

2m11.3019.10

Université de Montréal

Évolution temporelle des changements structurels survenant au cours
du remodelage auriculaire dans un modèle canin
d'insuffisance cardiaque.

par
Sophie Cardin

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention d'un grade de Maîtrise
en pharmacologie

Décembre 2001

©copyright, Sophie Cardin, 2001



W
4

U58

2002

N. 126

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :
Évolution temporelle des changements structurels survenant au cours
du remodelage auriculaire dans un modèle canin
d'insuffisance cardiaque.

présenté par :

...Sophie Cardin.....

a été évalué par les personnes suivantes :

.....Denis DeBlois.....
président-rapporteur

.....Stanley Nattel.....
directeur de recherche

.....Éric Thorin.....
codirecteur

.....Yahye Merhi.....
membre du jury

Résumé

Introduction : Il a précédemment été démontré qu'il y avait présence d'apoptose chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (FA), mais l'évolution de l'incidence de l'apoptose au cours du temps dans les modèles de FA n'a pas été mesurée. Cette étude vise à évaluer l'apoptose et les phénomènes liés à l'apoptose dans un modèle expérimental de FA induite par insuffisance cardiaque (IC).

Méthodes et résultats : Des chiens étaient soumis à différentes périodes de tachycardie ventriculaire (TV) allant jusqu'à 5 semaines. Un niveau significatif d'apoptose (DNA laddering, TUNEL) a été mesuré après 24 heures et persistait jusqu'à 1 semaine de TV. L'apoptose était précédée d'un accroissement tissulaire (mais pas plasmatique) d'angiotensine II, d'une activation des « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs) p38, JNK et ERK, qui commençait après 6 heures et d'une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 après 12 heures de TV. Une augmentation significative de mort cellulaire, d'infiltration de leucocytes et d'activité de la caspase-3 a été observée au temps où l'apoptose était maximale. L'apoptose était suivie d'une hypertrophie cellulaire, qui atteignait un maximum après 1 semaine de TV et d'une fibrose interstitielle, qui atteignait un maximum après 5 semaines de TV et qui corrélait avec la durée des FA.

Conclusions : La TV entraîne une augmentation significative, mais transitoire de l'apoptose auriculaire, qui était précédée par une augmentation tissulaire d'angiotensine II et une activation de MAPK et était suivit par un remodelage structurel progressif. L'apoptose pourrait jouer un rôle centrale dans le remodelage structurel auriculaire arythmogénique induit par IC et pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour prévenir le développement d'un substrat pour la FA.

Mots clés : Fibrillation auriculaire, insuffisance cardiaque, remodelage structurel, apoptose, fibrose, MAPK, angiotensine II.

Summary

Background: There is evidence for atrial apoptosis in patients with atrial fibrillation (AF), but the occurrence and time-course of apoptosis in experimental AF models have not been demonstrated. This study evaluated apoptosis and related phenomena in an experimental model of congestive heart failure (CHF)-related AF.

Methods and Results: Dogs were subjected to ventricular tachypacing (VTP) for varying periods up to 5 weeks. Significant apoptosis (DNA fragmentation, TUNEL) developed 24 hours after VTP onset and persisted for 1 week. Apoptosis was preceded by significant increases in tissue (but not plasma) angiotensin-II concentration and activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) p38, JNK and ERK, which began 6 hours after VTP onset, and a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio at 12 hours. Substantial increases in cell death, leukocyte infiltration and caspase-3 activity were noted at the time of peak apoptosis. Apoptosis was followed by cell hypertrophy, which reached maximum after 1 week of VTP, and by interstitial fibrosis, which peaked at 5 weeks and correlated with AF duration.

Conclusions- VTP causes substantial but transient atrial apoptosis, which is preceded by tissue angiotensin-II accumulation and mitogen-activated protein kinase stimulation and is followed by progressive structural remodeling. Apoptosis may play a central role in CHF-induced arrhythmogenic atrial structural remodeling and may be an interesting new target for therapies designed to prevent the development of the AF substrate.

Key words: Atrial fibrillation, heart failure, structural remodeling, apoptosis, fibrosis, MAPK, angiotensin II.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	i
SUMMARY ET KEY WORDS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
1. Introduction	1
<i>1.1 Fibrillation auriculaire</i>	1
<i>1.1.1 Épidémiologie</i>	1
<i>1.1.2 Nosologie</i>	1
<i>1.1.3 Étiologie</i>	3
<i>1.1.4 Mécanismes</i>	5
<i>1.1.4.1 Notions de base.</i>	5
<i>1.1.4.2 Remodelage induit par tachycardie auriculaire.</i>	7
<i>1.1.4.3 Remodelage induit par insuffisance cardiaque.</i>	12
<i>1.1.4.4 Traitements</i>	12
<i>1.2 L'insuffisance cardiaque</i>	18
<i>1.2.1 Définition</i>	18
<i>1.2.2 Mécanismes</i>	19
<i>1.2.2.1 Altérations hémodynamiques.</i>	19
<i>1.2.2.2 Hypertrophie.</i>	21
<i>1.2.2.3 Inflammation</i>	22

1.2.2.4 <i>Implication du système rénine-angiotensine.</i>	22
1.2.2.5 <i>La fibrose</i>	27
1.2.2.6 <i>La mort cellulaire</i>	28
1.2.3 <i>Modèles expérimentaux</i>	28
1.3 <i>L'apoptose</i>	30
1.3.1 <i>Définition</i>	30
1.3.2 <i>Mécanisme</i>	30
1.3.3 <i>Implication dans les pathologies cardiovasculaires</i>	36
2. Questions soulevées et hypothèse de travail	39
3. Article (Atrial apoptosis and evolution of atrial fibrillation substrate in experimental ventricular tachypacing induced heart failure)	42
1. Abstract	43
2. Condensed abstract	44
3. Introduction	45
4. Materials and methods	46
-General	46
-Apoptosis measurement	47
-Caspase-3 activity	48
-Histopathology and immunohistochemistry	48

-Western blots	49
-Tissue and plasma angiotensine II	50
5. Results	51
-Evidence of apoptosis	51
-Angiotensine II and MAPK expression	52
-Histopathological studies	52
-Changes in DAF and fibrous tissue content	53
6. Discussion	53
-Relationship to previous findings regarding structural remodeling and AF	54
-Ventricular structural remodeling	55
-Novel aspects and potential significance	55
-Potential limitations -	57
7. Acknowledgements	58
8. References	59
9. Figure legends	62
10. Figures	64
4. Discussion	72
<i>4.1 Nouveaux éléments</i>	72
<i>4.2 Comparaison des résultats avec la littérature</i>	73
<i>4.3 Mécanismes suggérés</i>	76
<i>4.4 Impacts futurs</i>	78

4.5 Directions futures

79

5. Bibliographie

86

LISTE DES FIGURES

1. Introduction

Figure 1	Electrocardiogrammes enregistrés chez le chien	2
Figure 2	Mécanismes de fibrillation auriculaire :	4
	A) Foyer ectopique	
	B) Macro-réentrée	
	C) Micro-réentrée	
Figure 3	Circuit de réentrée	6
Figure 4	Causes de réentrée	8
Figure 5	Potentiel d'action auriculaire	10
Figure 6	Cascade des MAPKs	26
Figure 7	Cascade apoptotique	37

3. Article

Figure 1	Top) Examples of atrial tissue from control and 24 hours VTP	64
	Bottom) Percentage of TUNEL atrial cardiomyocytes	
Figure 2	Top) Example of DNA gels	65
	Bottom) Fragmented DNA as a function of VTP duration	
Figure 3	Caspase-3 activity as a function of VTP duration	66
Figure 4	Top) Atrial expression of Bax and Bcl-2	67
	Bottom) Bax/Bcl-2 ratio as a function of VTP duration	
Figure 5	A) Atrial angiotensin-II concentration	68
	B) Plasmatic angiotensin-II concentration	
Figure 6	A) Atrial expression of phosphorylated and total ERK1/2	69
	B) Atrial expression of phosphorylated and total P38	

C) Atrial expression of phosphorylated and total JNK

Figure 7

A) Mononuclear, polymorphonuclear and total white cells per field 70

B) Percentage of non-viable and TUNEL-positive cardiomyocytes

C) Atrial myocyte length

Figure 8

A) DAF as a function of VTP duration

71

B) Percentage of fibrous tissue

C) Relationship between DAF and fibrous tissue content

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFFIRM	Atrial fibrillation follow-up investigation of rhythm management
AIF	Apoptosis inducing factor
AMP	Adénosine monophosphate
APAF-1	Apoptosis protease activating factor-1
ATP	Adénosine triphosphate
AT1	Récepteur de type 1 de l'angiotensine
AT2	Récepteur de type 2 de l'angiotensine
AT3	Récepteur de type 3 de l'angiotensine
AT4	Récepteur de type 4 de l'angiotensine
AV	Auriculo-ventriculaire
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase recrutement domain
CED	<i>Caenorhabditis elegans</i> death protein
ced	<i>Caenorhabditis elegans</i> death gene
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CREB	cAMP response element-binding site
CSAID	Cytokine-suppressive anti-inflammatory drug
DAF	Duration of atrial fibrillation
dATP	Désoxy adénosine triphosphate
DD	Death domains
DED	Death effector domain

DISC	Death inducing signaling complexes
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ELISA	Enzymatic immunoassay
ERK	extracellular signal-related kinase
FA	Fibrillation auriculaire
HSP	Heat shock protein
I_{Ca}	Courant calcique
ICAD	Inhibitor of Caspase-activated DNase
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
I_{Na}	Courant sodique
I_{Kur}	Courant potassique <u>u</u> ltra- <u>r</u> apide
I_{Kr}	Courant potassique <u>r</u> apide
I_{Ks}	Courant potassique lent (<u>s</u> low)
I_{to}	Courant potassique transitoire sortant (transient <u>o</u> utward current)
IL-1 β	Interleukine-1 β
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kiloDalton
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPKAP	Mitogen activated protein kinase activated protein
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase
MEKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
NCX	Échangeur sodique/calcique

NO	Oxyde nitrique
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PT-pore	Permeability transition pore
RIA	Radioimmunoassay
SAPK	Stress-activated protein kinase
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TUNEL	Terminal dUTP nicked-end labeling
TV	Tachycardie ventriculaire
VTP	Ventricular tachypacing

1. Introduction

1.1 Fibrillation auriculaire

1.1.1 Épidémiologie

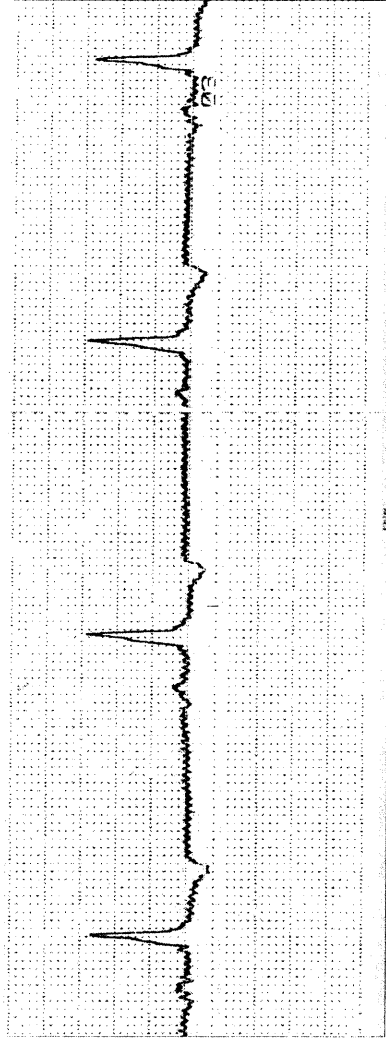
La fibrillation auriculaire est l'arythmie la plus anciennement connue et la plus fréquente rencontrée en milieu clinique, affectant chaque année de 2 à 3 nouveaux cas par 1000 personnes âgées de 55 à 64 ans et 35 nouveaux cas par 1000 personnes de 85 à 94 ans ¹. La fibrillation auriculaire survenant en absence de cardiomyopathie est qualifiée d'isolée et son incidence est d'environ 3%. Chez les patients âgés de moins de 60 ans, le pronostic relié à la fibrillation auriculaire isolée est bénin. Cependant, chez les patients âgés de plus de 61 ans, la fibrillation auriculaire isolée est associée à une augmentation de la mortalité. Des études cliniques telles que AFFIRM (Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management) sont présentement en cours afin de déterminer si les traitements actuels pour ce type d'arythmie réduisent la mortalité liée à la fibrillation auriculaire ².

1.1.2 Nosologie

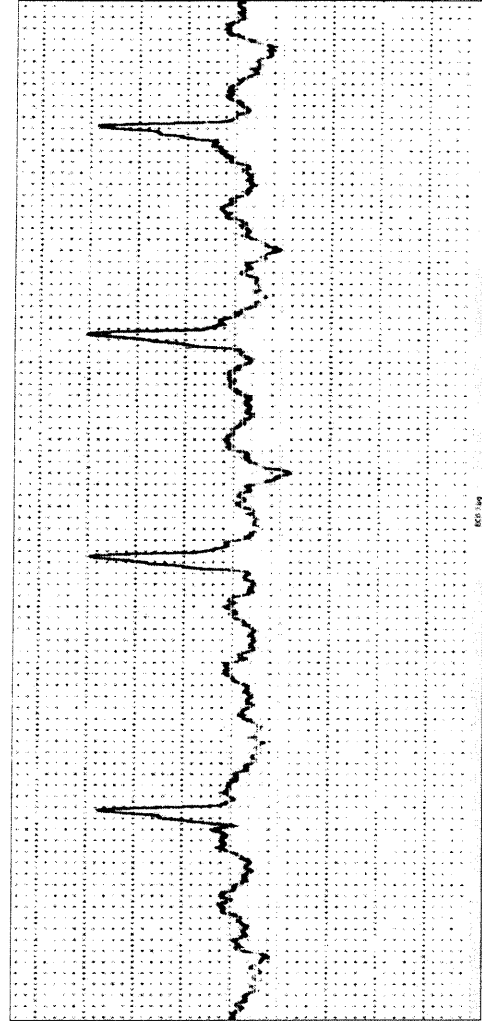
La fibrillation auriculaire consiste en un trouble du rythme supra-ventriculaire caractérisé par une absence d'activité auriculaire organisée, donc d'ondes P clairement individualisées et leur remplacement par des oscillations rapides (400 à 700 battements par minute) appelées ondes «f»³, (Figure 1). Ces ondes irrégulières varient par le temps qui les sépare, par leur morphologie et par leur amplitude, en fonction du

Figure 1.

