et de la mort cellulaire résultant d'une

fonction anormale du canal sodique chez des patients portant une mutation du *Scn5a* associée au syndrome de Brugada.(114,115) Ces études suggèrent que l'altération structurelle ventriculaire des patients survient suite à l'altération de la fonction du canal et indépendamment de la survenue arythmies cardiaques. Il est donc possible que la diminution du courant sodique, observée chez les souris AT1R dès l'âge de 50 jours, puisse contribuer à la formation de fibrose dans les oreillettes.

En bref, ce projet de maîtrise a permis de confirmer la présence de fibrose chez les souris AT1R de 6 mois et d'établir l'impact de ce remodelage structurel sur la prolongation de la durée de l'onde P. De plus, les données de ce projet soulignent que l'absence de remodelage structurel chez les souris 50 jours permet d'attribuer les remodelages électriques observés directement avec l'activation du SRA. Les données de qPCR présentées dans cette discussion suggèrent une activation précoce de la signalisation pro-fibrotique et l'implication du remodelage électrique dans le développement de fibrose. D'autres expériences seront toutefois nécessaires pour bien comprendre les mécanismes pro-fibrotique présents chez la souris AT1R et les voies de signalisation qui sont impliquées.

### **3.3 Régulation du courant sodique auriculaire**

Dans cette étude, nous avons montré une diminution significative d'environ 60% du courant sodique ( $I_{Na}$ ) à 50 jours et à 6 mois chez les souris AT1R. La diminution du courant sodique contribue à la diminution de la conduction dans l'oreillette menant à la fibrillation auriculaire. Il est à noter que le remodelage structurel ne semble pas avoir un effet sur le courant sodique puisque la diminution du courant observée à 50 jours et à 6 mois est similaire.

L'expression du gène *Scn5a*, sous-jacent le canal sodique, est inchangée à 50 jours mais diminuée de manière significative à 6 mois. Ainsi, seule la présence de remodelage structurel affecte la transcription du canal, mais ceci n'apporte aucun effet sur l'expression protéique ni sur le courant. En effet, la diminution du courant sodique à 6 mois n'est pas amplifiée par la perte d'expression du gène *Scn5a*. La régulation du courant sodique ne se fait donc pas de manière transcriptionnelle puisque le courant est déjà diminué à 50 jours, sans réduction de l'expression du canal.

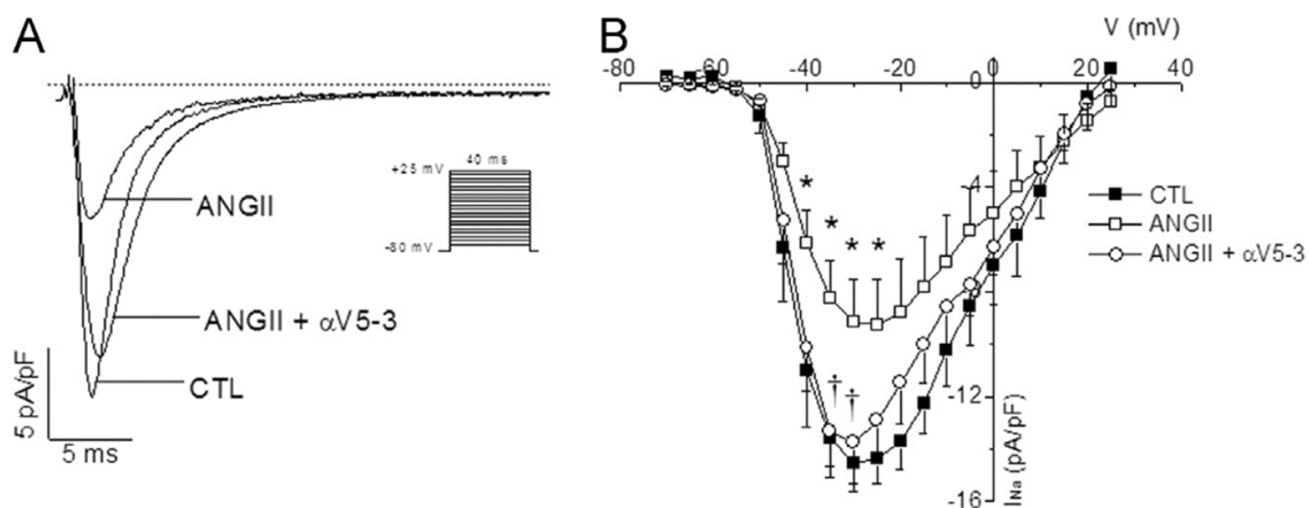
L'absence d'effet fonctionnel lié à la réduction de l'expression génique du canal à 6 mois suggère que la souris AT1R n'utilise, de manière physiologique, qu'une partie de ses canaux sodiques. Ainsi, lorsque la quantité de canaux sodiques totale est diminuée, le courant résultant n'est pas affecté, puisque des canaux de réserve peuvent être recrutés. D'ailleurs certaines études ont rapporté la présence de banques de canaux sodique de réserve situées au niveau de la face intracellulaire de la membrane sarcolemmale et dans le réticulum endoplasmique des cardiomyocytes. Ces réserves de canaux sodiques peuvent être acheminées à la membrane sarcolemmale à la suite d'une stimulation. Par exemple, l'activation de la PKA peut initier au recrutement de ces canaux de réserve à la membrane sarcolemmale.(113,116,117)

En 2016, notre laboratoire a rapporté des données similaires de réduction du courant sodique sur des cardiomyocytes isolés des ventricules de souris AT1R.(63) Dans cet article, les auteurs avaient observé une diminution de l'expression génique et protéique du canal sodique ventriculaire uniquement chez les souris AT1R de 6 mois. Cependant, ces changements d'expression n'affectaient pas la diminution du courant sodique à 6 mois par rapport à 50 jours. Dans le projet présent portant sur les oreillettes des souris AT1R, nous avons observé des données similaires à celles rapportés en 2016.

Pour comprendre les mécanismes responsables de la réduction du courant sodique dans les ventricules des souris AT1R, notre laboratoire avait investigué l'action des PKC. Il existe un site connu de phosphorylation des PKC sur le canal  $Na_v1.5$ , soit la S1503, qui se situe sur la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV du canal.(118) Notre laboratoire, ainsi que certains autres, ont démontré que les PKC pouvait être activées par la signalisation d'AT1R et que la phosphorylation du canal sodique réduisait le courant résultant.(48,49,63) Plus précisément, notre laboratoire a rapporté qu'une activation, non-spécifique pour un isoforme en particulier, des PKC par la « phorbol 12-myristate 13-acetate » (PMA) réduisait le courant sodique dans des cardiomyocytes ventriculaires contrôlés.(63) Dans cet article de Mathieu et al., notre laboratoire a investigué l'activation des différents isoformes de la PKC en quantifiant par Western Blot, la translocation des PKC à la membrane sarcolemmale.(63) Tel que mentionné à la **Section 1.2.3.1.2** de l'introduction, les PKC se trouvent sous forme inactive dans le cytosol et lorsqu'activées vont être transloquées à la membrane où elles pourront affecter l'activité des canaux  $Na^+$ . Dans ce modèle de souris AT1R, seule la PKC $\alpha$  était augmentée à la membrane sarcolemmale ventriculaire,



suggérant son implication dans la régulation du courant sodique induit par le SRA. Les autres isoformes avaient des niveaux protéiques inchangés dans la fraction sarcolemmale.(63) Par la suite, l'utilisation d'un peptide inhibiteur de la translocation de PKC $\alpha$  ( $\alpha$ V5-3) sur des cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC-CM – *Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*) a montré qu'en empêchant la translocation de la PKC $\alpha$ , on prévenait la réduction du  $I_{Na}$  induite par un traitement d'angiotensine II (**Figure 13**).(63) Cette expérience a aussi montré la transposabilité du mécanisme de régulation du courant sodique par la PKC $\alpha$  dans un modèle de cellules cardiaques humaines.



**Figure 13 : Impact de l'angiotensine II (ANGII) et d'un peptide inhibiteur de la translocation de la PKC $\alpha$  ( $\alpha$ V5-3) sur le courant sodique de cellules hiPSC-CM**

(A) Enregistrement représentatif du courant sodique en mode voltage imposé pour les différentes conditions expérimentales. (B) Courbe courant-voltage. Le traitement d'angiotensine II sur les hiPSC-CM induit une réduction du courant sodique. La perfusion d'un peptide inhibiteur de la translocation du PKC $\alpha$  ( $\alpha$ V5-3) prévient la diminution du courant sodique induite par l'angiotensine II. Ces données suggèrent l'implication de la PKC $\alpha$  dans la réduction du courant sodique induite par l'angiotensine II. ANGII; angiotensine II, PKC $\alpha$ ; protéine kinase C alpha,  $\alpha$ V5-3; peptide inhibiteur de la translocation de la PKC $\alpha$ , hiPSC-CM; cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (Données et figure tirées de Mathieu et al. (63))

Bien que la régulation des courants ioniques puisse différer entre les chambres cardiaques, le mécanisme proposé par Mathieu et al. semble aussi responsable de la diminution du  $I_{Na}$  dans les oreillettes. En effet, dans le projet faisant l'objet de ce mémoire de maîtrise, une augmentation de l'expression protéique de la PKC $\alpha$  dans la fraction sarcolemmale a aussi été observée dès 50 jours. Des expériences de patch-clamp similaires à celles effectuées par Mathieu et al. pourraient confirmer, au niveau fonctionnel, l'implication de la PKC $\alpha$  dans les cellules auriculaires des souris AT1R et confirmer l'absence d'effets des autres isoformes de la PKC.

En accord avec nos résultats, une étude récente de Jansen et al., qui étudie l'effet d'un traitement chronique d'angiotensine II dans un modèle murin en lien avec la fibrillation auriculaire, rapporte une activation de la PKC $\alpha$  dans les oreillettes, associée avec une diminution du courant sodique.(119) Ces données renforcent l'hypothèse que la PKC $\alpha$  est responsable de la diminution du courant sodique observée dans notre modèle. Cependant, le modèle de Jansen et al. montrait également davantage d'altérations électrophysiologiques que ce qui est observé dans notre étude. Ceci peut s'expliquer par les effets systémiques de l'angiotensine II présents dans leur modèle expérimental. La **Section 3.6** décrit plus en détails les principales différences observés entre certains modèles d'angiotensine II.

En bref, le mécanisme décrit par Mathieu et al. et par Jansen et al., ainsi que les données de ce projet sur l'expression protéique auriculaire de la PKC $\alpha$  dans la fraction sarcolemmale, indiquent fortement l'implication de cette protéine dans la régulation du courant sodique. Cette régulation serait directement induite par la suractivation du SRA, puisqu'elle est présente dès l'âge de 50 jours.

### **3.4 Impacts de la surexpression d'AT1R sur les connexines**

Les connexines 40 et 43 sont essentielles à la propagation normale de l'influx électrique entre deux cellules adjacentes dans les oreillettes. Dans ce projet, nous avons rapporté une diminution de l'expression génique des Cx40 et Cx43, ainsi qu'une diminution de l'expression protéique de la Cx40, suggérant l'altération de la conduction auriculaire. De plus, ces diminutions

n'étaient pas affectées par la présence de remodelage structurel, puisqu'elles ont été observées dès l'âge de 50 jours.