Électrocardiogrammes enregistrés chez le chien.



Rythme sinusal



Fibrillation auriculaire

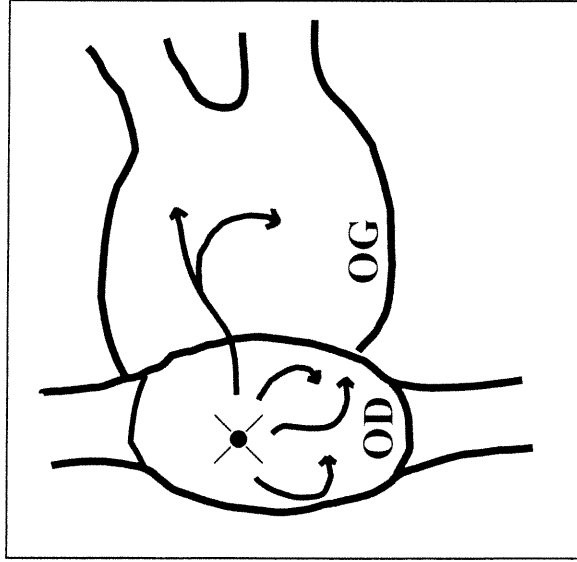
nombre et de la longueur d'onde des circuits de réentrée. Alors que normalement, la contraction des oreillettes complète le remplissage de la diastole ventriculaire et assure la fermeture présystolique des valves auriculo-ventriculaires, la fibrillation auriculaire entraîne une disparition instantanée de toute contraction atriale menant à une baisse de la pression systolique et à une hausse de la pression diastolique. À long terme, il y aura une augmentation de la pression auriculaire accompagnée d'une dilatation et d'une altération de la structure des oreillettes. La fibrillation auriculaire peut aussi entraîner une forte irrégularité du rythme ventriculaire et à long terme, lorsque ce dernier est mal contrôlé, résulter en une série de changements structuraux qui causeront une dysfonction ventriculaire.

1.1.3 Étiologie

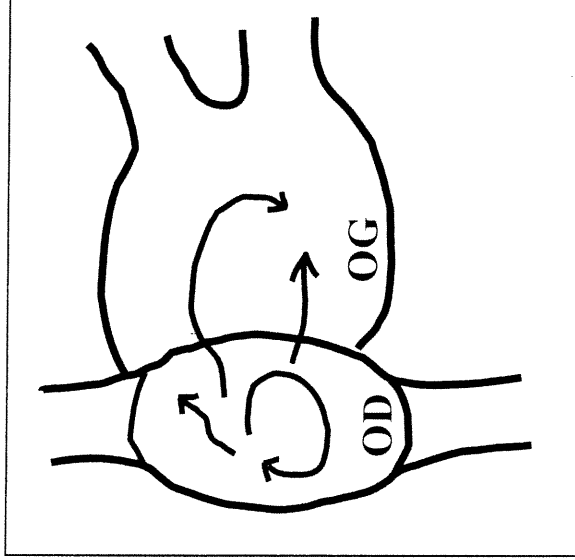
La fibrillation auriculaire peut être transitoire (ou paroxysmale) lorsque sa cause est aiguë, auquel cas le traitement de la cause entraîne généralement la disparition de l'arythmie ⁴. Elle est cependant fréquemment persistante, liée dans 80% des cas à une cardiomyopathie telle qu'une valvulopathie, une maladie coronarienne, une cardiomyopathie dilatée ou une cardiomyopathie hypertrophique. Les symptômes fréquemment observés chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire sont la présence de palpitations ainsi que de péricordialgies. À long terme, les complications envisageables de cette pathologie sont les risques de syncope, la perte d'un ajustement précis du rythme ventriculaire aux besoins métaboliques, les thrombo-embolies (souvent cérébrales, parfois rénales, mésentériques ou cardiaques) et le développement d'insuffisance cardiaque.

Figure 2.

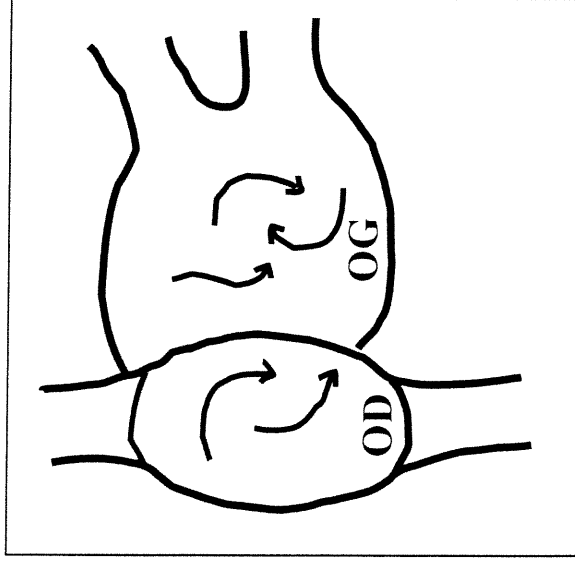
Mécanismes de fibrillation auriculaire



A. Foyer ectopique



B. Macro-réentrée



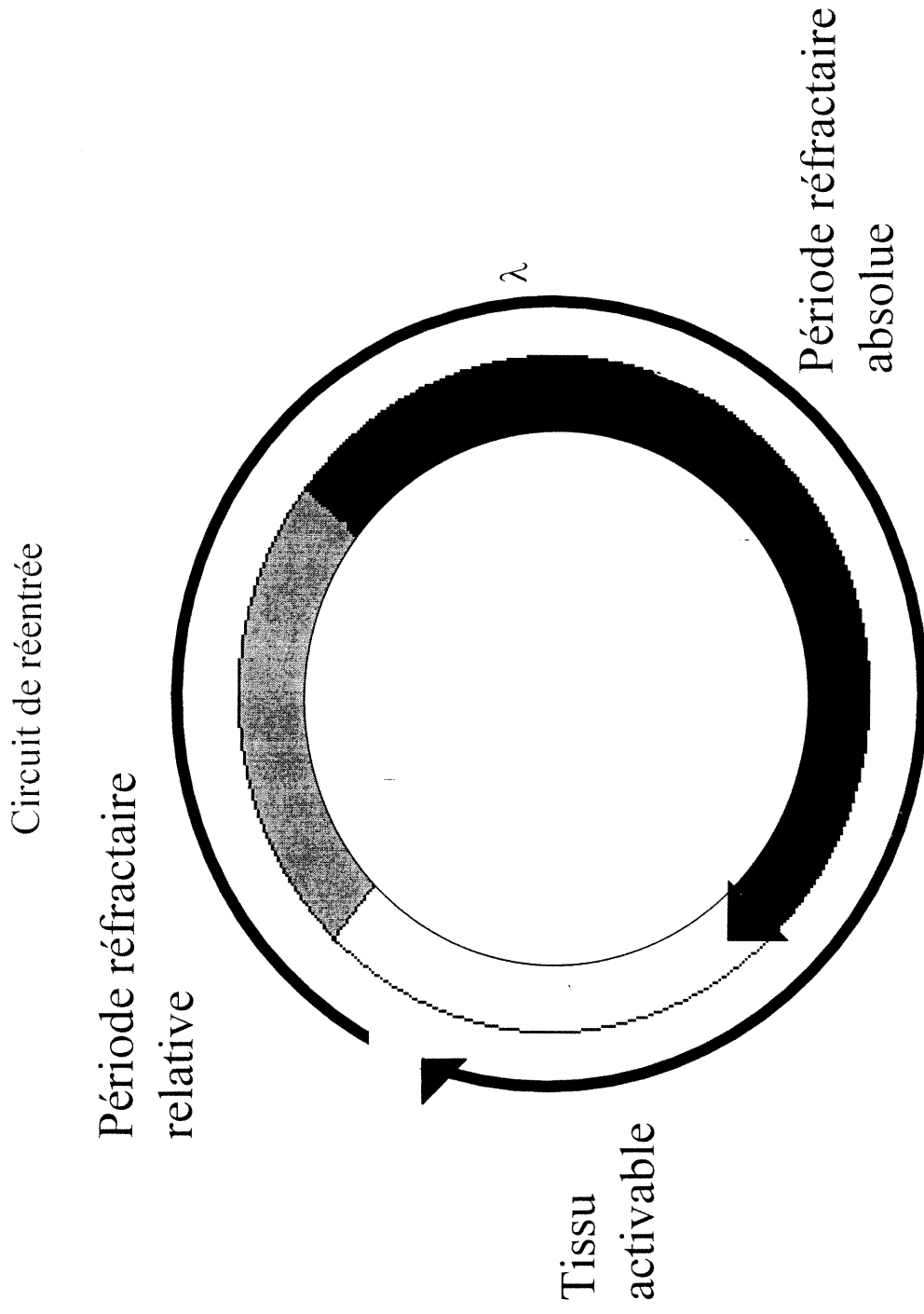
C. Micro-réentrée

1.1.4 Mécanismes

1.1.4.1 Notions de base. Les mécanismes qui engendrent les arythmies peuvent être liés à la genèse de l'influx, par un automatisme anormal ou une activité déclenchée par des post-dépolarisations précoces ou tardives ⁵. Par exemple, la présence d'un foyer de stimulation ectopique, fréquemment situé à proximité des veines pulmonaires (94% des cas), a été observé chez certains patients par Haïssaguerre ⁶ (Figure 2A). Les arythmies peuvent aussi être liées à la propagation de l'influx, via des phénomènes de rentrée attribuables à des obstacles anatomiques ou fonctionnels. Dans le cas de la fibrillation auriculaire, l'arythmie est fréquemment attribuable à la formation de multiples circuits de micro-rentree ⁵ (Figure 2C). La propagation de l'arythmie implique alors la présence de nombreux circuits de réentrée, indépendants, autour d'obstacles anatomiques où certains circuits se forment alors que d'autres se terminent. Il arrive aussi occasionnellement que la fibrillation auriculaire soit liée à un phénomène de macro-réentrée (Figure 2B). Ce type de réentrée implique la formation d'un circuit-mère autour d'un obstacle anatomique, tel que la veine cave ou les veines pulmonaires. De ce dernier seraient générés d'autres circuits qui exciteraient les tissus environnants, propageant le courant de façon excentrique ⁷.

Les troubles de conduction intra-auriculaire ainsi que les anomalies de périodes réfractaires constituent deux facteurs importants de risque d'arythmie auriculaire ⁵ (Figure 3). En fait, le risque de formation de circuit de réentrée augmente de façon inversement proportionnelle au produit de la vitesse de conduction et de la durée des périodes réfractaires

Figure 3.

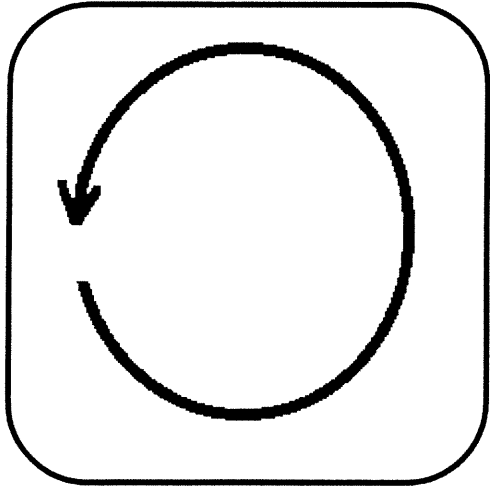


qui représente la longueur d'onde (λ). En effet, plus la durée des périodes réfractaires sera courte, moins le risque que le front d'un circuit de réentrée soit arrêté par la présence de tissu non excitable (en période réfractaire) en aval du front est grand. De même, plus la vitesse de conduction est lente, plus la probabilité que le tissu revienne à un état excitable avant d'être rejoint par le front du circuit est grande. Ainsi, la longueur d'onde détermine la taille minimale que peut avoir un circuit de réentrée pour se perpétuer. Dans un cœur sain, la longueur d'onde des circuits de réentrée tend à être suffisamment longue pour ne pas permettre le maintien de multiples circuits de réentrée. Le remodelage électrique qui survient suite à différentes pathologies tend à raccourcir la longueur d'onde et donc la taille des circuits, favorisant le maintien de multiples circuits de réentrée⁸. L'utilisation de drogues anti-arythmiques vise donc à prolonger la longueur d'onde en affectant la durée des périodes réfractaires ou la conduction électrique, de manière à augmenter la taille minimale d'un circuit de réentrée et à ne plus permettre le maintien de plusieurs circuits de réentrée (Figure 4).

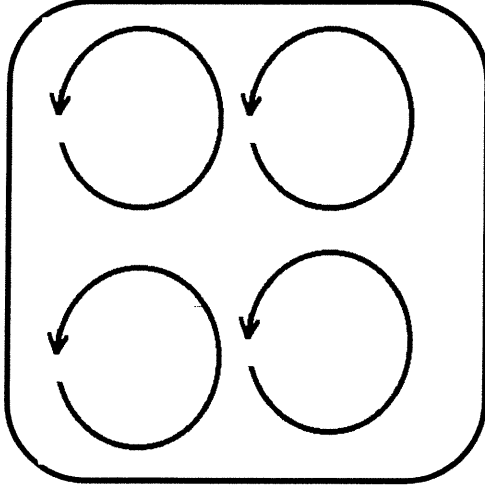
1.1.4.2 Remodelage induit par tachycardie auriculaire. Bien que connue depuis plus d'un siècle, la fibrillation auriculaire a fait l'objet de nombreux travaux depuis les dernières décennies. Un développement récent dans la compréhension des mécanismes de fibrillation auriculaire a été la démonstration par Wijffels que cette dernière induit des changements électrophysiologiques qui favorisent son propre maintien⁹. Ceci fut démontré dans un modèle de FA maintenue électriquement chez la chèvre. Les changements électrophysiologiques qu'il a observés comprenaient le raccourcissement des périodes réfractaires ainsi que de

Figure 4.

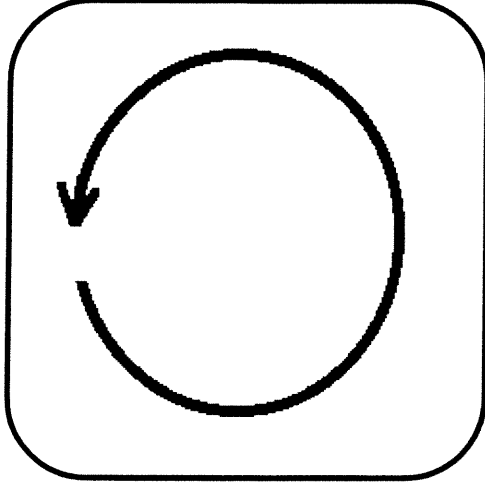
Causes de réentrée



Tissu normal:
-FA non soutenue



Tissu avec λ raccourci:
-FA soutenue



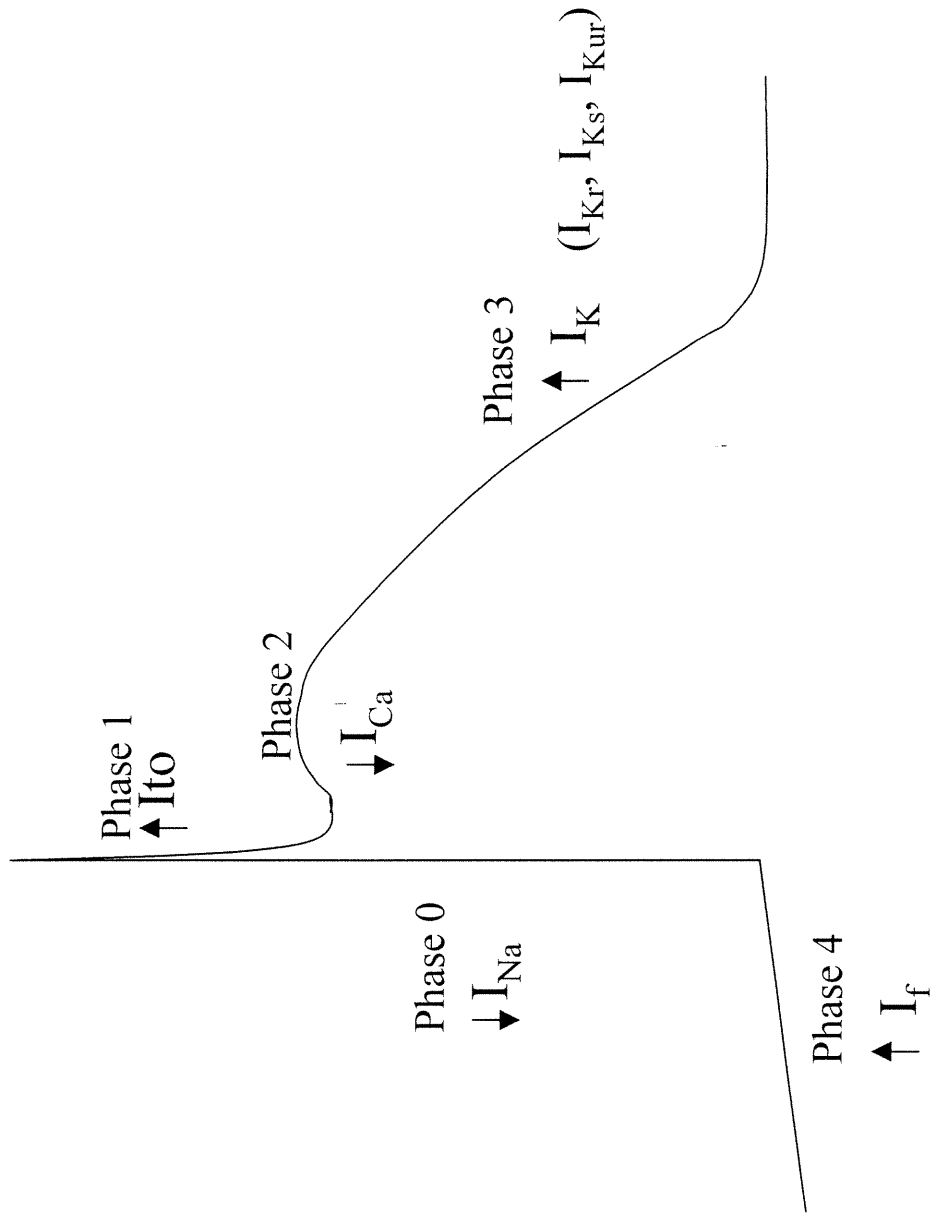
Traitement pharmacologique:
-Prolongation λ

↓
-FA non soutenue

la longueur d'onde des FA. Plusieurs études ont alors été dirigées sur les changements des différents canaux ioniques impliqués dans la genèse du potentiel d'action auriculaire. Un exemple de potentiel d'action⁸ est illustré à la figure 5. Les courants entrants, ou dépolarisants, sont illustrés par des flèches pointant vers le bas et les courants sortants, ou repolarisants, sont illustrés par des flèches pointant vers le haut. La phase 0 du potentiel d'action est caractérisée par une dépolarisation rapide du potentiel de membrane, due à une forte augmentation du courant sodique (I_{Na}) qui fait monter le potentiel de la cellule de -70mV à $+40\text{mV}$. La phase 1 consiste en une repolarisation rapide et partielle due à une sortie de potassium par les canaux potassiques transitoires sortants, I_{to} (transient outward current). Ceci est suivi de la phase 2, appelée fréquemment plateau, qui est caractérisée par un courant entrant de Ca^{++} par les canaux calciques de type L (I_{Ca}). La phase 3, ou phase de repolarisation, implique l'activation d'une série de courants potassiques sortants (I_K) qui sont temps-dépendants (appelés delayed-rectifier). Chez l'humain, trois types de courants potassiques existent au niveau des oreillettes : I_{Kur} (ultra-rapid), I_{Kr} (rapid), et I_{Ks} (slow). Chez les cellules pacemaker, la dépolarisation automatique de la phase 4 est liée à un courant K^+ entrant (I_f). La pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX) qui échange 3 Na^+ pour un Ca^{++} produit aussi un courant entrant vers la fin de la phase 3 et pendant la phase 4.

L'équilibre entre les courants entrants et les courants sortants détermine la durée des potentiels d'action. En effet, une augmentation des courants entrants prolonge la durée du potentiel d'action et une augmentation des courants sortants raccourcit la durée du potentiel

Figure 5.



Potentiel d'action auriculaire

d'action. Le changement de différents courants a été observé au cours du processus du remodelage électrique auriculaire. Par exemple, l'augmentation de 5 à 10 fois du rythme auriculaire lors de fibrillation auriculaire entraînerait une accumulation de Ca^{++} intracellulaire¹⁰. Pour maintenir son homéostasie, la cellule tendrait alors à réduire les courants I_{Ca} en inactivant les canaux calciques et à long terme, elle réduirait la synthèse d'ARNm encodant pour la sous-unité responsable de la formation du pore des canaux, la sous-unité α . Le courant I_{Na} serait aussi réduit lors du remodelage électrique, ce qui pourrait contribuer au ralentissement de la conduction électrique et favoriser le maintien des fibrillations auriculaires¹¹. Quant aux courants potassiques, il semble que I_{to} serait réduit^{12,13} et que I_{K1} serait aussi affecté^{12,14}. Une altération de l'expression de la connexine 40, impliquée dans la formation des jonctions Gap et responsable de la communication inter-cellulaire, a aussi été observée¹⁵.

En plus des altérations au niveau des propriétés électrophysiologiques, la tachycardie auriculaire cause des changements ultrastructuraux tels que le gonflement des mitochondries, l'hypertrophie, la dégénération du réticulum sarcoplasmique, la dégradation de myofibrilles et l'accumulation de glycogène¹⁶. D'autres changements tels que l'augmentation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, de la kinase ERK (extracellular signal-related kinase) et du récepteur AT2 de l'angiotensine et la diminution du récepteur AT1 de l'angiotensine ont été observés¹⁷. Finalement, une augmentation de l'activité de la caspase-3 et du nombre de cellules marquées positivement au test de TUNEL a

été observée ¹⁸, mais il n'est pas clair si ceux-ci sont dus à la FA ou à la maladie cardiaque sous-jacente.

1.1.4.3 Remodelage induit par insuffisance cardiaque. Des études effectuées sur des modèles d'insuffisance cardiaque ont montré que cette pathologie peut mener à l'avènement de fibrillation auriculaire en induisant un remodelage auriculaire. Au niveau électrophysiologique, les courants I_{Ca} ¹⁹, I_{to} ²⁰ et I_{Ks} ²¹ seraient réduits alors que le courant entrant dû à la pompe NCX serait augmenté ²². La somme des changements des différents courants n'entraîne pas de diminution de la durée du potentiel d'action et ne favorise pas le maintien de circuit de réentrée. Au point de vue structurel, l'augmentation de tissu conjonctif pourrait affecter la conduction électrique et favoriser ainsi l'induction de FA ²³. Li *et al* ²⁴ ont observé que cette augmentation serait précédée de l'augmentation du niveau d'angiotensine tissulaire et l'activation de différentes MAPK (P38, JNK et ERK), alors que le traitement à l'enalapril préviendrait l'activation de ERK, diminuerait l'accumulation de tissu conjonctif et réduirait la durée des FA.

1.1.5 Traitements

Les traitements actuels pour la fibrillation auriculaire visent un contrôle de la fréquence cardiaque et du risque thrombo-embolique et si possible un retour au rythme sinusal et un maintien de ce dernier. L'interruption des FA peut se faire par trois types d'approches, soit électrique, soit chirurgicale, soit pharmacologique. La cardioversion électrique externe est une méthode utilisée depuis des années pour terminer les tachycardies liées à un mécanisme réentrant et son efficacité

est d'environ 90% ²⁵. Plusieurs théories ont été émises quant au mécanisme exact par lequel la cardioversion électrique termine les arythmies. Il a été suggéré notamment qu'elle pourrait agir par la dépolarisation d'une masse excitable suffisamment importante pour que soient interrompus les différents circuits existants dans le cœur au moment du choc. La délivrance d'un choc intra-auriculaire droit via un cathéter d'électrophysiologie, ou cardioversion interne, peut être envisagée en cas de résistance à la cardioversion par choc électrique externe ²⁵. Cependant, bien que chez la majorité des patients, la cardioversion électrique parvienne à restaurer le rythme sinusal, le taux de récurrence de fibrillation auriculaire demeure élevé lorsque aucune thérapie pharmacologique n'est utilisée pour maintenir le rythme cardiaque. L'implantation d'un défibrillateur peut aussi être envisagée, dans les cas d'arythmie paroxysmale notamment, où le défibrillateur peut agir au niveau auriculaire et au niveau ventriculaire, lorsqu'une tachycardie est induite par la FA ¹. L'appareil peut être déclenché volontairement par le patient lors d'épisodes d'arythmie ne causant pas suffisamment de désordre hémodynamique pour déclencher le défibrillateur

Au point de vue chirurgical, la procédure de Maze consiste en une série d'incisions qui forment un chemin complexe de tissu auriculaire, de telle sorte qu'aucun segment n'ait une aire suffisamment importante pour soutenir de multiples circuits de réentrée ¹. Cette procédure est toutefois limitée par la gravité de l'intervention, qui requiert une circulation extra-corporelle. Elle n'est donc utilisée que lorsqu'une autre intervention chirurgicale, telle qu'une chirurgie au niveau de la valve mitrale, est

nécessaire. Dans le cas de fibrillation auriculaire causée par la présence d'un foyer de stimulation ectopique, l'ablation focale peut être suffisante pour abolir l'arythmie ¹. Lorsque l'arythmie n'est pas contrôlée par les traitements pharmacologiques et qu'elle affecte la fonction ventriculaire, une ablation par radio-fréquence du nœud auriculo-ventriculaire (nœud responsable de la conduction de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules) additionnée à l'implantation d'un pacemaker qui régulera le rythme ventriculaire peut être envisagée ¹.

Les risques thrombo-emboliques peuvent être contrôlés de façon pharmacologique ²⁶. Il existe trois classes de médicaments anti-thrombotiques, soit les anti-agrégants plaquettaires, les héparines et l'anti-vitamine K. Cependant, les anti-agrégants plaquettaires ne sont pas appropriés car ils agissent essentiellement en limitant les thrombi initiés par une exposition des couches sous-endothéliales, alors que l'utilisation des héparines est limitée par le mode d'administration (intra-veineux), ce qui favorise l'utilisation d'anti-vitamine K (ex. : Wafarine) comme traitement à long terme contre la coagulation induite par fibrillation auriculaire.

Des traitements pharmacologiques peuvent être utilisés lors de fibrillation auriculaire pour ralentir la fréquence ventriculaire, entraîner la conversion de l'arythmie et maintenir le rythme sinusal. Quatre classes d'anti-arythmiques, établies par Vaughan Williams et basées sur leurs principaux effets sur le myocarde existent actuellement ²⁷. Les anti-arythmiques de classe I agissent principalement sur les canaux sodiques, inhibant l'influx rapide de sodium dans la phase 0, la phase de

dépolarisation, du potentiel d'action des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires et des cellules du tissu His-Purkinje. Les agents de cette classe ont été sous-classifiés selon qu'ils avaient un effet faible (IB, ex. : lidocaïne, mexilétine, tocainide, éthmozine), moyen (IA, ex. : quinidine, disopyramide, procainamide) ou important (IC, ex. : encainide, flecainide, propafénone) sur la phase 0 du potentiel d'action. Les anti-arythmiques de classe II représentent la famille des bêta-bloquants. La stimulation sympathique survenant dans les cas de niveaux élevés de catécholamines circulantes induit une augmentation de la vitesse de conduction, le raccourcissement des périodes réfractaires efficaces et une augmentation de l'excitabilité des cellules. Les bêta-bloquants préviennent ces changements tissulaires. Les anti-arythmiques de classe III (ex. : bretylium, N-acétyl-procainamide, sotalol, amiodarone) agissent sur la phase de repolarisation du potentiel d'action. En prolongeant la durée du potentiel d'action, ces agents prolongent la durée des périodes réfractaires et réduisent l'excitabilité des cardiomyocytes. Finalement, la classe IV comprend les bloqueurs de canaux calciques (ex. : verapamil). En inhibant les courants calciques, ces agents ralentissent les potentiels d'action dont la phase de dépolarisation repose sur l'influx de calcium, comme c'est le cas notamment au niveau des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire.