### **3.4.1 Contribution des connexines dans la conduction auriculaire menant à la fibrillation auriculaire**

Plusieurs laboratoires ont étudié l'expression des connexines dans des modèles de fibrillation auriculaire.(30,36,119,120) Globalement, ces études indiquent qu'une diminution de la Cx40 ou qu'une latéralisation des Cx40 et 43 étaient observées dans la plupart des modèles expérimentaux de fibrillation auriculaire. Cependant, la contribution réelle des connexines dans le développement de la fibrillation auriculaire est difficile à déterminer, puisqu'à prime abord, des résultats contradictoires sont rapportés entre certaines études. Ainsi, la comparaison de ces études est nécessaire pour comprendre l'impact fonctionnel des connexines en contexte de fibrillation auriculaire.

Des études sur des modèles murins ont rapporté une diminution des connexines menant à la fibrillation auriculaire.(36,119) Par exemple, Hagendorff et al. ont rapporté l'implication essentielle de la Cx40 dans la conduction auriculaire et une altération de la conduction chez les souris qui en sont déficientes, menant à la fibrillation auriculaire.(36) Ces études concordent avec les résultats obtenus dans ce mémoire. Cependant, une autre étude a montré une augmentation de l'expression auriculaire des Cx43 dans un modèle canin de fibrillation auriculaire.(120) Alors que van der Velden et al. ont rapporté un changement dans la proportion des Cx40 par rapport au Cx43 dans les oreillettes dans un modèle de chèvre souffrant de fibrillation auriculaire, mais aucun changement au niveau de l'ARNm n'a été observé.(121) Les études effectuées sur des patients FA montrent, quant à elle, des résultats tout aussi contradictoires puisque certaines rapportent une diminution d'expression des connexines (30), mais que d'autres rapportent une augmentation.(12)

Les différences des résultats rapportées entre les études, mais aussi avec les résultats obtenus dans ce mémoire, peuvent s'expliquer par plusieurs différences techniques et en lien avec les modèles expérimentaux.

- (1) *Les modèles expérimentaux ne sont pas les mêmes.* Bien que les modèles animaux soient utiles pour comprendre les mécanismes sous-jacents à une maladie, des différences dans l'électrophysiologie cardiaque et dans la régulation de la conduction existent entre les

différents animaux et aussi avec l'humain. En effet, la contribution de différents types de connexines peut donc varier selon l'espèce, résultant en des données différentes.

(2) *Il y a plusieurs mécanismes menant à la fibrillation auriculaire.* La fibrillation auriculaire est associée avec des remodelages électriques et structurels des oreillettes. Cependant, la fibrillation auriculaire est une pathologie complexe qui peut être induite par de nombreux facteurs de risque qui modulent les oreillettes. Ces facteurs de risque ne causent pas tous les mêmes remodelages des oreillettes, mais mènent au développement de l'arythmie. Ainsi, tout dépendant du facteur de risque à l'étude, les remodelages auriculaires induits, ainsi que leurs contributions dans le développement de la FA peuvent variés. Par exemple, dans notre modèle de suractivation du SRA, nous rapportons une diminution des Cx qui favorise la FA. Alors que van der Vendel et al. étudie la conséquence d'une FA chronique sur les propriétés de l'oreillette (phénomène de FA qui induit la FA) et montre des changements pro-arythmiques dans l'organisation des connexines.(121) Puisque les études présentées ici n'étudient pas les mêmes facteurs de risque qui induisent la fibrillation auriculaire, il est possible que les connexines soient différemment modulés et impliqués dans le développement de fibrillation auriculaire. Ainsi, différents facteurs de risque induisent différents remodelages.

(3) *L'expression des connexines n'a pas été mesurée dans la même oreillette ou dans la même partie de l'oreillette.* Les études humaines ont été effectuées sur l'oreillette droite des patients, tandis que ce mémoire et d'autres études animales ont investigué l'oreillette gauche. Ce point est particulièrement important puisque l'oreillette gauche est plus susceptible d'initier et maintenir la fibrillation auriculaire et que les remodelages auriculaires sont généralement beaucoup plus présents dans l'oreillette gauche.(16,119,121) Par contre, l'oreillette droite est plus accessible techniquement chez les patients pendant une chirurgie que l'oreillette gauche, expliquant l'utilisation de l'oreillette droite dans les études sur des tissus humains. Cependant, les deux études humaines mentionnées précédemment, n'ont pas investigué la même région de l'oreillette droite, ce qui peut expliquer les résultats contradictoires obtenus quant à l'expression des connexines.(12,30)

(4) *La localisation cellulaire des connexines peut influencer la conduction, mais n'a pas été investiguée dans toutes les études.* Bien que les données sur l'expression des connexines

varient d'une étude à l'autre, un consensus existe sur la latéralisation ou la désorganisation des connexines dans la cellule en fibrillation auriculaire. La modification de l'arrangement spatiale des connexines est un substrat connu de la fibrillation auriculaire puisqu'elle induit une propagation hétérogène de l'influx électrique. Une augmentation de l'expression des connexines peut être pro-arythmique si la quantité de connexines augmente sur les côtés latéraux des cardiomyocytes, plutôt qu'aux disques intercalaires. Par exemple, dans le modèle canin de fibrillation auriculaire d'Elvan et al., ils observent une certaine augmentation de l'expression des Cx43 auriculaires mais surtout une augmentation de leur latéralisation, expliquant le risque augmenté d'arythmie. Cependant, la distribution des connexines auriculaires n'a pas été étudiée dans ce mémoire et pourrait faire l'objet d'expériences futures.

(5) *Certaines études n'ont pas mesuré l'expression des deux connexines présentes dans les oreillettes.* Des études ont établi un lien fonctionnel plus important de la Cx40 dans la conduction auriculaire, que de la Cx43. En effet, la déficience en Cx40 rapportée par Hagendorff et al. réduisait la conduction auriculaire chez les souris (36), alors que la déficience en Cx43 rapportée par Thomas et al. n'avait aucun impact sur la conduction auriculaire (38). Ces données soulignent l'importance d'étudier les deux types de connexines afin de conclure sur la contribution de leur expression dans le développement de la fibrillation auriculaire.

Ainsi, les principales différences rapportées entre ces études montrent que la contribution des connexines peut varier entre les modèles, mais qu'en combinaison avec d'autres substrats de la FA, la diminution de l'expression des connexines peut mener au développement de fibrillation auriculaire.

### **3.4.2 Modulation de l'expression des connexines par le SRA**

Les PKC pourraient être impliquées dans l'altération de la conduction auriculaire induite par la suractivation du SRA. En effet, les données recueillies au cours de ce projet montrent une augmentation de l'expression de la PKC $\alpha$  auriculaire. Comme mentionné précédemment, les PKC sont connues pour être activées par la signalisation d'AT1R, et l'isoforme  $\alpha$  régule l'activité du canal sodique Nav1.5. Cependant, les PKC peuvent aussi agir sur d'autres protéines importantes pour la conduction auriculaire, comme les connexines.

Certaines études ont rapporté une altération du couplage cellule-cellule induit par l'action de la PKC sur la phosphorylation des connexines au niveau cardiaque.(122,123) Ce sont les connexines phosphorylées qui sont normalement fonctionnelles dans les disques intercalaires. Bowling et al. ont rapporté une interaction entre la PKC $\alpha$ , la PKC $\epsilon$  et la Cx43 au niveau des disques intercalaires ventriculaires, par co-immunoprécipitation. Ces données suggèrent que l'activité de ces protéines est interreliée. Dans cet article, ils ont observé une augmentation de l'expression de la PKC $\alpha$  dans les ventricules de patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Il est à noter qu'aucun changement d'expression de la PKC $\epsilon$  n'était observé, mais que le complexe PKC $\alpha/\epsilon$  régulait le processus de phosphorylation/déphosphorylation des Cx43, ce qui modulait son fonctionnement.(122) Ainsi, il est possible qu'un mécanisme semblable puisse altérer la fonction des connexines au niveau auriculaire, puisque nous avons déjà montré une augmentation de la PKC $\alpha$  chez les souris AT1R et une altération de la conduction. Cependant, les niveaux de phosphorylation/déphosphorylation des connexines n'ont pas encore été vérifiés chez les souris AT1R.

Les connexines et le courant sodique sont deux facteurs importants dans la conduction auriculaire et sont tous les deux altérés dans notre modèle de surexpression d'AT1R. En plus de jouer chacun un rôle indépendant sur la propagation de l'influx électrique, certaines études ont démontré une interaction entre le courant sodique et l'expression des connexines dans les disques intercalaires.(124–126) En effet, Desplantez et al. ont rapporté qu'une diminution de l'expression de la Cx43, menait à une diminution du courant sodique au niveau auriculaire, mais n'ont pas rapporté l'expression du canal sodique.(124) Ainsi, dans notre modèle AT1R, la diminution de l'expression des connexines pourrait contribuer à la réduction du courant sodique auriculaire, puisque ces deux composantes sont diminués dès l'âge de 50 jours. Cependant, dans une étude réalisée sur des ventricules de souris, Jansen et al. ont rapporté que la diminution de l'expression de la Cx43 induisait, en plus de la diminution du courant sodique, une diminution de l'expression protéique du canal Na<sub>v</sub>1.5.(125) Dans notre modèle AT1R, l'expression du canal sodique n'est pas diminuée à 50 jours et donc n'est pas responsable de la régulation du courant sodique déjà réduit à cet âge. Ces données suggèrent que si l'expression de la Cx43 altère l'expression de Na<sub>v</sub>1.5, l'effet n'est présent qu'à 6 mois et qu'aucune conséquence sur le courant sodique n'est présente. Cependant, ces études ne se sont pas penchées sur l'interaction de la Cx40 avec le courant sodique.

Puisque la Cx40 est majoritaire dans l'oreillette, il serait pertinent de comprendre son rôle sur le courant sodique.

En bref, les souris AT1R subissent des remodelages électriques qui altèrent la conduction auriculaire les rendant plus susceptibles à la fibrillation auriculaire. La suractivation du SRA affecte directement l'expression des connexines et la densité du courant sodique, indépendamment de la présence de remodelage structural. Les changements induits par AT1R au niveau cardiaque semblent être interreliés et contribuent ensemble au ralentissement de la propagation de l'influx électrique dans l'oreillette.

### 3.5 Régulation des courants ioniques selon les chambres cardiaques

Ce projet de recherche souligne les différences qui existent dans la régulation des courants ioniques entre les deux chambres cardiaques au sein du même modèle de surexpression d'AT1R. En effet, les souris AT1R montrent des remodelages ventriculaires et auriculaires distincts et ce, pour la plupart des courants ioniques. En effet, les études sur les ventricules ont montré une altération des courants repolarisants  $K^+$  dès 50 jours (65) alors qu'aucune différence significative dans ces courants  $K^+$  n'a été observée dans les oreillettes. Les courants calciques sont, quant à eux, changés uniquement à 6 mois dans les oreillettes, mais au niveau ventriculaire cette réduction est déjà présente à 50 jours (67). Finalement, le courant sodique est diminué de façon similaire dans les deux chambres cardiaques et le mécanisme responsable de cette réduction, soit l'activation de la PKC $\alpha$ , semble aussi être le même.