Les agents de classe IA, IC et III sont les plus efficaces pour la conversion et la prévention des fibrillations auriculaires²⁷. La quinidine est fréquemment utilisée comme première drogue pour la conversion de FA et comme traitement préventif à long-terme contre les arythmies. Elle agit sur tous les tissus cardiaques en ralentissant la vitesse de

conduction électrique. Généralement administrée par voie orale, cette drogue de classe IA agit aussi au point de vue hémodynamique (vasodilatation) et possède d'importants effets secondaires (nausée, vomissements, inconfort abdominal, diarrhée, aggravation de l'insuffisance cardiaque et torsades de pointes). L'encainide, le flecainide et le propafénone, trois agents de classe IC, agissent en réduisant la conduction électrique dans les tissus cardiaques. Leurs effets sur les tissus auriculaires et le nœud auriculo-ventriculaire leur confèrent la possibilité de convertir et de prévenir les FA ainsi que de ralentir la réponse ventriculaire lors d'arythmies supra-ventriculaires. L'amiodarone, bien que définie comme agent de classe III, possède aussi des effets de classe I, II et IV. Cependant, son effet principal est « anti-fibrillatoire », résultant de la prolongation de la durée du potentiel d'action ou du temps de repolarisation. Par son effet sur les canaux sodiques, l'amiodarone cause aussi une stabilisation de la membrane de façon semblable aux agents de classe I. L'ibutilide, un autre agent de classe III, est administré par voie intra-veineuse pour la conversion rapide de fibrillations auriculaires en rythme sinusal lorsque les patients présentent des symptômes graves de désordre hémodynamique et nécessitent une intervention rapide.

Les agents de classe II et IV ainsi que la digoxine sont principalement utilisés pour contrôler le rythme ventriculaire, dû à leur effet sur le nœud auriculo-ventriculaire (AV) ²⁷. L'effet principale de la digoxine est d'augmenter le tonus vagal, ralentissant ainsi le rythme sinusal, la conduction au nœud AV et prolongeant la durée de la période réfractaire au niveau du nœud AV. Pour ce qui est du maintien du rythme

sinusal, les β -bloquants ne se sont pas avérés très efficaces lorsqu'ils étaient utilisés seuls. Cependant, lorsqu'ils sont utilisés dans une thérapie combinée, tel qu'avec un anti-arythmique de classe I, ils peuvent s'avérer efficaces en inhibant l'effet des catécholamines qui tend à contrer l'effet de ralentissement de la vitesse de conduction des anti-arythmiques de classe I²⁷. L'administration de verapamil, un bloqueur de canaux calciques, par voie intra-veineuse a été étudiée chez des patients en fibrillation auriculaire. Le verapamil a permis la diminution du rythme ventriculaire, mais n'a pas permis le rétablissement du rythme sinusal²⁸. Dans un modèle canin de tachycardie auriculaire, le verapamil ne s'est pas non plus montré efficace pour rétablir le rythme sinusal²⁹.

En plus des drogues reconnues pour leurs effets sur les propriétés électrophysiologiques, des études effectuées sur le remodelage auriculaire suggèrent que d'autres traitements pharmacologiques pourraient avoir des effets bénéfiques en prévenant les altérations structurelles qui facilitent la FA. C'est le cas notamment de l'étude de Li *et al*²⁴, qui ont mesuré la durée des fibrillations auriculaires induites suite à un traitement chronique à l'enalapril de chiens souffrant d'insuffisance cardiaque induite par entraînement électrique rapide et l'ont comparée avec celle des animaux avec insuffisance cardiaque non-traités à l'enalapril. Ils ont observé une baisse significative de la durée des fibrillations auriculaires induites et du taux de fibrose auriculaire, un substrat pour les FA.

1.2 L'insuffisance cardiaque

1.2.1 Définition

Le coeur est une pompe dont le rôle est de faire circuler le sang à travers le système vasculaire, afin de procurer les nutriments et l'oxygène et de vidanger les déchets et le dioxyde de carbone de l'ensemble des organes. Lorsqu'une pathologie affecte le fonctionnement du coeur, deux problèmes peuvent survenir. Il se peut, d'une part, que le coeur ne parvienne plus à exercer la force nécessaire pour maintenir une fraction d'éjection assez importante pour fournir un débit sanguin suffisant dans l'aorte et les artères pulmonaires. Il se peut, d'autre part, que le coeur ne parvienne plus à se vider, favorisant l'accumulation de sang dans les réservoirs veineux³⁰. L'insuffisance cardiaque peut être définie comme un syndrome clinique débutant par des anomalies fonctionnelles et structurales du cœur qui entraînent progressivement une série de changements tels que l'hypertrophie, l'élargissement des chambres et une baisse de la fraction d'éjection et qui mènent à la manifestation de signes cliniques tels que la dyspnée, la fatigue et l'intolérance à l'exercice³¹. La « New York Heart Association » a classifié les niveaux de gravité d'insuffisance en quatre grandes classes. La classe I comprend les patients souffrant d'une maladie cardiaque, mais qui n'ont pas de limitation dans leur activité physique. La classe II comprend les patients souffrant d'une maladie cardiaque qui ne leur cause pas d'inconfort au repos, mais, qui lors d'exercice, entraîne de la fatigue, des palpitations, de la dyspnée ou de l'angine. La classe III inclue les patients souffrant de maladie cardiaque qui ne cause pas d'inconfort au repos, mais qui cause

d'importants inconforts lors d'activités physiques ordinaires. La classe IV comprend les patients souffrant de maladie cardiaque qui peuvent causer des inconforts même au repos et qui causent un inconfort important à la moindre activité physique ³¹. L'insuffisance cardiaque congestive est, quant à elle, définie comme une insuffisance cardiaque accompagnée de symptômes cliniques tels que la dyspnée, la cardiomégalie, et l'œdème périphérique. Elle consiste en une congestion circulatoire et survient en réponse à l'insuffisance cardiaque et aux autres changements de la circulation périphérique, accompagnée de l'activation du système nerveux sympathique et du système rénine-angiotensine ³¹.

1.2.2 Mécanismes

1.2.2.1 Altérations hémodynamiques. Lors de pathologies telles que les cardiomyopathies dilatées, les myocardites virales ou toxiques et les infarctus du myocarde, la capacité du cœur à éjecter son contenu est altérée ³⁰. L'altération de la contractilité cardiaque, ou inotropie, est la résultante d'une série de changements biochimiques et biophysiques et est donc complexe à quantifier. La loi de Starling montre que l'augmentation du volume de remplissage entraîne une augmentation de la force contractile, dû à un étirement des sarcomères. Pour un niveau donné de calcium intracellulaire, il y a une augmentation de la formation de ponts actine-myosine et une augmentation de la sensibilité des myofilaments au calcium avec l'étirement des sarcomères. Lors du développement de l'insuffisance cardiaque, la courbe de Starling est déplacée vers la droite, reflétant une diminution de la contractilité cardiaque. Ceci est causé par une diminution du raccourcissement des sarcomères en réponse à un étirement donné. Le problème central dans

l'insuffisance cardiaque demeure la perte de la performance cardiaque. Une systole insuffisante mène à l'augmentation du volume télé-diastolique. Alors qu'en condition normale, ceci entraînerait une augmentation du volume d'éjection lors de la contraction subséquente, en insuffisance cardiaque, une telle adaptation n'est pas possible. La fraction d'éjection, définie comme le quotient du volume éjecté lors de la systole sur le volume télé-diastolique, est donc réduite en insuffisance cardiaque. Lors de pathologies telles que la tachycardie, l'hypertension ou la cardiomyopathie hypertrophique, c'est la capacité du cœur à se relâcher afin de permettre le remplissage, ou lusitropie, qui est affectée. Cette dysfonction diastolique résulte en une augmentation de la pression de remplissage et éventuellement en œdème pulmonaire³⁰.

Le développement de l'insuffisance cardiaque débute généralement par une phase de compensation³⁰. Durant cette période, le débit cardiaque et la fonction cardiaque peuvent être maintenus malgré la dysfonction myocardique, par des mécanismes compensatoires tels que l'hypertrophie, l'activation de systèmes neuroendocriniens, la vasoconstriction, la rétention de fluide par les reins et la dilatation cardiaque. Ainsi, bien que la fraction d'éjection tende à chuter, le débit cardiaque et la pression artérielle peuvent être maintenus par différents mécanismes d'adaptation. Au niveau rénal, il y a rétention de sel et d'eau afin d'augmenter le débit cardiaque. Le système sympathique est activé par les barorécepteurs et il induit, par la sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline, une augmentation du rythme et de la contraction cardiaque et une vasoconstriction périphérique. Le système rénine-angiotensine-aldostérone est activé, pour induire à la fois une rétention d'eau et une

vasoconstriction périphérique. D'autres hormones sont sécrétées en réponse au déséquilibre hémodynamique, telles que la vasopressine et l'endothéline. La vasopressine est une hormone anti-diurétique libérée par l'hypothalamus lors d'augmentations de l'osmolalité du plasma, qui entraîne alors un sentiment de soif, une vasoconstriction et une rétention d'eau par les reins. L'expression de l'endothéline est stimulée par la présence d'autres facteurs dont l'angiotensine, les catécholamines et la vasopressine qui induisent la relâche du précurseur, la préproendothéline, qui sera ensuite clivée en proendothéline puis en endothéline. L'endothéline induit alors une vasoconstriction périphérique. À long terme, tous ces changements deviennent décompensatoires et aggravent l'état de la maladie ³⁰. En effet, l'augmentation de la rétention de sel et d'eau ainsi que la vasoconstriction périphérique, en augmentant la pression, augmentent le travail du cœur. De plus, à long terme, cela mène à la formation d'oedème et de congestion pulmonaire. L'activité accrue du système sympathique entraîne quant à elle une régulation négative des récepteurs β -adrénergiques en plus d'accroître les risques d'arythmie.

1.2.2.2 Hypertrophie. L'hypertrophie des cardiomyocytes vise à répondre à la demande d'augmentation de la force mécanique ³⁰. Dans le cas d'ischémie par exemple, la mort de nombreux cardiomyocytes a réduit la quantité de tissu contractile fonctionnel. L'hypertrophie est initialement bénéfique car elle permet de réduire la charge par cellule et d'augmenter le nombre d'éléments contractiles (les sarcomères). Lorsque l'insuffisance est liée à une pression surélevée, comme dans le cas d'hypertension, l'hypertrophie développée est de type concentrique, caractérisée par un épaississement des parois et une baisse du volume des

chambres ³⁰. Les myocytes croissent alors en diamètre. Lorsque l'insuffisance est liée à un volume surélevé, comme dans le cas de myocardites, l'hypertrophie développée est de type excentrique, caractérisée par un élargissement des chambres. Les myocytes croissent alors en longueur, dû à l'addition de nouveaux sarcomères en série. Dans les stades avancés d'insuffisance cardiaque, les cellules sont très allongées, créant un ventricule large, dilaté et dysfonctionnel.

1.2.2.3 Inflammation. La réponse inflammatoire est connue comme un élément du mécanisme de défense du système en réponse à l'attaque d'organismes étrangers, potentiellement dangereux. Cependant, il a été montré expérimentalement qu'une réaction inflammatoire locale pouvait survenir en réponse à un stress hémodynamique, par l'induction d'une augmentation de cytokines telles que TNF- α ³⁰. La sécrétion de TNF- α pourrait être induite afin de protéger le cœur contre différents stress, en activant par exemple des enzymes qui détruisent les radicaux libres. Les cytokines exprimées dans les cœurs ischémiques ou hypoxiques inhibent le dommage en augmentant l'expression des protéines HSP (heat shock proteins), qui empêchent la dénaturation et stabilisent les cellules soumises à un stress. Les derniers stades d'insuffisance cardiaque sont aussi associés à une réaction inflammatoire systémique, causée par une importante élévation des cytokines telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β) ³⁰, l'interleukine-8 ainsi que l'interleukine-10 ^{73.74}. La synthèse de IL-1 β induirait la relâche dans le myocarde de facteurs chimiotactiques responsables du recrutement des monocytes ³⁰, alors que les interleukines 8 et 10 induiraient l'activation des neutrophiles et des lymphocytes T et faciliteraient leur infiltration dans le myocarde.

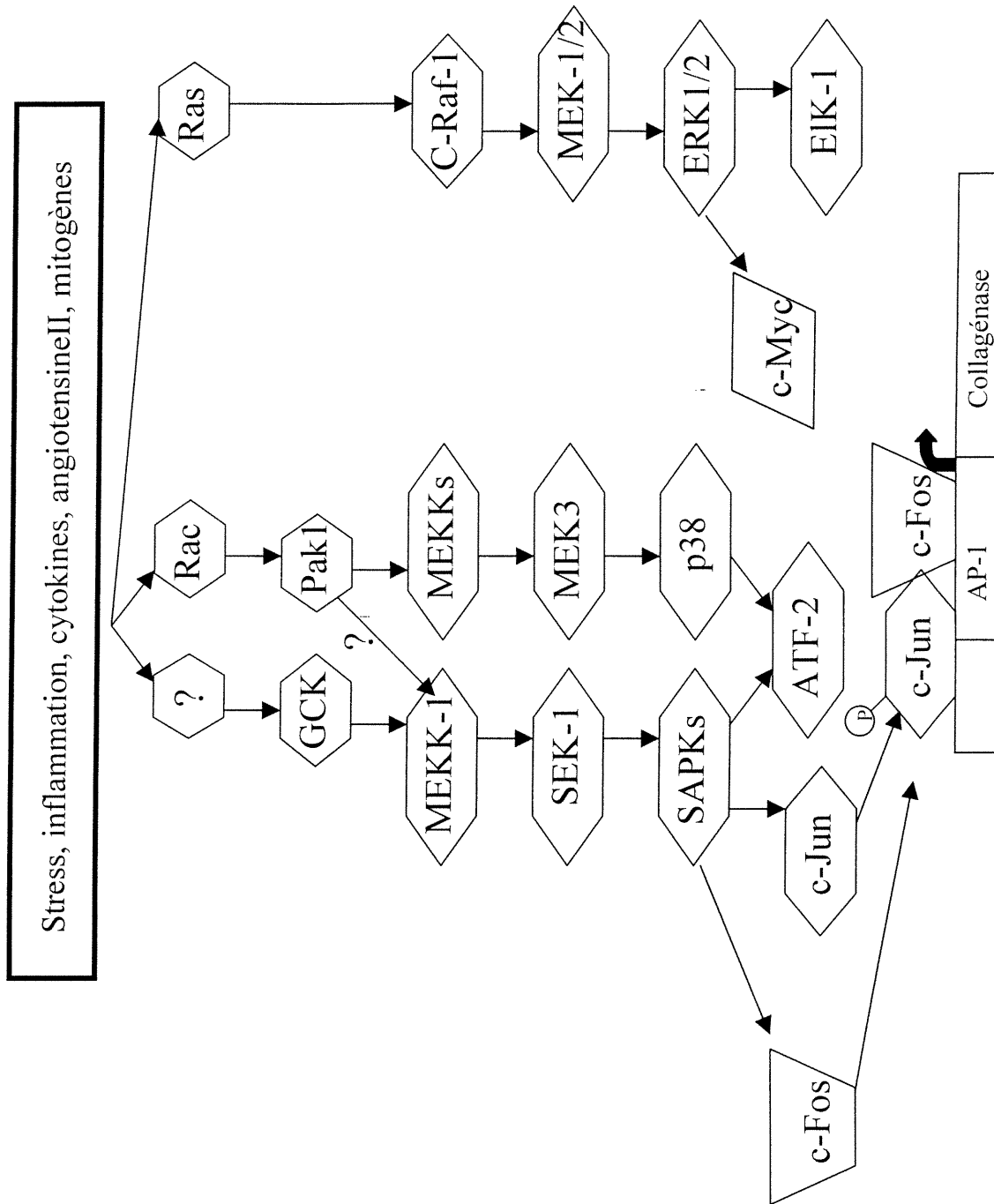
1.2.2.4 Implication du système rénine-angiotensine. Comme mentionné plus tôt, les changements hémodynamiques induits par le développement de l'insuffisance cardiaque mènent à l'activation de différents systèmes tels que le système rénine-angiotensine ³⁰. L'angiotensine II joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine et ce en agissant à la fois sur le volume sanguin et sur le diamètre des vaisseaux ³². Les tissus cibles de l'angiotensine II sont nombreux et incluent les reins, les glandes surrénales, l'hypophyse, les cellules musculaires lisses, le système nerveux sympathique et le cœur. Le système inclue deux enzymes principales : la rénine (une enzyme synthétisée par les reins) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou ECA (présente dans différents organes mais principalement dans le cœur). Lorsque la rénine est relâchée dans la circulation sanguine, elle clive la pré-pro-hormone angiotensinogène pour former la pro-hormone angiotensine I, un décapeptide. Alors, le décapeptide est à son tour clivé par l'ECA en un octapeptide qui est l'hormone sous sa forme active, l'angiotensine II. L'angiotensine II possède 4 types de récepteurs : AT1, AT2, AT3 et AT4. Le récepteur AT1 est le récepteur principalement responsable des effets physiologiques connus au niveau cardiovasculaire, rénal, neuronal, endocrine, hépatique, etc.³² Le récepteur AT1 fait parti de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G. Sa signalisation se fait principalement par la protéine G insensible à la toxine pertussique et par l'activation de la phospholipase C, mais aussi d'autres enzymes telles que la phospholipase D, la phospholipase A2, l'adénylate cyclase et différents canaux ioniques (ex. : canaux calciques type L et type T). Le récepteur

AT2 possède un rôle encore mal défini, bien qu'il ait été décrit comme ayant des effets hypotenseurs et qu'il inhibe la croissance et induise la différenciation cellulaire. De plus, AT2 entraînerait l'ouverture de canaux potassiques temps-dépendants au niveau hypothalamique et la fermeture de canaux calciques de type T. La voie de signalisation de AT2 est aussi mal définie. Il a été montré que AT2 n'affectait pas le calcium cytosolique ou l'AMP cyclique, qui sont des indicateurs de l'activation de la phospholipase $C\beta$ via G_q et de l'adénylate cyclase via G_s et G_i , respectivement. Les protéines $G_{i\alpha 2}$ et $G_{i\alpha 3}$ seraient les médiatrices de AT2. Hormis son rôle dans la régulation hémodynamique, il a été suggéré que l'angiotensine II était impliquée dans différents mécanismes tels que l'hypertrophie, la croissance des fibroblastes, la fibrose et l'apoptose³². Quant aux récepteurs AT3 et AT4, leurs structures, leurs rôles physiologiques ainsi que leurs propriétés pharmacologiques demeurent mal définis³².

Parmi les voies de signalisation de l'angiotensine II, il existe une voie qui a fait l'objet de diverses recherches, la voie des MAPKs. Les MAPKs, ou « mitogen-activated protein kinases », sont une grande famille de sérine/thréonine kinases dont l'activation est induite suite à une stimulation extracellulaire telle que l'inflammation, l'ischémie, la présence d'endotoxine ou un stress génotoxique³³. Lorsque activées, ces protéines kinases phosphorylent différents substrats, dont des facteurs de transcription qui contrôlent l'induction de différents gènes. Parmi la grande famille des MAPKs se trouvent trois différents membres importants : ERK1/2, SAPK et p38. La kinase SAPK (stress-activated protein kinase) est aussi appelée p54, ce qui correspond à son poids

moléculaire de 54 kDa, ou JNK (c-Jun N-terminal kinase) d'après le nom d'un de ses substrats, c-Jun. Les kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase) sont aussi appelées p44/p42, qui correspond à leur poids moléculaire (44kDa et 42 kDa) respectif. Les MAPKs sont activées principalement par des facteurs de croissance et d'autres agents mutagènes. Ces kinases sont activées dans la dernière partie d'une cascade d'activation enzymatique (figure 6). Elles sont activées par d'autres kinases appelées MEK ou MAPK kinases. Ces dernières sont elles-même activées par des MAPK kinase kinase ou MEKK. Les MEKK sont activées par différentes enzymes. La protéine GCK par exemple, active spécifiquement la MEKK de la cascade d'activation de JNK alors que la protéine Rak-1 peut activer à la fois la cascade d'activation de p38 et de JNK ⁷². En amont de ces cascades se trouvent deux membres de la famille de Rho, Rac et Cdc42Hs. Lorsque Rac et Cdc42Hs se lient à GTP, ils vont ensuite former un complexe avec Rak-1 et déclenchent la cascade d'activation enzymatique. Alors, Rak-1 s'autophosphoryle, s'active et va activer une MEKK ^{75,76}. Certains stimuli activent à la fois JNK et p38 alors que d'autres stimuli activent spécifiquement p38 ou JNK. JNK possède différents substrats, tels que c-Jun, ATF-2 et EIK-1 ⁷². Ces différents facteurs de transcription peuvent mener à une variété d'effets. La protéine c-Jun, un membre de la famille des « basic leucine zipper », agit généralement par une hétérodimérisation avec c-Fos ou ATF-2 (un membre de la famille des CREBs). Suite à la dimérisation, le complexe formé agit au niveau de promoteurs de différents gènes, tels que celui encodant pour la collagénase. La kinase p38 phosphoryle et active la MAPKAP kinase-2, une kinase qui agit entre autre sur les HSP25 et 27. Il a été démontré que les MAPKs étaient impliquées dans

Figure 6.



différentes pathologies cardiovasculaires. Par exemple, Pombo *et al*⁶⁵ ont démontré que le stress important entraîné par une reperfusion suivant une ischémie constituait un facteur pouvant induire l'activation de JNK et à un niveau moins élevé, l'activation de ERK1/2. Dans l'inflammation, il a été montré récemment que l'inhibition de p38 par des CSAIDs bloquait la traduction d'ARNm encodant pour différentes cytokines dont TNF- α ⁶⁶. On a aussi montré que la kinase SAPK était activée dans différentes situations telles que lors de stress physique, lors de changements d'osmolarité ou lors de stress d'étirement⁶⁷⁻⁶⁹. Certains récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés principalement aux protéines G α_{12} , G α_{13} et Gq peuvent aussi activer les MAPKs³². Ainsi, l'angiotensine II, via son récepteur AT1, peut entraîner l'activation de MAPK par une voie calcium-dépendante, mais phospho-kinase C indépendante. Chez l'humain, une augmentation de ERK1/2 a été observée chez des patients souffrant de fibrillation auriculaire¹⁷.

1.2.2.5 La fibrose. Le développement de l'insuffisance cardiaque induit un remodelage cellulaire et un changement architectural des cellules et des chambres qui comprennent plusieurs composantes autres que l'hypertrophie³⁰. La fibrose du myocarde est un processus de synthèse de matrice interstitielle, mais aussi une modification de son contenu. Le changement du collagène III au collagène I par exemple, augmente la rigidité et diminue la compliance des ventricules en phase avancée d'insuffisance cardiaque. Plusieurs facteurs peuvent induire la fibrose interstitielle, dont la présence de facteurs de croissance, l'angiotensine II, la présence de cellules inflammatoires (qui stimulent les fibroblastes) et la nécrose (qui induit une réaction inflammatoire et

une vive réaction fibrotique). Le rôle de la fibrose demeure obscur, puisqu'elle est pathogénique et contribue au remodelage maladaptif. Néanmoins, dans le cas de présence de nécrose, il a été suggéré que la fibrose pourrait agir comme tissu de remplacement.

1.2.2.6 La mort cellulaire. Une autre composante du remodelage induit par l'insuffisance cardiaque est la mort de cardiomyocytes³⁰. La mort cellulaire par nécrose, qualifiée de mort accidentelle, peut être induite par divers événements. Par exemple, l'inflammation induite par l'élévation des cytokines entraîne une relâche importante d'oxyde nitrique et de radicaux libres qui peuvent créer des dommages importants aux membranes cellulaires et induire la nécrose. La surcharge de travail infligée au cœur entraîne une carence en énergie et peut aussi entraîner une accumulation de calcium due au mauvais fonctionnement des pompes et des canaux ioniques, deux phénomènes qui peuvent causer la mort des cellules. En plus de la mort par nécrose, il a été récemment démontré que la mort par apoptose pouvait être impliquée dans différentes pathologies cardiaques. L'apoptose est décrite plus en détails dans la section suivante.

1.2.3 Modèles expérimentaux

L'insuffisance cardiaque fait l'objet de nombreuses recherches. À cette fin, différents modèles expérimentaux ont été développés³⁴. L'insuffisance cardiaque peut survenir subséquentement à un infarctus du myocarde³⁴. Ainsi, une des approches utilisée consiste à effectuer la ligature d'une artère coronaire principale, fréquemment la descendante antérieure gauche ou la circonflexe, qui entraînera une ischémie

ventriculaire importante et à plus long terme, le développement d'une insuffisance cardiaque . En plus de la ligature, d'autres méthodes peuvent être employées pour induire un infarctus du myocarde, dont l'embolisation coronarienne avec un cathéter et la microembolisation par injection de microsphères ³⁴. L'insuffisance cardiaque peut aussi être induite par une surcharge de pression, en effectuant une constriction de l'artère pulmonaire ou de l'aorte d'un animal, en induisant une sténose de la valve pulmonaire ou aortique ou en induisant une hypertension par constriction des artères rénales. Il est aussi possible de provoquer une surcharge volumique, par exemple en induisant une insuffisance de la valve aortique ou un défaut du septum interventriculaire. Une autre approche utilisée est l'entraînement électrique rapide des ventricules à l'aide d'un pacemaker implanté. Chez le chien par exemple, la tachycardie induite par un entraînement de cinq semaines à un rythme de 200 à 240 battements par minutes entraînera une surcharge de travail et induira un développement progressif d'une insuffisance cardiaque congestive ²³. L'administration de drogues telles que l'adriamycine et la streptozocine, l'induction d'une déficience en vitamine E ou d'une cardiomyopathie virale sont d'autres approches utilisées pour entraîner le développement d'une cardiomyopathie ³⁴. Finalement, un large spectre de souris transgéniques touchant une variété de gènes reliés soit au système contractile, aux neurohormones ou à différentes molécules de signalisation cellulaire ont été développées pour étudier le phénomène complexe de développement de l'insuffisance cardiaque.

1.3 L'apoptose

1.3.1 Définition

L'apoptose est un mécanisme intrinsèque de régulation de la mort cellulaire présent chez tous les organismes multicellulaires, qui fut originellement étudié chez le nématode *Caenorhabditis elegans*³⁵. Le terme "apoptose" est d'origine grecque et dérive des mots *apo* (ailleurs) et *ptosis* (chute), qui réfère à la chute des feuilles à l'automne ou à la chute des pétales de fleurs. Ceci faisait alors allusion aux observations morphologiques qui décrivaient l'apoptose comme un événement cellulaire unique, par opposition à la nécrose qui survient sur un groupe de cellules³⁰. Aujourd'hui, un grand nombre de points distinguent l'apoptose de la nécrose. L'apoptose est caractérisée par une condensation des cellules et de leur chromatine, la formation de corps apoptotiques et leur phagocytose par les cellules environnantes. Quant à la nécrose, elle entraîne généralement une perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique, une dégradation désorganisée des éléments cellulaires et entraîne une réaction inflammatoire³⁰.