De plus, l'altération des connexines semble aussi être régulée de manière différente entre les chambres cardiaques. En effet, au niveau auriculaire, nous avons observé une diminution de l'expression génique de la Cx43 chez les mâles dès l'âge de 50 jours. Cependant, au niveau ventriculaire l'expression génique de la Cx43 n'est pas affectée chez les mâles (données ventriculaires présentées en **Annexe 4**). Cependant, l'expression protéique n'est pas affectée autant dans les oreillettes que dans les ventricules.

Ainsi, en réponse à la même surexpression d'AT1R, les remodelages électrophysiologiques sont différents entre les chambres, ce qui suggère l'implication de protéines régulatrices ayant une activité distincte sur la cascade de signalisation d'AT1R dans les ventricules et dans les oreillettes.

Les protéines régulatrices de la signalisation des protéines G (*Regulator of G protein signaling* - RGS) modulent l'intensité de la cascade de signalisation induite par le récepteur couplé aux protéines G, dans notre cas, le récepteur AT1.(127) Ces protéines pourraient être responsables des différents remodelages observés entre les chambres cardiaques puisque les formes de RGS retrouvés dans les ventricules et les oreillettes sont différentes. En effet, au niveau auriculaire, ce sont les RGS1 et RGS2 qui sont retrouvés de manière abondante alors que le RGS4 l'est davantage dans les ventricules. Les RGS1-4 sont connues pour atténuer la cascade de signalisation de la protéine G $\alpha$ .(128) Cependant, Cho et al. ont rapporté que les RGS1 et RGS2 avaient une meilleure efficacité pour moduler la cascade du récepteur AT1 que le RSG4, qui n'avait qu'un effet modeste sur ce récepteur.(128) Ainsi, il serait possible qu'AT1R induise une cascade de signalisation moins intense dans les oreillettes par l'action des RGS1 et RGS2, expliquant que certains courants ioniques ne soit pas diminués comme c'est le cas dans les ventricules.

Des expériences supplémentaires permettront d'établir l'implication des RGS dans notre modèle AT1R et leur rôle sur les remodelages spécifiques à chacune des chambres cardiaques. Pour mieux traiter la fibrillation auriculaire, il est nécessaire de comprendre comment la suractivation du SRA induit les remodelages cardiaques. Ces connaissances permettraient, entre autres, de mieux cibler le mécanisme d'action de la fibrillation auriculaire, en évitant d'altérer l'électrophysiologie ventriculaire qui peut mener à des arythmies ventriculaires mortelles.

### **3.6 Comparaison des modèles expérimentaux d'angiotensine II**

Notre modèle de souris AT1R permet d'étudier l'effet cardiaque de l'angiotensine II, indépendamment de ses effets systémiques, dont ceux hémodynamiques. Ainsi, les remodelages auriculaires observés chez les souris AT1R peuvent être associés directement à l'action du récepteur AT1 sur le cœur (50 jours), ou encore à la présence de remodelage structurel induits par le récepteur AT1 (6 mois).



De nombreux autres modèles animaux existent pour étudier l'effet de l'angiotensine II sur le remodelage cardiaque. Certaines études utilisent l'injection chronique de doses élevées d'angiotensine II.(119,129) Cette approche entraîne une hypertension sévère chez les souris et ne permet donc pas de distinguer les remodelages causés par les changements hémodynamiques des effets directs de l'angiotensine II au niveau cardiaque. De plus, plusieurs systèmes pathologiques peuvent être activés en réponse aux doses élevées d'angiotensine II, comme le stress oxydatif ou une signalisation pro-inflammatoire. Li et al. ont d'ailleurs rapportés que leurs souris sauvages recevant des injections d'angiotensine II développaient un remodelage cardiaque rendant leur souris susceptibles à la fibrillation auriculaire. Ils ont associé ces remodelages aux changements hémodynamiques, au stress oxydatif et à l'inflammation induits par l'angiotensine II.(129)

Jansen et al. utilisent aussi des injections chroniques d'angiotensine II afin d'étudier les remodelages cardiaques menant à la fibrillation auriculaire.(119) Les changements dans les courants ioniques rapporté dans leur étude sont plus sévères que ceux observés chez les souris AT1R. En effet, leurs souris subissent une modification des courants potassiques, ainsi qu'un remodelage structurel important. Ils rapportent également une haute susceptibilité à la fibrillation auriculaire chez les souris recevant l'angiotensine II comparativement aux souris recevant la saline. La présence de remodelage structurel et des effets hémodynamiques contribuent à la régulation de certains courants ioniques et à la haute susceptibilité à la fibrillation auriculaire de leurs souris recevant des doses élevées d'angiotensine II, comparativement à ce qui est observé dans le modèle AT1R.

D'autres modèles de suractivation du SRA sont utilisés pour étudier les remodelages cardiaques. Par exemple, Xiao et al. ont utilisé une souris transgénique, surexprimant de manière cardiaque-spécifique, l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA).(130) Comme les souris AT1R, leurs souris ECA n'ont aucun changement dans leur pression artérielle. Les souris ECA montrent toutefois un remodelage structurel auriculaire associé avec une augmentation de la susceptibilité à la fibrillation auriculaire. Puisque leur modèle ECA repose sur l'augmentation locale des niveaux d'angiotensine II dans le cœur, l'hormone peut activée le récepteur AT1R mais aussi d'autres récepteurs, tels que l'AT2R. Ainsi, les remodelages néfastes normalement induits par le récepteur AT1 pourraient être compensés par l'activité du récepteur AT2. Il est aussi important de noter que l'angiotensine II peut aller activer l'activité de fibroblastes et donc induire

des remodelages structurels auriculaires. Cependant, les souris ECA n'ont aucun remodelage structurel au niveau des ventricules, renforçant l'hypothèse d'une activité compensatoire par le récepteur AT2.

En bref, le système rénine-angiotensine est complexe et de nombreux modèles permettent d'étudier la modulation du cœur en ciblant des parties différentes du SRA. Les résultats obtenus à partir des différents modèles permettent de mieux comprendre les différents mécanismes induit par les composantes du SRA. De nombreux autres modèles existent et comportent chacun leurs avantages et leurs limites.

### **3.7 Limites de l'étude**

#### **3.7.1 Reproduction des souris AT1R**

L'utilisation de souris transgéniques a mené certaines limites considérables à la réalisation de ce projet de maîtrise. Tout d'abord, la reproduction des souris transgéniques AT1R a restreint la disponibilité des échantillons, puisque seules les souris CTL femelles sont aptes à mener leur gestation à terme. L'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque sévère des souris AT1R femelles causent généralement leur décès pendant la gestation. En effet, la gestation cause l'augmentation du volume sanguin et l'augmentation de la fréquence cardiaque, qui apportent un stress sur le cœur amplifiant le phénotype délète déjà présent chez les souris AT1R. Une organisation minutieuse a été nécessaire pour permettre l'utilisation efficace des souris puisqu'un temps de vieillissement des souris du groupe 6 mois est aussi à prévoir.

#### **3.7.2 Difficultés techniques**

##### **3.7.2.1 Western Blot sur fraction sarcolemmale**

La disponibilité et le vieillissement des souris ont, entre autres, retardé certaines expériences de biologies moléculaires qui nécessitent beaucoup de tissus. En effet, les Western Blot, sur la fraction sarcolemmale, nécessitent un grand nombre d'oreillettes afin d'avoir une quantité suffisante de protéines sarcolemmales. Par exemple, les Western blot pour quantifier la PKC $\alpha$  nécessitent 10 oreillettes gauches par « n » afin d'obtenir assez de protéines (au moins 10

µg) pour détecter le signal. De plus, un « n » minimal de 3 doit être utilisé pour chaque groupe. Ainsi, le manque de tissus AT1R et la contrainte liée à la reproduction et au vieillissement ont retardé la réalisation de certaines des expériences de Western Blot.

De plus, l'utilisation de la fraction protéique sarcolemmale occasionne une difficulté supplémentaire puisque les gènes de référence classiques cytosoliques, comme GAPDH, ne sont pas présent dans la fraction sarcolemmale. Nous avons donc utilisé la technique d'imagerie « Stain-Free » de la compagnie Biorad qui permet de détecter et quantifier la quantité totale de protéines présentes dans chaque puit, afin de normaliser le signal de notre protéine d'intérêt. Cette technique permet d'obtenir des résultats similaires au rouge ponceau S, mais utilise un agent qui se lie directement aux protéines dans le gel et qui peut être détecté par l'utilisation d'une machine ChemiDoc. La coloration au rouge ponceau S permet de visualiser les protéines sur la membrane de nitrocellulose. La technique de « Stain-Free » est cependant plus précise et moins variable que le colorant rouge ponceau S.

Tout juste avant la fin de ma maîtrise, notre laboratoire a trouvé que la protéine transferrine, pouvait être utilisée comme marqueur de référence pour la fraction sarcolemmale. Elle sera donc utilisée, en parallèle du « Stain-Free », pour les futures expériences de Western Blot du laboratoire. La grande quantité de tissus nécessaire aux expériences de Western Blot, explique pourquoi les expériences réalisées dans ce mémoire, qui ont eu lieu avant de trouver la transferrine, n'ont pas été refaites pour inclure cette protéine de normalisation.

### **3.7.2.2 Stimulations électrophysiologiques programmées (EPS)**

Les souris AT1R ne font pas spontanément d'épisodes de fibrillation auriculaire. Ainsi, l'utilisation de protocoles d'EPS permet d'évaluer leur susceptibilité à la fibrillation auriculaire. Cependant, certaines difficultés techniques sont associées aux EPS. Tout d'abord, dû à la petite taille des souris 50 jours, un cathéter octopolaire plus petit doit être utilisé dans ces groupes, alors que le cathéter octopolaire régulier, qui est plus gros, est utilisé chez les souris 6 mois. Ceci rend impossible la comparaison directe de l'incidence des arythmies entre les souris de 50 jours et 6 mois, puisque deux cathéters différents ont été utilisés. Ainsi, seule la comparaison entre les souris CTL et AT1R d'un même âge peut être faite. Malgré qu'un cathéter plus adapté soit utilisé chez les souris 50 jours, une mortalité d'environ 20% survient lors de l'insertion du cathéter, soit une

proportion plus grande que chez les souris de 6 mois qui utilise le cathéter plus gros et dont le taux de mortalité est d'environ 10%.