1.3.2 Mécanisme

Au cours du développement et du maintien de l'homéostasie des organismes multicellulaires, la prolifération tout comme la mort cellulaire se sont révélés être deux processus essentiels. Le nématode *C. elegans* s'est avéré un organisme de choix pour effectuer l'étude du processus de mort cellulaire par apoptose³⁵. En effet, chez cette espèce, la mort individuelle des cellules peut être observée facilement dans l'animal vivant, qui est transparent. Ainsi, l'utilisation de techniques

avancées d'analyse moléculaire et génétique permet l'étude de gènes impliqués dans les différents aspects de la mort cellulaire par apoptose. L'observation de l'animal vivant a permis de déterminer que 1090 cellules somatiques se formaient au cours de son développement et de sa vie adulte, alors que 131 de ces cellules subissaient le processus de mort cellulaire programmé à un moment précis de la vie du vers. Lorsqu'une cellule entreprend ce mécanisme, sa chromatine se condense, son cytoplasme se contracte, la membrane nucléaire se désagrège et la cellule forme des vacuoles qui sont phagocytées par les cellules environnantes. Deux gènes principaux ont été identifiés comme étant nécessaires au déroulement du processus apoptotique : *ced-3* et *ced-4*. Ces gènes codant pour des protéines cytotoxiques ou qui entraînent une activité cytotoxique sont régulés par le gène *ced-9*. Chez *C. elegans*, il a été suggéré que plusieurs cellules aient été prédéterminées génétiquement à mourir à un moment précis. Par exemple, les gènes *ces-1* et *ces-2* régulent la mort de neurones spécifiques du pharynx tandis que leur mutation prévient la mort de ces cellules. La phagocytose des corps apoptotiques est elle aussi régulée par différents gènes, puisque la mutation de *ced-2*, *ced-5* ou *ced-10* additionnée à la mutation de *ced-1*, *ced-6*, *ced-7* ou *ced-8* prévient cette phagocytose. Finalement, différents gènes tels que *nuc-1* contrôlent la dégradation par des endonucléases des corps apoptotiques ³⁵.

Au niveau des mammifères, le processus de l'apoptose a été subdivisé en trois phases : la phase d'initiation, la phase d'exécution et la phase de dégradation. La phase d'initiation dépend des stimuli. Il existe de nombreux ligands des « death receptors », tels que $TNF\alpha$, $LT\alpha$, FasL,

Apo3 et TRAIL. Les ligands se lient à leur récepteur qui vont alors former des homotrimères. L'agrégation de récepteurs permet alors l'association des domaines appelés « cystolic death domain », qui contiennent des molécules adaptatrices. Ces complexes formés sont des « death inducing signaling complexes » ou DISCs. Cinq types de protéines interagissent dans la formation de DISCs : les DDs (death domains), FADD et TRADD (des protéines adaptatrices), DED (death effector domains) et CARD (caspase recruitment domain). Le principal effet de l'association de FADD au « death receptor » est la liaison au large prodomaine des caspases initiatrices FLICE et procaspase-8. Cette association entraînera l'activation des caspases initiatrices par le clivage de leur prodomaine, qui par leur action protéolytique entraîneront à leur tour l'activation d'autres caspases. La trimérisation des « death receptor » et la formation du DISC peuvent être activées sans la liaison de ligands sur les récepteurs, par d'autres stimuli tels que l'irradiation. D'autres types de stimuli peuvent induire l'apoptose sans activer la voie des « death receptors ». Un déséquilibre de l'homéostasie calcique, la privation de facteurs de croissances, la présence de radicaux oxygénés, l'altération de l'ADN par irradiation ou l'activation de l'enzyme P53 en sont quelques exemples ³⁶.

La phase d'exécution est régulée principalement par des homologues de la protéine CED-9 (*Caenorhabditis elegans* death protein-9), les protéines de la famille de Bcl-2 ³⁷. Cette famille comporte des protéines pro-apoptotique (Bcl-Xs, Bak, Bax, Bad, Bid, etc.) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1, etc.). Les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L sont normalement localisées dans la membrane

externe des mitochondries. Leur localisation permet d'inhiber le processus de l'apoptose. À l'état normal, les protéines telles que Bax et Bak se trouvent dans le cytosol. Suite à un stimulus apoptotique, Bax transfère au niveau des mitochondries pour s'insérer dans la membrane externe mitochondriale et influence alors le mécanisme mitochondrial impliqué dans l'apoptose. D'autres protéines telles que Bid et Bad exercent leur effet pro-apoptotique par une autre voie. Suite à l'activation des « death receptor », Bid est clivé par la caspase-8 et transfère alors à la mitochondrie pour induire l'apoptose. Quant à Bad, il est phosphorylé et séquestré par la protéine 14-3-3 en condition normale. Lorsque les niveaux de facteurs de croissance chutent, Bad est déphosphorylé, relâché par la protéine 14-3-3 et il transfère du cytosol à la membrane mitochondriale pour se lier à Bcl-2 et induire l'apoptose³⁷.

Au niveau de la membrane mitochondriale se trouvent des pores qui contrôlent la perméabilité des mitochondries par leur ouverture ou leur fermeture et par leur changement de conductance. Ces pores, appelés PT-pore (permeability transition-pore), permettent de réguler le pH des mitochondries et participent à la régulation de l'homéostasie du Ca^{++} . Lorsque le pH des mitochondries est bas, les pores sont à l'état fermé, alors que l'élévation du pH entraîne l'ouverture des pores et la sortie de Ca^{++} et de K^+ . En condition normale, les PT-pores ont une faible conductance et ne permettent la sortie que de petits ions tels que K^+ et Ca^{++} . Il y a alors formation d'un potentiel membranaire et présence de fortes charges négatives dans les mitochondries, permettant la formation d'un important gradient de protons qui est essentiel à la synthèse d'ATP³⁷.

Un stimulus apoptotique entraînera l'ouverture des pores mitochondriaux, l'augmentation de leur conductance et la relâche de dATP et de protéines qui mènent à l'apoptose : AIF (apoptosis inducing factor) et cytochrome-c. Le cytochrome-c est une protéine présente dans l'espace intermembranaire des mitochondries et participe à la synthèse d'ATP. Lorsqu'il est libéré, le cytochrome-c se lie à dATP, AIF et un homologue de CED-4, APAF-1 (apoptosis protease activating factor-1). Le complexe alors formé, appelé apoptosome, induit l'activation de la caspase-9. Cette dernière peut à son tour cliver la procaspase-3 en sa forme active, la caspase-3, entraînant l'activation de la cascade des caspases et le clivage de différents substrats. Les protéines Bcl-2 et Bcl-XL inhibent l'apoptose en bloquant l'ouverture de PT-pore et la relâche de facteurs d'induction de l'apoptose. Les protéines pro-apoptotiques telles que Bax lient Bcl-2 et le PT-pore et induisent l'ouverture des pores, un changement de potentiel membranaire et la relâche de AIF, dATP et cytochrome-c³⁷.

Les caspases, des homologues de CED-3, sont les principaux effecteurs de la phase d'exécution. Jusqu'à maintenant, 14 caspases ont été identifiées et numérotées de 1 à 14, dans l'ordre de leur découverte et non dans l'ordre de leur implication chronologique dans la cascade de l'apoptose. En condition normale, les caspases sont présentes sous la forme de précurseurs inactifs. Leur pro-domaine situé en N-terminal varie fortement d'une caspase à l'autre et est un déterminant pour leur localisation cellulaire et leur activation. La pro-forme des caspases contient un motif de reconnaissance et un site de clivage qui leur permet

de s'activer par un processus auto-catalytique ou par d'autres caspases. Leur nom, caspase, provient de leur fonction : cystéine-containing aspartic acid protéase et signifie que leur action catalytique est fait entre un résidu cystéine et un résidu acide aspartique ³⁸.

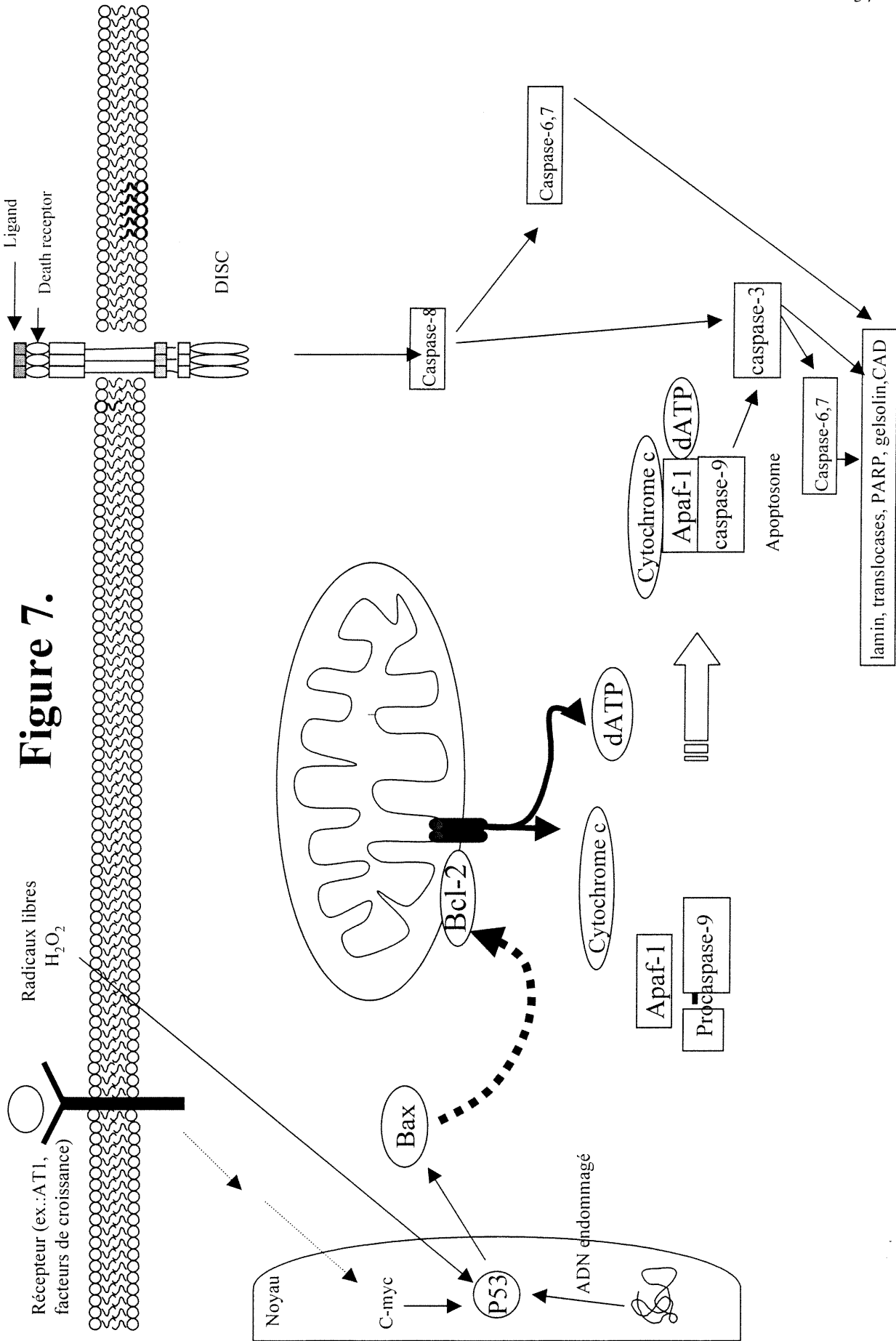
La cascade d'activation des caspases est encore mal définie et dépend du stimulus apoptotique. Lorsqu'un stimulus entraîne une réponse des mitochondries, la cascade des caspases implique l'activation par l'apoptosome de la caspase-9, qui active à son tour la caspase-3, qui à son tour active les caspases-6 et -7. Par contre, lorsqu'un stimulus apoptotique entraîne la formation de DISCs, la caspase-8 est généralement impliquée, mais l'activation mitochondriale n'est pas toujours impliquée. La caspase-8 peut alors activer les caspases-3,-4, -7 et/ou -9 pour induire le processus de l'apoptose ³⁸.

L'activité des caspases dans le programme de l'apoptose peut résulter en 1) la destruction ou l'inactivation de substrats (ex. : lamin, translocases), 2) l'activation de substrats (ex. : gelsolin, CAD) ou 3) l'inactivation d'inhibiteurs de l'apoptose (ex. : Bcl-2, PARP) : 1) Le clivage de la lamin par exemple, facilitera le désassemblage de l'enveloppe nucléaire et la désintégration du noyau. L'inactivation de ICE-like protéases telles que les translocases, dont le rôle est le maintien de l'asymétrie membranaire, entraîne l'externalisation des phosphatidylsérines, qui agissent comme marqueurs pour la phagocytose de ces cellules. 2) Le clivage de la gelsolin résultera en la formation d'une protéine active qui entraînera la dépolymérisation de l'actine et la formation de corps apoptotiques. À l'état normal, la protéine CAD

(caspase-activated DNase), ou DFF chez l'homme, est séquestrée dans le cytosol sous sa forme inactive, liée à un inhibiteur de CAD nommé ICAD. L'activation de la caspase-3 divise le complexe CAD/ICAD et permet alors à la DNase de pénétrer dans le noyau et de dégrader l'ADN. 3) Le clivage de Bcl-2 transformera un inhibiteur en un promoteur de l'apoptose, Bcl-2 Δ N. Finalement, l'enzyme poly(ADP-ribose) polymérase appelée PARP, dont le rôle est la réparation de l'ADN, est inhibée par la caspase-3 lors du processus de l'apoptose. Suite à l'activation des caspases, à l'activation de certaines enzymes et en l'inactivation d'autres, la cellule est fragmentée et forme des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules environnantes ³⁸ (Figure 7).

1.3.3 Implication dans les pathologies cardiovasculaires

Ce n'est que récemment qu'on a démontré que l'apoptose était impliquée dans les pathologies cardiaques. Anversa *et al* ³⁹ et Itoh *et al* ⁴⁰ ont observé l'implication du processus de l'apoptose lors d'infarctus du myocarde et d'ischémie-reperfusion chez l'humain. Yue *et al* ⁴¹ ont observé la présence d'apoptose chez les lapins et Li *et al* ⁴² chez le rat, lorsqu'ils étaient soumis à des épisodes d'ischémie-reperfusion. Une autre pathologie où la présence d'apoptose a été mesurée est l'insuffisance cardiaque. Dans cette pathologie, de nombreux systèmes, dont le système immunitaire, sont affectés. L'augmentation de cytokines telles que TNF- α , Fas et IL-6 peut induire l'apoptose de cardiomyocytes. D'autres changements tels que l'augmentation du niveau de



neurohormones pourraient entraîner la mort de cardiomyocytes. Des changements de Bax/Bcl-2 ainsi que de l'activité de la caspase-3 ont été observés par Latif *et al*⁴³ au niveau ventriculaire, chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque. La présence de cellules apoptotiques a aussi été observée chez des patients souffrant de myocardite et de dysplasie congénitale arythmogénique⁴⁴.

Un certain nombre de stress présents dans les pathologies cardiaques et pouvant entraîner l'apoptose ont été décrits⁴⁵ : 1) le stress oxydatif et la présence de radicaux oxygénés, qu'on rencontre lors d'ischémie ; 2) La présence d'un taux élevé de cytokines, tel que dans la phase avancée d'insuffisance cardiaque; 3) L'oxyde nitrique (NO), aussi très élevé en insuffisance cardiaque; 4) Différentes neurohormones telles que l'angiotensine II; 5) Le stress mécanique lié à la surcharge de volume, décrite dans la cardiomyopathie dilatée. L'importance de la mort cellulaire dans les pathologies cardiaques et les effets relatifs à la perte de myocytes résultante sont mal définis. On a suggéré que la perte de cardiomyocytes pouvait entraîner une réduction de la masse musculaire, réduisant la puissance de la pompe cardiaque. Adams *et al*⁴⁶ ont observé le développement d'une insuffisance cardiaque fulminante suite à la mort d'un grand nombre de cardiomyocytes, chez des souris transgéniques surexprimant la protéine Gαq. Les nombreuses études effectuées sur l'apoptose dans les pathologies cardiaques ouvrent la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Une grande variété de cibles pourraient être envisagées. Que ce soit par la modulation de régulateurs de l'apoptose, tels que les membres de la famille de Bcl-2, par l'inhibition des effecteurs de l'apoptose (les caspases) ou même la

prévention de l'induction du processus apoptotique à l'aide d'antagonistes des récepteurs de la mort cellulaire, les cibles ne manquent pas. L'apoptose semble une cible d'avenir pour la prévention et le traitement des pathologies cardiaques. Cependant, il demeure impensable d'utiliser directement des inhibiteurs apoptotiques comme traitement chez l'humain, puisque l'apoptose en soi possède de nombreux rôles physiologiques essentiels. Il importe par conséquent de déterminer les mécanismes qui entraînent l'apoptose lors de pathologies afin de prévenir l'avènement de processus apoptotiques néfastes par des traitements qui agiraient sur ces mécanismes.

2. Questions soulevées et hypothèse de travail

L'insuffisance cardiaque constitue avec les valvulopathies, les maladies coronarienne et les cardiomyopathies hypertrophiques l'une des plus grandes causes de fibrillation auriculaire ⁴. Il a été précédemment démontré dans des modèles expérimentaux que l'insuffisance cardiaque entraînait un remodelage structurel ²³ alors qu'un traitement pharmacologique permettant de réduire ce remodelage réduisait l'incidence des FAs. Cependant, bien que l'étude de Li *et al* ²⁴ suggère l'implication de l'angiotensine II et de MAP kinases dans le processus de remodelage, les mécanismes par lesquels l'insuffisance cardiaque entraîne le développement de fibrose sont encore mal définis. De plus, les mécanismes par lesquels l'insuffisance cardiaque entraînent la fibrillation auriculaire n'ont pas été définis jusqu'à présent. La présence d'apoptose a été précédemment mesurée chez les patients souffrant de FA, mais n'a

pas été démontrée jusqu'à maintenant dans les modèles animaux. Les différentes observations décrites dans la littérature nous ont amené à nous poser les questions suivantes : 1) Est-ce que la mort cellulaire est impliquée dans l'induction de FAs reliées à l'insuffisance cardiaque ? 2) Comment sont affectées les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques dans la FA ? 3) Qu'arrive-t-il aux protéines effectrices telles que la caspase-3 ? 4) Quelle relation existe-t-il entre les différents événements, incluant les changements biochimiques et histologiques, de même qu'entre la fibrose et l'incidence des FA ? 5) Qu'est-ce que l'étude temporelle peut nous apporter quant à la compréhension des mécanismes de signalisation et d'induction de fibrillation auriculaire ? Le travail décrit dans cet ouvrage visait à répondre à l'ensemble de ces questions.

Notre hypothèse de travail était que le remodelage structurel auriculaire arythmogène provoqué par la défaillance cardiaque est dû à une série d'évènements qui impliquent le système rénine-angiotensine, les MAP kinases et la mort cellulaire par apoptose. Afin d'aborder cette hypothèse, nous avons effectué une étude temporelle des changements structuraux auriculaires survenant au cours du développement de l'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire. Chez 7 groupes de 12 chiens soumis à des périodes de 0, 6, 12 et 24 heures et 1, 2 et 5 semaines d'entraînement électrique rapide, nous avons mesuré quelle était l'incidence des fibrillations auriculaires. Pour chacun de ces groupes, nous avons mesuré les niveaux d'angiotensine II tissulaire par ELISA et les niveaux d'angiotensine II plasmatique par RIA (radioimmunoassay). L'expression des formes phosphorylées (actives) des MAP kinases P38, JNK et ERK1/2 a été évaluée par Western Blot.

Relativement à l'apoptose, nous avons mesuré les niveaux d'expression de protéines régulatrices de l'apoptose, Bax et Bcl-2, par Western Blot. Nous avons aussi mesuré l'activité de la caspase-3 par un essai enzymatique, ainsi que la présence d'ADN fragmenté par DNA laddering et par TUNEL. Des coupes histologiques ont été utilisées pour quantifier la fibrose (coloration trichrome de Masson), la présence de cellules inflammatoires (coloration HPS) et la mort cellulaire totale survenue (coloration HPS), incluant les cellules nécrotiques et apoptotiques. Finalement, l'hypertrophie a été quantifiée par la mesure du diamètre et de la longueur de cellules marquées par un anticorps anti-cadhérine, qui permettait de distinguer clairement les disques intercalaires. L'article qui suit décrit l'ensemble des résultats obtenus et sera soumis sous peu à la revue *Circulation*.

**Atrial apoptosis and evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental
ventricular-tachypacing induced heart failure**

Sophie Cardin, Danshi Li, Nathalie Thorin-Trescases, Tack-Ki Leung, Eric Thorin,
Stanley Nattel.

From Montreal Heart Institute Research Center and Department of Medicine, University
of Montreal.

Word count: 4159

Address correspondence to: Stanley Nattel, 5000 Belanger St. E., Montreal, Quebec,
Canada H1T 1C8.

Tel: 514-376-3330. Fax: 514-376-1355. e-mail: nattel@icm.umontreal.ca

Background- There is evidence for atrial apoptosis in patients with atrial fibrillation (AF), but the occurrence and time-course of apoptosis in experimental AF models have not been demonstrated. This study evaluated apoptosis and related phenomena in an experimental model of congestive heart failure (CHF)-related AF.

Methods and Results- Dogs were subjected to ventricular tachypacing (VTP) for varying periods up to 5 weeks. Significant apoptosis (DNA fragmentation, TUNEL) developed 24 hours after VTP onset and persisted for 1 week. Apoptosis was preceded by significant increases in tissue (but not plasma) angiotensin-II concentration and activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) p38, JNK and ERK, which began 6 hours after VTP onset, and a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio at 12 hours. Substantial increases in cell death, leukocyte infiltration and caspase-3 activity were noted at the time of peak apoptosis. Apoptosis was followed by cell hypertrophy, which reached maximum after 1 week of VTP, and by interstitial fibrosis, which peaked at 5 weeks and correlated with AF duration.

Conclusions- VTP causes substantial but transient atrial apoptosis, which is preceded by tissue angiotensin-II accumulation and mitogen-activated protein kinase stimulation and is followed by progressive structural remodeling. Apoptosis may play a central role in CHF-induced arrhythmogenic atrial structural remodeling and may be an interesting new target for therapies designed to prevent the development of the AF substrate.

Condensed Abstract

Apoptosis has been reported in atrial tissue samples from AF patients, but its role is poorly defined. We found that substantial but transient atrial apoptosis occurred in the course of ventricular-tachypacing induced CHF in dogs. Apoptosis was preceded by atrial angiotensin-II accumulation, activation of MAP-kinases and increase in the relative quantity of the pro-apoptotic protein Bax. Fibrosis followed apoptosis, suggesting that it may have been a consequence, and correlated with AF promotion. These results are consistent with a central role for apoptotic cell death in arrhythmogenic atrial structural remodeling.

Introduction

Apoptosis (programmed cell death) plays a crucial role in the normal development and embryogenesis of multicellular organisms.^{1,2} In terminally-differentiated cells like cardiomyocytes, the maintenance of functional integrity requires a very low cell death rate. Apoptosis causes cell loss in CHF and may be a significant determinant of the prognosis.³⁻⁴ Ongoing apoptosis occurs in atrial tissues of AF patients, along with decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and increased expression of the pro-apoptotic protein caspase-3.⁵

Although apoptosis is a natural candidate to underlie AF-promoting pathology,⁶ atria from goats kept in AF for 19-23 weeks show no evidence of apoptosis.⁷ VTP-induced CHF produces interstitial fibrosis in dogs comparable to atrial pathology in clinical AF, and strongly promotes AF maintenance.^{8,9} We speculated that apoptosis may play a role in the structural remodeling leading to the AF substrate in experimental CHF. There are no data in the literature regarding the time-course of atrial apoptosis and related changes in experimental CHF. We therefore designed the present study to evaluate time-dependent atrial changes during the development of VTP-induced CHF for: 1) tissue apoptosis; 2) tissue and plasma angiotensin-II concentration; 3) expression of the apoptotic determinants Bax, Bcl-2 and caspase-3; 4) total and phosphorylated (activated) MAPK expression; 5) tissue histopathology; and 6) the AF substrate as estimated by the duration of AF induced by atrial burst pacing.

Materials and methods

General

Seven groups of mongrel dogs (N=12/group) weighing 24-37 kg were subjected to VTP for: 0 hours (controls), 6, 12 and 24 hours, 1, 2 and 5 weeks. Under sterile technique, a unipolar tined pacing lead (Medtronic) was inserted into the right ventricular apex via the jugular vein in halothane (1,5%)-anesthetized dogs. A pacemaker implanted in the neck was programmed to capture the ventricles at 240 bpm beginning the day after the surgical procedure, with the rate decreased to 220 bpm after 3 weeks to limit mortality. CHF was confirmed by clinical signs (lethargy, oedema, dyspnea, loss of appetite). On the study day, an ECG was recorded to confirm continued ventricular capture and the pacemaker was deactivated. Dogs were then anaesthetized (morphine, 2 mg/kg s.c.; α -chloralose, 120 mg/kg i.v. load, 29.25 mg/kg/h) and ventilated. Femoral veins and arteries were cannulated and body temperature was maintained at 37°C with a heating pad. A median sternotomy was performed and Teflon-coated stainless-steel electrodes were hooked into both left and right atrial appendages for AF induction. AF was induced with 4-times threshold-intensity burst pacing (10 Hz, 5-10 seconds) to measure mean AF duration (DAF) in each dog. For DAF<5 minutes, 15 measurements were performed; for DAF 5-10 minutes, 10 measurements were performed; for DAF 10-20 minutes, 5 measurements; and for DAF>20 minutes, 3 measurements.

Dogs were sacrificed by α -chloralose overdose and hearts removed for subsequent analysis. For terminal-dUTP nick-end labelling (TUNEL) and histopathological studies, hearts were excised, rinsed with Tyrode's solution and immersed into 10%-neutral-buffered formalin. Tissues were later embedded in paraffin

for histopathological sectioning and staining. For other measurements, hearts were rapidly frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C .

Apoptosis measurements

DNA laddering

DNA was extracted from pulverized tissues, submitted to proteinase-K and RNase-A degradation followed by 3 passing cycles into a chloroform:isoamyl (24:1)/phenol solution and by 2 washing cycles with ethanol (70%). DNA was marked with [^{32}P]-dCTP via recombinant terminal deoxynucleotidyltransferase (rTdt) and then subjected to electrophoresis on a 1,5%-agarose gel. The gel content was transferred to a Hybond-N⁺ membrane with a Vacugene apparatus, radioactivity detected and imaged with a PhosphoImager.

TUNEL

Paraffin-embedded sections were deparaffinized, rehydrated, saponified and marked with Biotin-dUTP via rTdt. Slides were then incubated sequentially with 1:50 ExtrAvidin–fluorescein isothiocyanate (FITC), 1:40 α -sarcomeric actin antibody, 1:100 FITC-coupled anti-mouse IgG and propidium-iodide. Each step was separated by 3 3-minute washes in phosphate-buffered saline (PBS). Cell counting was performed with a fluorescence microscope equipped with green and red filters.

Caspase-3 activity

Proteins were extracted from pulverized tissues submitted to 3 freeze/thaw cycles into a lysis buffer (TritonX100, 1%; sucrose, 0.32-mol/L; Tris-HCl, 10-mol/L; EDTA, 5-mmol/L; DTT 2-mmol/L; PMSF 1-mmol/L; leupeptine, 10- μ g/ml; Pepstatin-A 10- μ g/ml; aprotinine, 10- μ g/ml), followed by 10 minutes of 10000-rpm centrifugation. The supernatant was kept and protein concentration quantified by Bradford method. The enzymatic reaction was performed in 390 μ l of buffer (Tris-HCl, pH 7.0, 50-mmol/L; MgCl₂, 5-mmol/L; EGTA 1-mmol/L; CHAPS, 0.1%; DTT 1-mmol/L) to which was added 0.8-mmol/L N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (Ac-DEVD-CHO), 10-mmol/L N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and 50 μ g of extracted proteins. Non-specific activity was evaluated by omission of Ac-DEVD-AMC. All reactions were performed at 37°C for 3 hours. Fluorescence was measured by spectrofluorometer at 365-nm excitation and 465-nm emission.