### **3.8 Perspectives du projet**

#### **3.8.1 Comparaison des remodelages auriculaires entre les souris mâles et les femelles induits par la surexpression d'AT1R**

Le sexe masculin est un facteur de risque connu de la fibrillation auriculaire. En effet, les hommes sont deux fois plus à risque d'en souffrir que les femmes. Cependant, les femmes souffrant de fibrillation auriculaire ont souvent des symptômes plus atypiques et plus sévères, résultant en une diminution de leur qualité de vie plus importante.(1) En effet, les AVC causés par la fibrillation auriculaire sont plus graves chez les femmes que chez les hommes et ces AVC sont associés à davantage de perte de la qualité de vie et de mortalité.(1)

Le sexe biologique semble jouer un rôle dans l'association entre certains facteurs de risque et le développement de fibrillation auriculaire. En effet, l'obésité augmente davantage les risques de fibrillation auriculaire chez les hommes, alors que l'hypertension et le diabète confèrent un risque similaire de fibrillation auriculaire aux deux sexes. Les femmes souffrant de fibrillation auriculaire auraient tendance à être plus à risque d'insuffisance cardiaque que les hommes.(131) De plus, les femmes ayant à la fois une insuffisance cardiaque et de la fibrillation auriculaire sont plus à risque de mortalité et d'effets graves que les hommes souffrant aussi des deux pathologies.(132)

Il est d'autant plus intéressant d'étudier les remodelages auriculaires menant à la fibrillation auriculaire, sachant que les souris AT1R femelles souffrent d'insuffisance cardiaque et que les deux pathologies sont étroitement interreliées (voir **Annexe 3**). Ainsi, les remodelages auriculaires induits par la surexpression d'AT1R pourraient différer entre les souris mâles et femelles.

Les mécanismes responsables des différences mâles-femelles dans la fibrillation auriculaire sont encore peu connus, particulièrement dans un contexte pathologique, comme la suractivation du SRA. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait de développer des traitements plus adaptés pour la gestion des arythmies dépendamment du sexe du patient.

#### 4. CONCLUSION

En conclusion, l'objectif principal de ce projet de maîtrise était de déterminer si la surexpression cardiomyocyte-spécifique d'AT1R induisait des remodelages électriques des oreillettes et menait à une altération de la conduction auriculaire pro-arythmique. La présence de remodelages électriques dès l'âge de 50 jours et la prolongation de la durée de l'onde P suggèrent que la conduction auriculaire est affectée directement par la suractivation du SRA, indépendamment de la présence de remodelage structurel. Ainsi, nous pouvons affirmer que la surexpression d'AT1R est responsable de la réduction du courant sodique et que c'est l'activation de la PKC $\alpha$  qui régule le courant, puisque l'expression génique du canal Na<sub>v</sub>1.5 est inchangé. De plus, la surexpression d'AT1R est aussi associée avec la diminution de l'expression des connexines 40 et 43 dans l'oreillette. Le courant sodique et les connexines sont des composantes essentielles de la conduction auriculaire et leurs réductions corrélient avec la tendance à la hausse pour la susceptibilité à la fibrillation auriculaire rapportée chez les souris AT1R de 50 jours. Le remodelage structurel n'est présent que chez les souris AT1R de 6 mois. Les données recueillies chez ces souris montrent que la présence de fibrose n'affecte pas davantage les composantes impliquées dans la conduction. En effet, les diminutions observées pour le courant sodique et les connexines sont similaires à celles du groupe 50 jours. Cependant, chez les souris AT1R de 6 mois, il y a une prolongation de la durée de l'onde P encore plus importante que chez les souris de 50 jours. Ainsi, la présence de remodelage structurel amplifie l'altération de la conduction auriculaire et augmente leur susceptibilité à la fibrillation auriculaire. En bref, la surexpression d'AT1R induit un remodelage électrique qui précède l'apparition du remodelage structurel et qui contribue à la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire. Ce projet apporte de nouvelles connaissances quant à l'action directe du SRA sur le cœur, indépendamment des effets hémodynamiques. À terme, ces données pourraient permettre le développement de thérapies plus personnalisées pour la gestion de la fibrillation auriculaire chez les patients ayant des facteurs de risques spécifiques, comme une suractivation du SRA.

## 5. BIBLIOGRAPHIE

1. Andrade JG, Aguilar M, Atzema C, Bell A, Cairns JA, Cheung CC, Cox JL, Dorian P, Gladstone DJ, Healey JS, Khairy P, Leblanc K, McMurtry MS, Mitchell LB, Nair GM, Nattel S, Parkash R, Pilote L, Sandhu RK, Sarrazin J-F, Sharma M, Skanes AC, Talajic M, Tsang TSM, Verma A, Verma S, Whitlock R, Wyse DG, Macle L. The 2020 Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society Comprehensive Guidelines for the Management of Atrial Fibrillation. *Can J Cardiol.* 1 déc 2020;36(12):1847-948.
2. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Global epidemiology of atrial fibrillation: An increasing epidemic and public health challenge. *Int J Stroke.* 1 févr 2021;16(2):217-21.
3. Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol.* 16 juin 2014;6:213-20.
4. Hong KL, Babiolakis C, Zile B, Bullen M, Haseeb S, Halperin F, Hohl CM, Magee K, Sandhu RK, Tian SY, Kennedy A, Lobban T, Mariano Z, Dorian P, Angaran P, Evans M, Leong-Sit P, Glover BM. Canada-wide mixed methods analysis evaluating the reasons for inappropriate emergency department presentation in patients with a history of atrial fibrillation: the multicentre AF-ED trial. *BMJ Open.* 16 avr 2020;10(4).
5. Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation. *Circulation.* 1 oct 1995;92(7):1954-68.
6. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA), Endorsed by the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), Authors/Task Force Members, Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Haldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey J-Y, Ponikowski P, Rutten FH, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Vahanian A, Auricchio A, Bax J, Ceconi C, Dean V, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hobbs R, Kearney P, McDonagh T, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Vardas PE, Widimsky P, Document Reviewers, Vardas PE, Agladze V, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: The Task Force for

- the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 1 oct 2010;31(19):2369-429.
7. Dzeshka M, Shantsila A, Shantsila E, Lip G. Atrial Fibrillation and Hypertension. *Hypertension*. 1 nov 2017;70(5):854-61.
  8. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 1 avr 2008;1(1):62-73.
  9. Waks JW, Josephson ME. Mechanisms of Atrial Fibrillation – Reentry, Rotors and Reality. *Arrhythmia Electrophysiol Rev*. août 2014;3(2):90-100.
  10. O’Grady G, Wang TH-H, Du P, Angeli T, Lammers WJ, Cheng LK. Recent progress in gastric arrhythmia: Pathophysiology, clinical significance and future horizons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. oct 2014;41(10):854-62.
  11. Nattel S, Heijman J, Voigt N, Wehrens XHT, Dobrev D. Chapter 42 - The Molecular Pathophysiology of Atrial Fibrillation. Dans: Zipes DP, Jalife J, Stevenson WG, rédacteurs. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)*. Elsevier; 2018. p. 396-408.
  12. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebel B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol*. sept 2001;38(3):883-91.
  13. Spach M, Dolber P, Heidlage J. Influence of the passive anisotropic properties on directional differences in propagation following modification of the sodium conductance in human atrial muscle. A model of reentry based on anisotropic discontinuous propagation. *Circ Res*. 1 avr 1988;62(4):811-32.
  14. Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK, Eric C. Beyer. Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res*. 1 juin 1994;74(6):1065-70.

15. Rao L, Mao Y, Huang K, Li Y, Shu Y. Relationship between Atrial Tissue Remodeling and ECG Features in Atrial Fibrillation. *Curr Med Sci.* 1 août 2019;39(4):541-5.
16. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 19 nov 2003;42(10):1785-92.
17. Ehrlich JR, Cha T-J, Zhang L, Chartier D, Melnyk P, Hohnloser SH, Nattel S. Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties. *J Physiol.* 15 sept 2003;551(Pt 3):801-13.
18. Arora R, Verheule S, Scott L, Navarrete A, Katari V, Wilson E, Vaz D, Olgin JE. Arrhythmogenic Substrate of the Pulmonary Veins Assessed by High-Resolution Optical Mapping. *Circulation.* 8 avr 2003;107(13):1816-21.
19. Kizer JR, Bella JN, Palmieri V, Liu JE, Best LG, Lee ET, Roman MJ, Devereux RB. Left atrial diameter as an independent predictor of first clinical cardiovascular events in middle-aged and elderly adults: The Strong Heart Study (SHS). *Am Heart J.* 1 févr 2006;151(2):412-8.
20. Cangemi R, Calvieri C, Taliani G, Pignatelli P, Morelli S, Falcone M, Pastori D, Violi F. Left Atrium Dilatation and Left Ventricular Hypertrophy Predispose to Atrial Fibrillation in Patients With Community-Acquired Pneumonia. *Am J Cardiol.* 1 sept 2019;124(5):723-8.
21. Nattel S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol.* 1 mai 2017;3(5):425-35.
22. Platonov PG. Atrial fibrosis: an obligatory component of arrhythmia mechanisms in atrial fibrillation? *J Geriatr Cardiol JGC.* avr 2017;14(4):233-7.
23. Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Syren P, Katus HA, Thomas D. Atrial myofibroblast activation and connective tissue formation in a porcine model of atrial fibrillation and reduced left ventricular function. *Life Sci.* 15 juill 2017;181:1-8.



24. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 1 juill 2018;98(3):1627-738.
25. Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dhein S. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart Br Card Soc.* avr 2004;90(4):400-5.
26. Iwasaki Y, Kunihiro N, Takeshi K, Nattel S. Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Circulation.* 15 nov 2011;124(20):2264-74.
27. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 1 mars 2011;89(4):744-53.
28. Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. Electrotonic Modulation of Cardiac Impulse Conduction by Myofibroblasts. *Circ Res. American Heart Association;* 31 mars 2006;98(6):801-10.
29. Andrade JG, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The Clinical Profile and Pathophysiology of Atrial Fibrillation. *Circ Res.* 25 avr 2014;114(9):1453-68.
30. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res.* 1 mai 2002;54(2):361-79.
31. Bomb R, Heckle MR, Sun Y, Mancarella S, Guntaka RV, Gerling IC, Weber KT. Myofibroblast secretome and its auto-/paracrine signaling. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* mai 2016;14(5):591-8.
32. Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, Ebina M, Nukiwa T, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. Arkadia amplifies TGF- $\beta$  superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* 15 déc 2003;22(24):6458-70.
33. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S. Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on the Development of the Atrial Fibrillation Substrate in Dogs With Ventricular Tachypacing-Induced Congestive Heart Failure. *Circulation.* 20 nov 2001;104(21):2608-14.

34. Kumagai K, Nakashima H, Urata H, Gondo N, Arakawa K, Saku K. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 18 juin 2003;41(12):2197-204.
35. Vermij SH, Abriel H, van Veen TAB. Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res*. 1 mars 2017;113(3):259-75.
36. Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Lüderitz B, Willecke K. Conduction Disturbances and Increased Atrial Vulnerability in Connexin40-Deficient Mice Analyzed by Transesophageal Stimulation. *Circulation*. 23 mars 1999;99(11):1508-15.
37. Kléber AG. Chapter 27 - Cell-to-Cell Communication and Impulse Propagation. Dans: Zipes DP, Jalife J, Stevenson WG, rédacteurs. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)*. Elsevier; 2018. p. 246-58.
38. Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, Saffitz JE. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation*. 24 févr 1998;97(7):686-91.
39. Allesie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2002;54(2):230-46.
40. Kumar S, Michaud GF. Chapter 76 - Atrial Fibrillation: Mechanisms, Clinical Features, and Management. Dans: Zipes DP, Jalife J, Stevenson WG, rédacteurs. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)*. Elsevier; 2018. p. 724-35.
41. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y-H. Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation. *Physiol Rev*. 1 avr 2007;87(2):425-56.
42. Iqbal SM, Lemmens-Gruber R. Phosphorylation of cardiac voltage-gated sodium channel: Potential players with multiple dimensions. *Acta Physiol Oxf Engl*. mars 2019;225(3).

43. Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AEO, Huang CL-H, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 avr 2002;99(9):6210-5.
44. Gaspo R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S. Tachycardia-Induced Changes in Na<sup>+</sup> Current in a Chronic Dog Model of Atrial Fibrillation. *Circ Res*. 1 déc 1997;81(6):1045-52.
45. Yagi T, Pu J, Chandra P, Hara M, Danilo P Jr, Rosen MR, Boyden PA. Density and function of inward currents in right atrial cells from chronically fibrillating canine atria. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2002;54(2):405-15.
46. Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Belardinelli L, Maier LS. Altered Na<sup>+</sup>Currents in Atrial Fibrillation: Effects of Ranolazine on Arrhythmias and Contractility in Human Atrial Myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 25 mai 2010;55(21):2330-42.
47. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li G-R, Wang Z, Nattel S. Ionic Remodeling Underlying Action Potential Changes in a Canine Model of Atrial Fibrillation. *Circ Res*. 1 oct 1997;81(4):512-25.
48. Malhotra A, Kang BPS, Cheung S, Opawumi D, Meggs LG. Angiotensin II Promotes Glucose-Induced Activation of Cardiac Protein Kinase C Isozymes and Phosphorylation of Troponin I. *Diabetes*. 1 août 2001;50(8):1918-26.
49. Murray KT, Hu N, Daw JR, Shin H-G, Watson MT, Mashburn AB, George AL. Functional Effects of Protein Kinase C Activation on the Human Cardiac Na<sup>+</sup> Channel. *Circ Res*. 1 mars 1997;80(3):370-6.
50. Liu M, Shi G, Yang K-C, Gu L, Kanthasamy AG, Anantharam V, Dudley SC. Role of protein kinase C in metabolic regulation of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Heart Rhythm*. 2017;14(3):440-7.
51. Karhu ST, Ruskoaho H, Talman V. Distinct regulation of cardiac fibroblast proliferation and transdifferentiation by classical and novel protein kinase C isoforms: possible

implications for new antifibrotic therapies. *Mol Pharmacol* [En ligne]. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 1 janv 2020 [cité le 12 août 2021];

Disponible:

<https://molpharm.aspetjournals.org/content/early/2020/11/25/molpharm.120.000094>

52. Murray KT, Hu N, Daw JR, Shin H-G, Watson MT, Mashburn AB, George AL. Functional Effects of Protein Kinase C Activation on the Human Cardiac Na<sup>+</sup> Channel. *Circ Res*. 1 mars 1997;80(3):370-6.
53. Mathieu S, El Khoury N, Rivard K, Gélinas R, Goyette P, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Reduction in Na<sup>(+)</sup> current by angiotensin II is mediated by PKC $\alpha$  in mouse and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Heart Rhythm*. 2016;13(6):1346-54.
54. Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 avr 1994;91(8):3289-93.
55. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 23 avr 1999;(44):121-31.
56. Li D, Sun H, Levesque P. Antiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: focus on atrial selectivity and safety. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. janv 2009;7(1):64-75.
57. Mascolo A, Urbanek K, De Angelis A, Sessa M, Scavone C, Berrino L, Rosano GMC, Capuano A, Rossi F. Angiotensin II and angiotensin 1–7: which is their role in atrial fibrillation? *Heart Fail Rev*. 1 mars 2020;25(2):367-80.
58. Chaugai S, Meng WY, Ali Sepehry A. Effects of RAAS Blockers on Atrial Fibrillation Prophylaxis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1 juill 2016;21(4):388-404.
59. Orsborne C, Chaggar PS, Shaw SM, Williams SG. The renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: the past, the present and the future. *Postgrad Med J*. 1 janv 2017;93(1095):29-37.

60. Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin–angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cell Signal*. 1 oct 2014;26(10):2147-60.
61. Barra S, Silvestri N, Vitagliano G, Madrid A, Gaeta G. Angiotensin II receptor blockers in the prevention of atrial fibrillation. *Expert Opin Pharmacother*. juin 2009;10(9):1395-411.
62. Goette A, Staack T, Röcken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. mai 2000;35(6):1669-77.
63. Mathieu S, El Khoury N, Rivard K, Gélinas R, Goyette P, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Reduction in Na(+) current by angiotensin II is mediated by PKC $\alpha$  in mouse and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Heart Rhythm*. 2016;13(6):1346-54.
64. Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Toyoda F, Ding W-G, Matsuura H, Horie M. Angiotensin II Potentiates the Slow Component of Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current via the AT1 Receptor in Guinea Pig Atrial Myocytes. *Circulation*. 14 mars 2006;113(10):1278-86.
65. Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res*. 1 avr 2008;78(1):53-62.
66. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1 nov 2011;301(5):H2018-27.
67. Mathieu S, El Khoury N, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Angiotensin II Overstimulation Leads to an Increased Susceptibility to Dilated Cardiomyopathy and Higher Mortality in Female Mice. *Sci Rep*. 17 janv 2018;8.
68. Xu Z-G, Lanting L, Vaziri ND, Li Z, Sepassi L, Rodriguez-Iturbe B, Natarajan R. Upregulation of Angiotensin II Type 1 Receptor, Inflammatory Mediators, and Enzymes of

Arachidonate Metabolism in Obese Zucker Rat Kidney. *Circulation*. 19 avr 2005;111(15):1962-9.

69. Patel VB, Putko B, Wang Z, Zhong J-C, Oudit GY. Manipulating angiotensin metabolism with angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in heart failure. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 1 déc 2012;9(4):e141-8.
70. Tsai C-T, Lai L-P, Lin J-L, Chiang F-T, Hwang J-J, Ritchie MD, Moore JH, Hsu K-L, Tseng C-D, Liao C-S, Tseng Y-Z. Renin-Angiotensin System Gene Polymorphisms and Atrial Fibrillation. *Circulation*. 6 avr 2004;109(13):1640-6.
71. Madrid AH, Bueno MG, Rebollo JMG, Marín I, Peña G, Bernal E, Rodriguez A, Cano L, Cano JM, Cabeza P, Moro C. Use of Irbesartan to Maintain Sinus Rhythm in Patients With Long-Lasting Persistent Atrial Fibrillation. *Circulation*. 16 juill 2002;106(3):331-6.
72. Shi Y, Li D, Tardif J-C, Nattel S. Enalapril effects on atrial remodeling and atrial fibrillation in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2002;54(2):456-61.
73. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 janv 2000;97(2):931-6.
74. Kaese S, Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*. 5 sept 2012;3(345).
75. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim Y-H, McAnulty JH, Zheng Z-J, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 25 févr 2014;129(8):837-47.
76. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 1 oct 2002;415(6868):219-26.
77. Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res*. 2008;78(1):53-62.

78. Iravanian S, Sovari AA, Lardin HA, Liu H, Xiao HD, Dolmatova E, Jiao Z, Harris BS, Witham EA, Gourdie RG, Duffy HS, Bernstein KE, Dudley SC. Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) reduces ventricular tachycardia risk by altering connexin43. *J Mol Med.* juill 2011;89(7):677-87.
79. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis F, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(2):931-6.
80. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo CA, Garfinkle M, Yusuf S, Connolly SJ. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 7 juin 2005;45(11):1832-9.
81. Suo Y, Zhang Y, Wang Y, Yuan M, Kariyawasam S, Tse G, Liu T, Fu H, Li G. Renin-angiotensin system inhibition is associated with reduced risk of left atrial appendage thrombosis formation in patients with atrial fibrillation. *Cardiol J.* 2018;25(5):611-20.
82. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC Jr, Kasi VS, Hoit BD, Keshelava G, Zhao H, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol.* sept 2004;165(3):1019-32.
83. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 19 nov 2003;42(10):1785-92.
84. Goette A, Staack T, Röcken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 1 mai 2000;35(6):1669-77.

85. Kasi VS, Xiao HD, Shang LL, Iravanian S, Langberg J, Witham EA, Jiao Z, Gallego CJ, Bernstein KE, Dudley SC Jr. Cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme overexpression causes conduction defects and connexin dysregulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* juill 2007;293(1):H182-92.
86. Maggioni AP, Latini R, Carson PE, Singh SN, Barlera S, Glazer R, Masson S, Cerè E, Tognoni G, Cohn JN, Val-HeFT Investigators. Valsartan reduces the incidence of atrial fibrillation in patients with heart failure: results from the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Am Heart J.* mars 2005;149(3):548-57.
87. Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA.* 10 mai 1995;273(18):1450-6.
88. Hattori Y, Atsushi S, Hiroaki F, Toyama J. Effects of cilazapril on ventricular arrhythmia in patients with congestive heart failure. *Clin Ther.* juin 1997;19(3):481-6.
89. Lindholm LH, Dahlöf B, Edelman JM, Ibsen H, Borch-Johnsen K, Olsen MH, Snapinn S, Wachtell K, LIFE study group. Effect of losartan on sudden cardiac death in people with diabetes: data from the LIFE study. *Lancet Lond Engl.* 23 août 2003;362(9384):619-20.
90. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 11 janv 2011;301(5):H2018-27.
91. Mathieu S, El Khoury N, Rivard K, Gélinas R, Goyette P, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Reduction in Na<sup>(+)</sup> current by angiotensin II is mediated by PKC $\alpha$  in mouse and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Heart Rhythm.* juin 2016;13(6):1346-54.
92. Mathieu S, Khoury NE, Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Angiotensin II Overstimulation Leads to an Increased Susceptibility to Dilated Cardiomyopathy and Higher Mortality in Female Mice. *Sci Rep.* 17 janv 2018;8(1):952.



93. Trépanier-Boulay V, Lupien MA, St-Michel C, Fiset C. Postnatal Development of Atrial Repolarization in Mouse. *Cardiovasc Res.* 2004;64:84-90.
94. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 15 sept 2004;559(3):777-98.
95. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 15 sept 2004;559(3):777-98.
96. Grandy SA, Brouillette J, Fiset C. Reduction of ventricular sodium current in a mouse model of HIV. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1 août 2010;21(8):916-22.
97. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res.* 31 août 2001;89(5):437-44.
98. El Khoury N, Mathieu S, Fiset C. Interleukin-1 $\beta$  reduces L-type Ca<sup>2+</sup> current through protein kinase C $\epsilon$  activation in mouse heart. *J Biol Chem.* 8 août 2014;289(32):21896-908.
99. El Khoury N, Ross JL, Long V, Thibault S, Ethier N, Fiset C. Pregnancy and oestrogen regulate sinoatrial node calcium homeostasis and accelerate pacemaking. *Cardiovasc Res.* 1 oct 2018;114(12):1605-16.
100. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal Biochem.* 1 oct 2005;345(1):47-54.
101. Jansen HJ, Mackasey M, Moghtadaei M, Belke DD, Egom EE, Tuomi JM, Rafferty SA, Kirkby AW, Rose RA. Distinct patterns of atrial electrical and structural remodeling in angiotensin II mediated atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 1 nov 2018;124:12-25.
102. Iqbal SM, Lemmens-Gruber R. Phosphorylation of cardiac voltage-gated sodium channel: Potential players with multiple dimensions. *Acta Physiol Oxf Engl.* mars 2019;225(3):e13210.
103. Alvin Z, Laurence GG, Coleman BR, Zhao A, Hajj-Moussa M, Haddad GE. Regulation of L-type inward calcium channel activity by captopril and angiotensin II via the phosphatidyl

- inositol 3-kinase pathway in cardiomyocytes from volume-overload hypertrophied rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol.* mars 2011;89(3):206-15.
104. Laszlo R, Eick C, Rueb N, Weretka S, Weig H-J, Schreieck J, Bosch RF. Inhibition of the renin-angiotensin system: effects on tachycardia-induced early electrical remodelling in rabbit atrium. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* sept 2008;9(3):125-32.
105. Chaugai S, Meng WY, Ali Sepehry A. Effects of RAAS Blockers on Atrial Fibrillation Prophylaxis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016;21(4):388-404.
106. von Lewinski D, Kockskämper J, Rüberrus S-U, Zhu D, Schmitto JD, Schöndube FA, Hasenfuss G, Pieske B. Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT1 receptor blockade in human atrial myocardium. *Eur J Heart Fail.* déc 2008;10(12):1172-6.
107. Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Paradis P, Nemer M, Komuro I. Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice. *Hypertension.* 1 mars 2012;59(3):627-33.
108. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 1 mai 2015;44-46:247-54.
109. Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol.* févr 2006;22(Suppl B):25B-30B.
110. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest.* 1 juill 2010;120(7):2292-306.
111. Fischer TA, Ungureanu-Longrois D, Singh K, de Zengotita J, DeUgarte D, Alali A, Gadbut AP, Lee MA, Balligand JL, Kifor I, Smith TW, Kelly RA. Regulation of bFGF expression

- and ANG II secretion in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1 févr 1997;272(2):H958-68.
112. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li H-T, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- $\beta$ 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1 nov 1998;40(2):352-63.
113. Abriel H. Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res.* 29 juill 2007;(76):381-9.
114. Frustaci A, Priori SG, Pieroni M, Chimenti C, Napolitano C, Rivolta I, Sanna T, Bellocci F, Russo MA. Cardiac Histological Substrate in Patients With Clinical Phenotype of Brugada Syndrome. *Circulation.* 13 déc 2005;112(24):3680-7.
115. Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJG, Verkerk AO, de Groot JR, Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AAM, de Bakker JMT. Right Ventricular Fibrosis and Conduction Delay in a Patient With Clinical Signs of Brugada Syndrome. *Circulation.* 1 nov 2005;112(18):2769-77.
116. Baba S, Dun W, Boyden PA. Can PKA activators rescue Na<sup>+</sup> channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart? *Cardiovasc Res.* 1 nov 2004;64(2):260-7.
117. Hallaq H, Yang Z, Viswanathan PC, Fukuda K, Shen W, Wang DW, Wells KS, Zhou J, Yi J, Murray KT. Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc Res.* 1 nov 2006;72(2):250-61.
118. Marionneau C, Abriel H. Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup> channel NaV1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol.* 1 mai 2015;82:36-47.
119. Jansen HJ, Mackasey M, Moghtadaei M, Belke DD, Egom EE, Tuomi JM, Rafferty SA, Kirkby AW, Rose RA. Distinct patterns of atrial electrical and structural remodeling in angiotensin II mediated atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* nov 2018;124:12-25.

120. Elvan A, Huang X, Pressler ML, Zipes DP. Radiofrequency Catheter Ablation of the Atria Eliminates Pacing-Induced Sustained Atrial Fibrillation and Reduces Connexin 43 in Dogs. *Circulation*. 2 sept 1997;96(5):1675-85.
121. van der Velden HMW, Ausma J, Rook MB, Hellemons AJCGM, van Veen TAAB, Allesie MA, Jongsma HJ. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res*. 1 juin 2000;46(3):476-86.
122. Bowling N, Huang X, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Esterman M, Allen PD, Maddi R, McCall E, Vlahos CJ. Protein Kinase C-  $\alpha$  and -  $\epsilon$  Modulate Connexin-43 Phosphorylation in Human Heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1 avr 2001;33(4):789-98.
123. Bačová BS, Beňová TE, Viczenczová C, Soukup T, Rauchová H, Pavelka S, Knezl V, Barančík M, Tribulová N. Cardiac Connexin-43 and PKC Signaling in Rats With Altered Thyroid Status Without and With Omega-3 Fatty Acids Intake. *Physiol Res*. 2016;65(Suppl. 1):S77-90.
124. Desplantez T, McCain ML, Beauchamp P, Rigoli G, Rothen-Rutishauser B, Parker KK, Kleber AG. Connexin43 ablation in foetal atrial myocytes decreases electrical coupling, partner connexins, and sodium current. *Cardiovasc Res*. 1 avr 2012;94(1):58-65.
125. Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, de Jong S, van der Nagel R, Hund TJ, Mohler PJ, Vos MA, van Veen TA, de Bakker JM, Delmar M, van Rijen HV. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm*. 1 avr 2012;9(4):600-7.
126. Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1 avr 2013;1833(4):886-94.
127. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 1 janv 2007;292(1):C82-97.

128. Cho H, Harrison K, Schwartz O, Kehrl JH. The aorta and heart differentially express RGS (regulators of G-protein signalling) proteins that selectively regulate sphingosine 1-phosphate, angiotensin II and endothelin-1 signalling. *Biochem J.* 1 mai 2003;371(Pt 3):973-80.
129. Li J, Wang S, Zhang Y-L, Bai J, Lin Q-Y, Liu R-S, Yu X-H, Li H-H. Immunoproteasome Subunit  $\beta 5i$  Promotes Ang II (Angiotensin II)–Induced Atrial Fibrillation by Targeting ATRAP (Ang II Type I Receptor–Associated Protein) Degradation in Mice. *Hypertension.* 1 janv 2019;73(1):92-101.
130. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC, Kasi VS, Hoit BD, Keshelava G, Zhao H, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol.* sept 2004;165(3):1019-32.
131. Westerman S, Wenger N. Gender Differences in Atrial Fibrillation: A Review of Epidemiology, Management, and Outcomes. *Curr Cardiol Rev.* mai 2019;15(2):136-44.
132. Madan N, Itchhaporia D, Albert CM, Aggarwal NT, Volgman AS. Atrial Fibrillation and Heart Failure in Women. *Heart Fail Clin.* 1 janv 2019;15(1):55-64.
133. Mathieu S. Les mécanismes sous-jacents aux effets pathologiques cardiaques de l'angiotensine II dans le remodelage électrique et contractile entre les sexes [Thèse]. Papyrus : Université de Montréal; 2016.
134. van Rijen Harold VM, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM. Slow Conduction and Enhanced Anisotropy Increase the Propensity for Ventricular Tachyarrhythmias in Adult Mice With Induced Deletion of Connexin43. *Circulation.* 2 mars 2004;109(8):1048-55.
135. Mesquita TRR, Zhang R, de Couto G, Valle J, Sanchez L, Rogers RG, Holm K, Liu W, Marbán E, Cingolani E. Mechanisms of atrial fibrillation in aged rats with heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Rhythm.* 1 juin 2020;17(6):1025-33.

136. Zakeri R, Chamberlain AM, Roger VL, Redfield MM. Temporal Relationship and Prognostic Significance of Atrial Fibrillation in Heart Failure Patients with Preserved Ejection Fraction: A Community-Based Study. *Circulation*. 3 sept 2013;128(10):1085-93.
137. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Redfield MM. Interdependence of Atrial Fibrillation and Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction Reflects a Common Underlying Atrial and Ventricular Myopathy. *Circulation*. 7 janv 2020;141(1):4-6.
138. Prabhu S, Voskoboinik A, Kaye DM, Kistler PM. Atrial Fibrillation and Heart Failure — Cause or Effect? *Heart Lung Circ*. 1 sept 2017;26(9):967-74.

## 6. ANNEXES

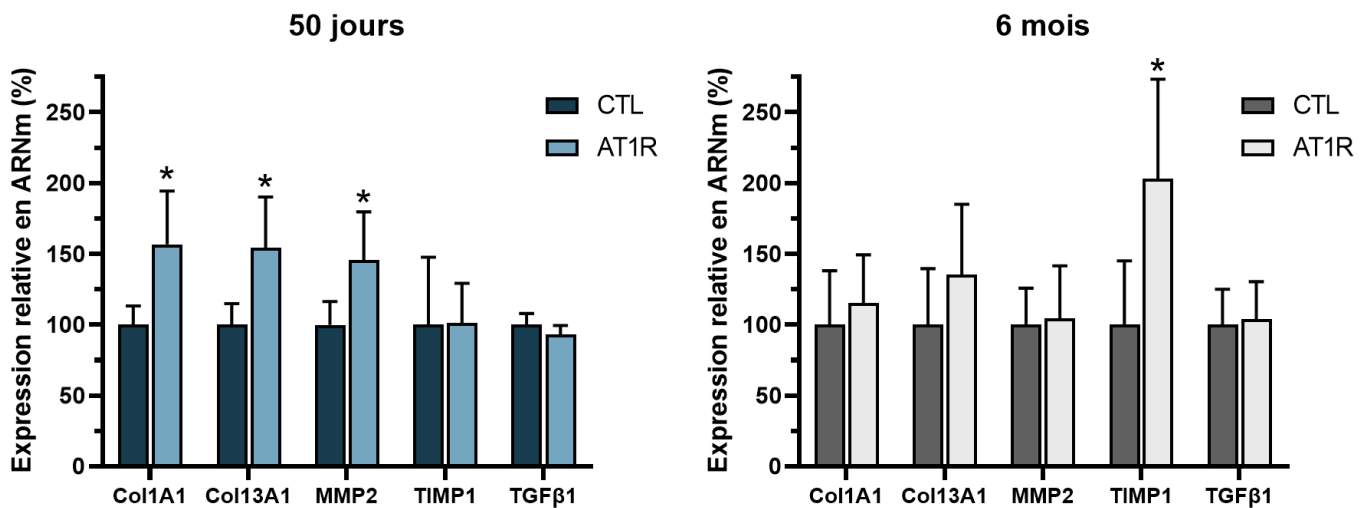
### Annexe 1 : Liste des gènes impliqués dans la fibrose

Marqueur de la fibrose	Gène murin	Séquence sens	Séquence anti-sens
Collagène 1	Col1a1	CTG ACG CAT GGC CAA GAA GAC A	CGT GCC ATT GTG GCA GAT ACA GAT
Collagène 3	Col3a1	TGA ATG GTG GTT TTC AGT TCA G	GAT CCC ATC AGC TTC AGA GAC T
Matrice métalloprotéinase 2 (MMP2)	Mmp2	CCC CAT GTG TCT TCC CCT TC	GTG TAG ATC GGG GCC ATC AG
Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 1 (TIMP1)	Timp1	GTA AGG CCT GTA GCT GTG CC	GTT GAT TTC TGG GGA ACC CAT
Facteur de croissance transformant bêta (TGFβ1)	Tgfb1	TGC TAA TGG TGG ACC GCA A	AGA TGT CTT TGG TTT TCT CAT AGA TGG

La liste présentée dans ce tableau indique les facteurs impliqués dans le développement de la fibrose qui ont été étudiés pour ce projet. De plus, les séquences sens et anti-sens des oligonucléotides utilisées en qPCR sont aussi indiquées.

## Annexe 2 : Résultats de qPCR des gènes impliqués dans la formation de fibrose

La surexpression d'AT1R induit la formation de fibrose dans l'oreillette gauche des souris AT1R. Cependant, les mécanismes menant à l'accumulation du collagène dans la matrice extracellulaire sont inconnus dans ce modèle de souris. Les données présentées dans cette annexe montrent la modulation des gènes impliqués dans le développement de fibrose chez les souris AT1R de 50 jours (graphique de gauche) et de 6 mois (graphique de droite).



**Résultats :** L'expression du collagène 1 (Col1a1) et du collagène 3 (Col3a1) est augmentée à 50 jours (Col1a1; CTL :  $100 \pm 6$  %, AT1R :  $157 \pm 17$  %, \* $p=0,006$  - Col3a1; CTL :  $100 \pm 7$  %, AT1R :  $155 \pm 16$  %, \* $p=0,006$ ), mais inchangée à 6 mois (Col1a1; CTL :  $100 \pm 17$  %, AT1R :  $115 \pm 14$  %,  $p=0,459$  - Col3a1; CTL :  $100 \pm 18$  %, AT1R :  $136 \pm 20$  %,  $p=0,185$ ). Les MMP2 sont augmentées seulement à 50 jours (CTL :  $100 \pm 4$  %, AT1R :  $146 \pm 15$  %, \* $p=0,015$ ) (6 mois : CTL :  $100 \pm 12$  %, AT1R :  $104 \pm 15$  %,  $p=0,814$ ). Les TIMP1 ne sont pas changés à 50 jours (CTL :  $100 \pm 21$  %, AT1R :  $101 \pm 13$  %,  $p=0,957$ ), mais sont significativement augmentés à 6 mois (CTL :  $100 \pm 20$  %, AT1R :  $203 \pm 29$  %, \* $p=0,011$ ). L'expression du TGFβ1 n'est pas affectée chez la souris AT1R (50 jours : CTL :  $100 \pm 4$  %, AT1R :  $93 \pm 3$  %,  $p=0,126$ ; 6 mois : CTL :  $100 \pm 11$  %, AT1R :  $104 \pm 11$  %,  $p=0,794$ ). Chaque n représente les oreillettes d'une souris (une oreillette gauche et une oreillette droite); n=6 pour les groupes 50 jours CTL et AT1R; n=6 pour les CTL 6 mois et n=7 pour les AT1R 6 mois. Le test statistique de student a été effectué pour chaque gène par rapport au groupe CTL pour l'âge respectif. CTL; souris contrôles, AT1R; souris transgéniques.



### **Annexe 3 : Projet sur l'expression de la connexine 43 dans les ventricules de souris AT1R**

Tel que mentionné précédemment, notre laboratoire c'est beaucoup intéressé aux remodelages des ventricules des souris AT1R. Dans les études précédentes, un phénotype plus grave et un plus haut taux de mortalité étaient observés chez les souris AT1R femelles de 6 mois par rapport aux mâles et aux contrôles.(67) Les souris AT1R développent de l'insuffisance cardiaque, une pathologie où le cœur ne peut subvenir aux besoins systémiques en sang. Lors de ces études, une diminution de la vitesse de conduction dans les ventricules était observée chez les souris AT1R des deux sexes, augmentant les risques d'arythmies ventriculaires mortelles.(63,65–67) La diminution de la vitesse de conduction était associée avec une diminution du courant sodique, d'environ 60% chez les mâles (63,133) et chez les femelles (133) AT1R par rapport à leurs contrôles respectifs. Cependant, l'implication de la connexine 43 dans l'altération de propagation de l'influx électrique ventriculaire dans les souris AT1R était encore inexplorée. Sachant que les remodelages présents dans une chambre cardiaque peuvent engendrer des remodelages dans l'autre (**Annexe 5**), il est important de comprendre la contribution des connexines dans les ventricules des souris AT1R.

Ainsi, en parallèle de l'étude sur les oreillettes, j'ai aussi étudié l'expression génique et protéique de la Cx43 dans les ventricules des souris AT1R. L'**Annexe 4** montre une diminution de l'expression relative en ARNm et de l'expression protéique de la Cx43 seulement chez les femelles AT1R de 6 mois. Thomas et al. ont montré que des souris déficientes en Cx43 avaient une prolongation du complexe QRS et une diminution de la vitesse de conduction.(38) Ainsi nos données suggèrent que la diminution de l'expression de la Cx43 contribue à l'altération de la conduction chez les souris AT1R femelles.

Les données d'ECG montrent que les complexes QRS sont prolongés de manière similaires entre les deux sexes, bien que les mâles AT1R ne montrent aucun changement dans l'expression de la Cx43. Ceci peut s'expliquer par la contribution importante du  $I_{Na}$  dans la conduction ventriculaire, qui est diminué de manière similaire entre les mâles et les femelles. Cependant, van Rijen et al. ont démontré dans un modèle murin qu'une réduction inférieure à 95% de l'expression de la Cx43 avait peu d'effet sur la conduction ventriculaire (réduction d'environ 15 à 25% de la vitesse de conduction), mais que l'hétérogénéité de la distribution des Cx43 avait un impact

important.(134) Ainsi, l'absence d'effet fonctionnel de la diminution de l'expression de la Cx43 chez les femelles AT1R pourrait s'expliquer par une diminution insuffisante de l'expression pour avoir un impact sur la conduction.

D'autres expériences seront nécessaires pour comprendre l'implication des Cx43 dans les ventricules des souris AT1R mâles et femelles. Des expériences d'immunofluorescences sur des coupes de ventricules vont aussi permettre de mieux comprendre la contribution des connexines dans l'altération de la conduction ventriculaire des souris AT1R, puisque la latéralisation des connexines est un substrat arythmique connu. La technique de cartographie optique (*optical mapping*) permettrait d'étudier la conduction dans les ventricules de manière plus précise et d'analyser des zones de conduction problématiques dans les ventricules. Cette technique permet de visualiser le motif de propagation de l'influx électrique plus précisément que le complexe QRS, qui est le reflet global de la vitesse de conduction ventriculaire. Une altération du motif de propagation de l'influx électrique corrèlerait avec le phénotype plus grave des femelles AT1R et avec le développement d'insuffisance cardiaque.

### **Annexe 3.1 : L'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire**

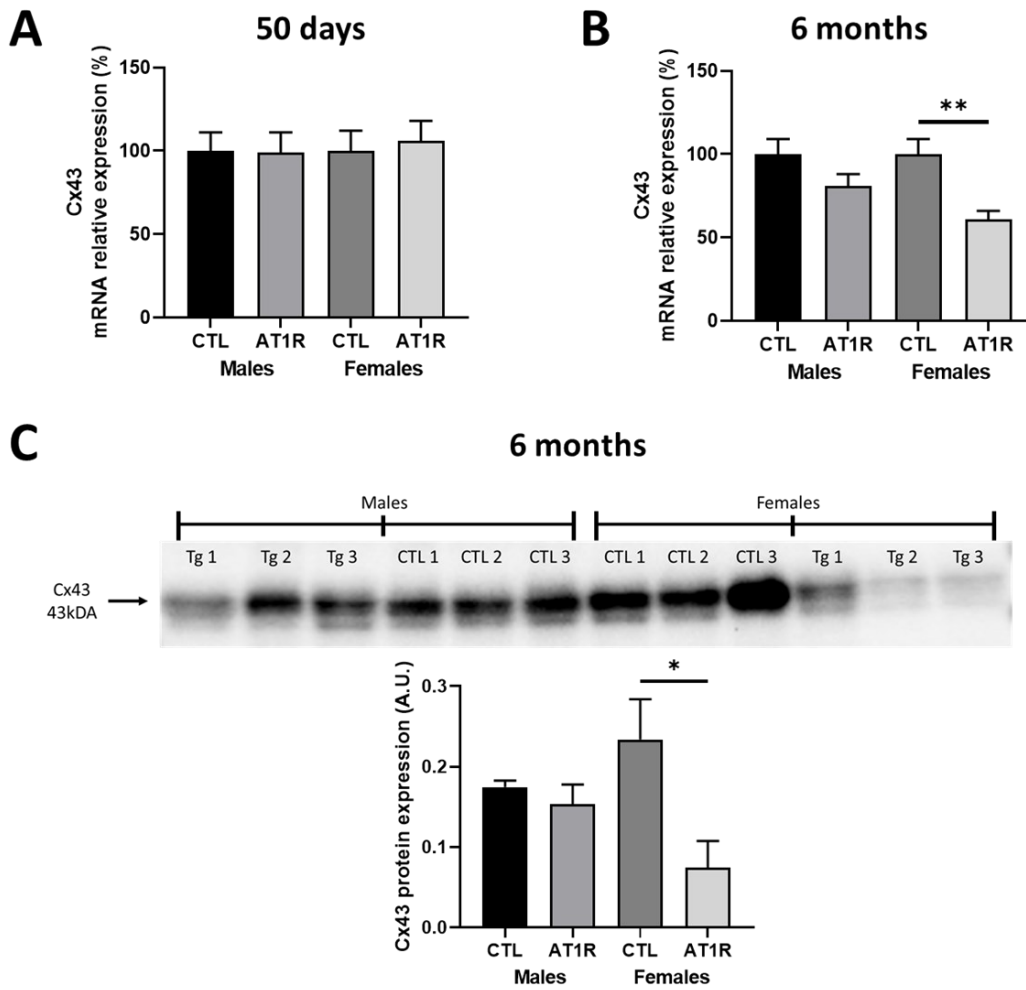
Comme mentionné précédemment, les souris AT1R développent un remodelage ventriculaire menant à l'insuffisance cardiaque à 6 mois. Cette pathologie est étroitement liée à la fibrillation auriculaire puisque la FA augmente les risques de développer une insuffisance cardiaque, mais cette dernière augmente également les risques de développer une FA. En effet, de 20 à 30% des patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont également de la fibrillation auriculaire de novo ou préexistante.(135,136) Ces deux pathologies partagent de nombreux facteurs de risque, comme l'hypertension, l'âge avancé et l'obésité. Une étude clinique a associé un plus grand risque de mortalité et de morbidité chez les patients souffrant de FA et d'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée, que chez les patients n'ayant qu'une seule des deux pathologies.(136,137)

Les mécanismes d'action reliant ces deux pathologies sont encore peu connus puisque les interactions entre ces pathologies sont complexes. En effet, l'insuffisance cardiaque semble pouvoir être autant la conséquence ou la cause de la fibrillation auriculaire.(137) Ces deux pathologies permettent le développement de remodelages pouvant contribuer à l'initiation ou au

maintien de l'autre pathologie (**Annexe 5**). En effet, les remodelages présents dans l'une des chambres peuvent induire un stress sur l'autre chambre, menant à des remodelages. Aussi, il est possible que les facteurs de risque, retrouvés dans les deux maladies, induisent des remodelages cardiaques parallèles menant au développement des remodelages. Parmi ces facteurs de risque ont compte notamment l'inflammation et l'activation du SRA qui peuvent induire des remodelages dans les ventricules et dans les oreillettes.(135,137,138)

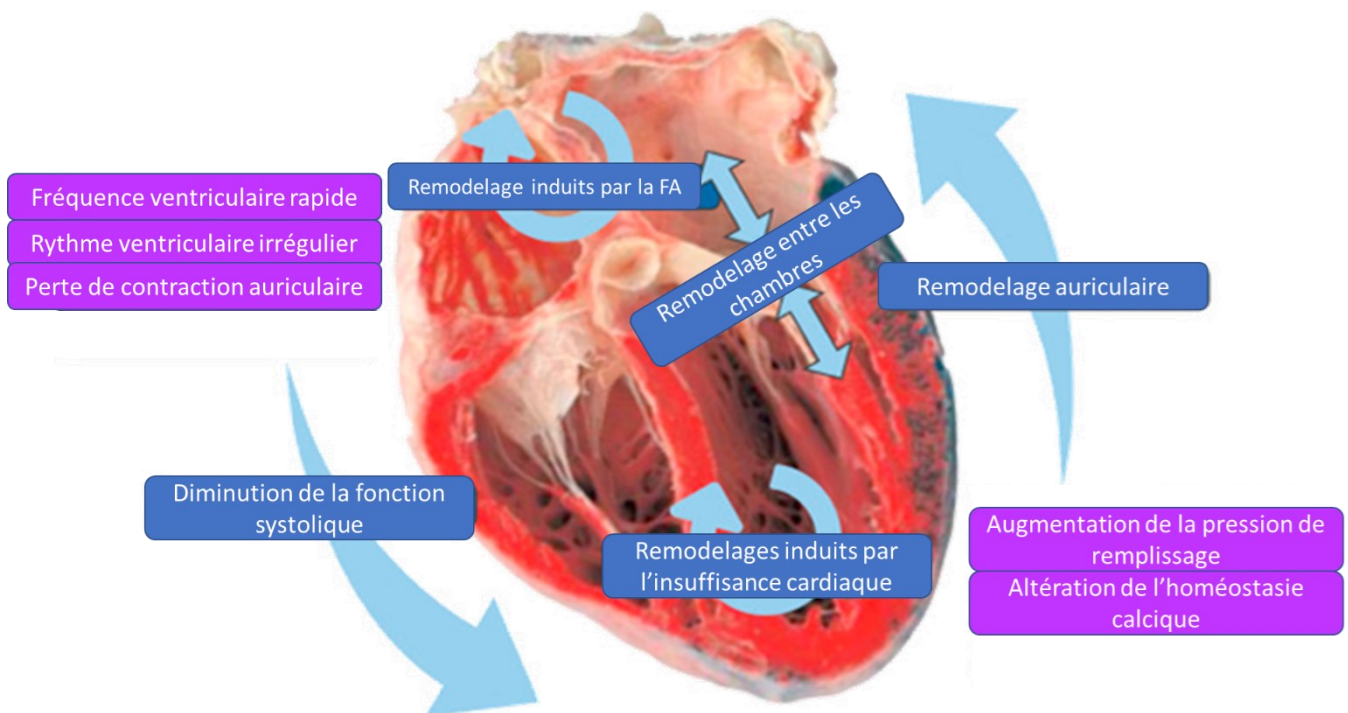
Dans le modèle de souris AT1R, une grande partie des remodelages électriques ventriculaires et auriculaires sont déjà présent à 50 jours, alors que les animaux n'expriment pas encore de remodelage structurel et qu'ils ne démontrent pas encore de signes d'insuffisance cardiaque ou de fibrillation auriculaire bien établi. Ainsi, la suractivation du SRA semble pouvoir induire des remodelages en parallèle dans les deux chambres cardiaques, même en absence d'effets systémiques ou d'altération de la pression intra-cardiaque. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'interaction des remodelages ventriculaires et auriculaires dans le modèle AT1R.

**Annexe 4 : Expression génique et protéique de la connexine 43 dans les ventricules des souris AT1R mâles et femelles.**



À 50 jours, l'expression relative en ARNm pour la Cx43 est inchangée chez les mâles et chez les femelles (mâles :  $p=0,9285$ ; femelles :  $p=0,7098$ ;  $n=6$  par groupe). **(B)** L'expression en ARNm est diminuée uniquement chez les souris AT1R femelles de 6 mois par rapport à leur contrôle (mâles :  $p=0,0917$ ; femelles :  $*p=0,0017$ ;  $n=6$  par groupe). **(C)** L'expression protéique est inchangée chez les mâles 6 mois ( $p=0,366$ ), mais est diminuée chez les femelles AT1R en comparaison aux femelles CTL ( $p=0,031$ ) ( $n=3$  par groupe). Le Western blot a été normalisé à partir des protéines totales en « Stain-Free », 30  $\mu\text{g}$  par puit. Le test de Student a été effectué entre les groupes CTL et AT1R pour chaque sexe séparément. CTL; souris contrôles, AT1R; souris transgéniques, Cx43; connexine 43.

## Annexe 5 : Interrelation entre la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire et de l'insuffisance cardiaque



La fibrillation auriculaire va contribuer à la dysfonction du ventricule gauche, par la perte de contractions efficaces de l'oreillette gauche et par l'augmentation de la fréquence cardiaque.(138) De plus, l'insuffisance cardiaque contribue au développement de fibrillation auriculaire par l'altération de l'homéostasie calcique et de l'activité électrique dans l'oreillette, ainsi qu'à l'augmentation de la pression dans l'oreillette gauche.(138) L'insuffisance cardiaque pourrait aussi induire des remodelages des oreillettes en réponse à la dysfonction du ventricule gauche, qui induit des signaux pro-arythmiques.(137,138) (Adaptée de Prabhu et al.(138))

## **Annexe 6 : Curriculum vitae abrégé**

### **Bourses :**

- **2018** Bourse de stagiaire de recherche conjointement offerte par la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal et le laboratoire d'accueil (4 500\$)
- **2019** Bourse d'excellence du Fonds du centenaire de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (17 500\$)
- **2020** Postgraduate Pharmacy Fellowship Award offerte par l'Association des Facultés de pharmacie du Canada (AFPC) en collaboration avec Merck Canada (15 000\$)
- **2020-2021** Bourse de formation de maîtrise du Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) (17 500\$/an pour deux années)

### **Prix et distinctions :**

- **2019** Cheminement Honor au Baccalauréat en sciences biopharmaceutiques, Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal
- **2019** « Prix d'excellence Louis-Cartilier » - Excellence académique et leadership dans la vie facultaire - 3e année du Baccalauréat en sciences biopharmaceutiques, Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (2 000\$)
- **2020** Prix de l'axe « Découverte et validation de cibles thérapeutiques » pour la meilleure présentation par affiche aux cycles supérieurs de la 9e édition du Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (250\$)
- **2021** Prix de la Fondation familiale Jacques Landreville 2021 – 1<sup>er</sup> prix Maîtrise, Institut de cardiologie de Montréal pour la meilleure présentation étudiante aux séminaires (500\$)
- **2021** Prix « Coup de cœur du public » pour la catégorie « Présentation orale en Recherche Fondamentale » lors de la Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal (500\$)

**Présentations orales :**

Demers J, Fiset C. Remodelage électrique des oreillettes induit par l'angiotensine II favorisant la fibrillation auriculaire. *Séminaire du 4 juin 2021 à l'Institut de cardiologie de Montréal* Juin 2021

Demers J, Fiset C. Altération de la conduction électrique auriculaire chez des souris transgéniques surexprimant le récepteur de type 1 à l'angiotensine II. *Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, 23e édition.* Juin 2021

Demers J. Remodelage auriculaire induit par la surexpression cardiaque du récepteur de type I à l'angiotensine II. *Journée facultaire de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal.* Juillet 2020

**Présentations par affiche :**

Demers J, Ton AT, Huynh F, Thibault S, Fiset C. Remodelage des oreillettes des souris surexprimant le récepteur de type I à l'angiotensine II (AT1R). *Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, 9e édition* Décembre 2020, Montréal

Demers J, Thibault S, Ton AT, Fiset C. Caractérisation du remodelage structurel auriculaire de souris surexprimant le récepteur de type I à l'angiotensine II (AT1R). *Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, 8e édition* Décembre 2019, Montréal

Demers J, Thibault S, Ton AT, Fiset C. Caractérisation du remodelage structurel auriculaire induit par l'angiotensine II. *Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 61e édition* Octobre 2019, Estérel, Canada

Demers J, Thibault S, Ton AT, Fiset C. Le rôle de l'angiotensine II dans le développement de la fibrillation auriculaire. *Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, 22e édition* Juin 2019, Montréal

Thibault S, Ton AT, Demers J, Huynh F, Fiset C. Propriétés des oreillettes responsables de la prédisposition des mâles à la fibrillation auriculaire. *Rendez-vous de la recherche pharmaceutique de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal*, 7e édition Décembre 2018

**Résumé de communications:**

Demers J, Ton AT, Huynh F, Thibault S, Fiset C. Atrial remodeling induced by chronic stimulation of angiotensin II leading to atrial fibrillation. *Canadian Pharmacy Education and Research Conference (CPERC) 2020 77th edition*. May 2020, Montréal, Canada (Accepté – Congrès reporté)

Demers J, Ton AT, Huynh F, Thibault S, Fiset C. Atrial remodeling induced by chronic stimulation of angiotensin II leading to atrial fibrillation. *PSWC 2020*. May 2020, Montréal, Canada (Accepté – Congrès reporté)

Thibault S, Ton AT, Demers J, Huynh F, Fiset C. Facteurs prédisposant le sexe masculin à la fibrillation auriculaire. *Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ)*, 61e édition Octobre 2019, Estérel, Canada

Thibault S, Ton AT, Demers J, Huynh F, Fiset C. Facteurs prédisposant le sexe masculin à la fibrillation auriculaire. *Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal*, 22e édition Juin 2019, Montréal

Thibault S, Ton AT, Demers J, Huynh F, Fiset C. Sex differences leading to the male predisposition to atrial fibrillation. *Annual Meeting of the Upstate New York Cardiac Electrophysiology Society*, 28e édition Octobre 2018, Utica, New-York