Histopathology and immunohistochemistry

Histopathological analyses were performed on 5 hearts from control dogs and 4 hearts from each VTP group. Samples were obtained from Bachmann's bundle, right (RA) and left atrial (LA) appendages, LA posterior and inferior walls, crista terminalis and RA free wall. Tissue blocks were collected following longitudinal and transverse planes for each region and 5- μ m sections cut at room temperature.

Microscopic images of Masson's trichrome-stained sections at 400x magnification were digitized (Scion Image Software) and analysed with Sigmascan 4.0 (Jandel).

Connective tissue was quantified as a percentage of surface area consisting, excluding blood vessels. To analyze cell death, sections were stained with hematoxylin-phloxin-safran (HPS). Dead and viable cells were counted in 5-10 transverse-section fields at 400x. HPS-stained longitudinal sections were used to quantify white-cell infiltration at high magnification (1000x). Mononuclear and polymorphonuclear cells per field were counted for 12 fields of each slide. To evaluate cellular hypertrophy, tissue sections were deparaffinized and rehydrated, followed by antigen-retrieval (20 minutes, 90°C, 0.01-mol/L citrate buffer. Non-specific antigens were blocked by incubation at 37°C in 5% non-fat milk in PBS. Slides were incubated with 1:50 anti-pan cadherin primary antibody followed by incubation with the secondary antibody (anti-mouse IgG(Fab)-TRITC, 1:200). Cell-length measurements were performed on 5 cells per animal, on longitudinal sections, with confocal microscopy.

Western blots

Protein extracts (200- μ g) were denatured and electrophoresed on 15%-SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (0.45- μ m), blocked 90 minutes with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) and incubated overnight in primary-antibody solutions. After 3 washes in 0.1% Tween 80-TBS (TTBS), membranes were reblocked in 1% non-fat dry milk in TTBS for 10 minutes, and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated primary antibodies in 5% non-fat dry milk in TTBS for 60 minutes, followed by 4 additional washes in TTBS. Antibody detection was performed with Western blot chemiluminescence reagent-

plus. Band densities were quantified by densitometry (Quantity One software). Each set of gels contained 1 control sample and samples from each VTP group.

The following primary antibodies were used for immunodetection: rabbit anti-P44/42 polyclonal IgG (phosphorylated and total ERK), rabbit anti-P38 polyclonal IgG (phosphorylated and total P38), rabbit anti-JNK polyclonal IgG (phosphorylated and total JNK), mouse anti-Bcl-2 monoclonal IgG and rabbit anti-Bax polyclonal IgG. The anti-phosphorylated MAPK antibodies only detect kinases catalytically activated by threonine or tyrosine phosphorylation.

Tissue and plasma angiotensin II

Tissue angiotensin-II concentration was measured in 500- μ g protein samples by ELISA (Peninsula Laboratories). Blood for angiotensin-II assay was obtained in EDTA-containing tubes containing 100- μ l of bestatin solution (angiotensinase inhibitor). Plasma was then removed and frozen at -70°C . Plasma angiotensin-II concentration was measured in protein extracts by radioimmunoassay (ALPCO-RIA kits), with concentrations calculated from a standard curve generated for each experiment.

Statistics

Group variance homogeneity was tested and means were compared by ANOVA. Scheffé or Mann-Whitney U tests were performed when the variance was homocedastic or heterocedastic respectively. Results are expressed as mean \pm SEM, and 2-tailed $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Evidence of apoptosis

Figure 1 (top) shows propidium iodide (for nuclei) and FITC (α -sarcomeric actin)-stained tissue sections (left), corresponding sections with TRITC-staining for TUNEL-positive nuclei (middle) and superimposed images (right). Under control conditions (I), TUNEL-positive nuclei were rare (panel I). After 24-hour VTP, TUNEL-positive nuclei (panel II) became much more common. The time-course of VTP-induced changes in TUNEL-positivity is at the bottom. The percentage of TUNEL-positive cells rose to a maximum ~8 times control values at 24 hours. The value decreased but remained greater than control at 1 week, after which values were no longer significantly different from control.

Figure 2 (top) shows DNA fragmentation detected with 4 progressively-increasing quantities of DNA per lane from hearts obtained from a control dog, and 24-hour, 1-week and 5-week VTP dogs. DNA-laddering clearly increased with VTP. A quantitative analysis is shown at the bottom. As for TUNEL analysis, no change occurred before 24-hour VTP, when a substantial increase in DNA-laddering was noted. The value decreased but remained significantly greater than control at one week, returning to values not significantly different from control subsequently. Figure 3 shows the activity of caspase-3, a cysteine protease involved in the process of apoptosis. The activity of the enzyme was by 6- and 12-hour VTP, but strongly increased at 24 hours and returned to values not significantly different from control subsequently.

Figure 4 (top) shows the expression of the apoptotic regulators Bax and Bcl-2, detected by Western blot. Bax expression increased significantly after 12 hours of VTP, and remained higher than control thereafter. Bcl-2 expression increased after 6 hours, returned towards control at 12 and 24 hours and then increased again. Since Bax promotes apoptosis and Bcl-2 prevents it, the Bax/Bcl-2 ratio (bottom) is an index of pro-apoptotic protein expression. The Bax/Bcl-2 ratio increased significantly after 12 hours, remained elevated for 1 week and then returned to control values.

Angiotensin II and MAPK expression

Atrial angiotensin-II concentrations increased significantly within 6 hours of VTP onset, reached a maximum at 24 hours and remained elevated thereafter (Figure 5A). In contrast to atrial angiotensin-II, plasma angiotensin-II concentrations failed to increase significantly until after 1 week of VTP. Figure 6 shows the expression of phosphorylated and total ERK1/2 (top), p38 (middle) and JNK (bottom). Phosphorylated-ERK1/2 increased 7-fold within 6 hours and remained elevated thereafter. Phosphorylated-p38 almost doubled within the first 6 hours and remained elevated. Phosphorylated-JNK increased after 6 hours, peaked at 24 hours and returned towards control values thereafter. Changes in expression of total ERK1/2, P38 and JNK were slight and not statistically significant in any group.

Histopathological studies

In control dogs, the number of white cells in atrial tissue was very low and consisted mainly of polymorphonuclear cells. After 24 hours of tachypacing, substantial transmural

white-cell infiltration occurred, with a significant increase in the number of both mononuclear and polymorphonuclear cells (Figure 7A), along with important epicardial and myocardial oedema. The white cell count returned to normal within 1 week. The percentage of non-viable (acidophilic) cells increased 10-fold after 24 hours of VTP, coinciding with maximal TUNEL-positivity (Figure 7B). Cell death rate returned to control values within 1 week. In control dogs, atrial cell length averaged $54 \pm 11 \mu\text{m}$, while after 1-week VTP, the length increased to $110 \pm 16 \mu\text{m}$ and remained elevated thereafter (Figure 7C). Cell diameter averaged $21 \pm 1 \mu\text{m}$ under control conditions and was not affected by VTP (e.g., mean $20 \pm 1 \mu\text{m}$ after 5 weeks).

Changes in DAF and fibrous tissue content.

DAF increased significantly after 2 weeks of VTP and continued increased further at 5-week VTP (Figure 8A). VTP increased fibrous tissue content ~3-fold after 1 week, and larger increases were seen after 2- and 5-week VTP (Figure 8B). There was a strong correlation between fibrous tissue content and DAF (Figure 8C).

Discussion

In this study, we found that transient but substantial apoptotic changes preceded arrhythmogenic atrial structural remodeling associated with experimental CHF. Cell death and apoptosis were preceded by increases in tissue angiotensin-II concentrations, activation of p38, JNK and ERK1/2 MAPKs and an increased Bax/Bcl2 ratio.

Relationship to previous findings regarding structural remodeling and AF

Atrial biopsies from AF patients demonstrated a high incidence of patchy fibrosis.¹¹ Aimé-Sampé et al reported that atrial samples from patients with chronic AF showed interstitial fibrosis, a high proportion (~29%) of TUNEL-positive cells, increased caspase-3 expression and an increased Bax/Bcl-2 ratio.⁵ Goette et al observed increased expression of tyrosine-phosphorylated forms of ERK and angiotensin-converting enzyme in atrial tissues of AF patients.¹² Everett et al observed atrial size increases, along with increased space surrounding myofibrils, disruption of sarcoplasmic reticulum, increased number and size of mitochondria in dogs with AF induced in the setting of mitral insufficiency and atrial tachycardia.¹³

In the present study, we observed a progressive series of events in the atria of dogs subjected to VTP-induced CHF. The earliest changes were increases in tissue angiotensin-II concentration and MAPK expression. These changes preceded an increase in the Bax/Bcl-2 ratio, which was followed by caspase-3 activation and apoptosis. Angiotensin-II is known to activate MAPKs, particularly JNK,¹⁴ which is known to be a strong pro-apoptotic factor.¹⁵ Evidence for apoptosis coincided temporally with cell death and evidence of inflammation (white cell infiltration and edema). Angiotensin-II stimulates both inflammatory and fibrotic processes.¹⁶ Thus, it is quite likely that angiotensin-II acts as a key initiator of a sequence of processes, including MAPK activation, induction of apoptosis and inflammation, that lead to atrial fibrosis and a substrate for AF. Interestingly, tissue angiotensin-II concentrations increased rapidly and were among the first changes noted, whereas significant increases in plasma angiotensin-II concentration were first noted after 1 week of VTP, well after the peak of apoptosis.

This finding suggests that local elaboration of angiotensin-II may play a particularly-important role in CHF-related atrial structural remodelling.

Ventricular structural remodeling

Heinke et al demonstrated apoptosis in the hearts of dogs with fully-developed VTP-induced heart failure.¹⁷ They noted a decrease in tissue Bcl-2 and no change in Bax expression, leading to an increase in the Bax/Bcl-2 ratio. Cesselli et al noted progressive increases in ventricular apoptosis, cell death and caspase-3 and -9 activation over weeks 1-4 of VTP-induced CHF in dogs.¹⁸ Our results resemble theirs in that we also noted apoptosis, cell death and caspase-3 activation in a similar model; however, the time course of changes was quite different in our study. The different time course is likely due to the fact that we studied atrial remodelling, whereas their observations were at the ventricular level.

Novel aspects and potential significance

Ours is the first study of which we are aware to observe apoptosis and to characterize its time course, as well as that of related phenomena, in a defined experimental model of AF. Our observations are relevant to the understanding of the signalling events involved in atrial structural remodeling, a process of great importance in creating the substrate for AF in man. Apoptosis is observed in atria of patients with AF.⁵ Apoptosis could be related to the causes of AF or could be a consequence of the arrhythmia. Taken together with previous findings suggesting that apoptosis is absent in goats with electrical/remodeling-

maintained AF,⁷ our results suggests that apoptosis is more likely associated with the pathophysiological mechanisms leading to the AF substrate rather than with AF per se.

Current AF therapy is far from optimal. A better understanding of the processes leading to the AF substrate might allow for the development of new strategies for AF prevention. The present study extends previous findings from our laboratory suggesting a role for angiotensin-II and MAPKs in CHF-related structural remodeling.¹⁰ In the latter work, we showed that atrial angiotensin-II concentration and MAPK expression increased after 24 hours of VTP, and that converting enzyme inhibition attenuated increases in angiotensin-II and ERK, along with atrial fibrosis. We now show that atrial angiotensin-II increases and MAPK activation are detectable within 6 hours of VTP onset, and precede changes in Bax/Bcl-2, caspase-3 and apoptosis. The present observations are compatible with a role of angiotensin-II-mediated MAPK activation in promoting apoptotic cell death and subsequent atrial structural remodeling. There is good evidence for a pro-apoptotic role of activated JNK and p38 MAPKs, with JNK appearing to be a particularly important pro-apoptotic stimulus.^{15,19} On the other hand, ERK activation is anti-apoptotic but promotes cardiac hypertrophy and fibrosis.^{20,21} It is possible that the progressive increase in ERK over 1-5 weeks of VTP, at a time when JNK returns towards control values and p38 is stable, may be responsible for the transient nature of the atrial apoptosis we saw, along with the development of cellular hypertrophy and interstitial fibrosis over weeks 1-5.

Several important changes, including atrial apoptosis, cell death and inflammation occurred very early following the onset of VTP and were quite fleeting. This observation suggests that early events may be important in atrial structural remodeling, and that early

intervention may be necessary for effective prevention of the development of the AF substrate.

Potential limitations

The present study demonstrates the occurrence of apoptotic cell death in a well-defined experimental model of atrial structural remodeling and establishes its time-course along with that of a variety of related phenomena; however, it does not permit conclusions about the mechanistic role of apoptosis in structural remodeling. The total percentage of dead cells at 24-hour VTP was much greater than the percentage of TUNEL-positive nuclei. This observation is consistent with a significant amount of cell death by pathways (presumably necrotic) other than apoptosis. However, dead-cell clearance may require much longer periods than the duration of TUNEL-positivity; therefore, it cannot be excluded that all the cell death observed was due to apoptosis. Further studies in transgenic models with deletions of specific components of potential signalling pathways would be very useful in defining causal relations in atrial structural remodeling.

TUNEL-positivity and DNA fragmentation are not completely specific to apoptosis. Necrotic death or DNA repair can also lead to TUNEL-positive staining. The diffuse bands we saw in DNA laddering studies suggest the presence of both specific and non-specific cleaved DNA, associated with apoptosis and necrosis respectively. We observed necrotic contraction bands on HPS-stained slides, also supporting the involvement of necrosis in atrial remodeling. It would certainly be of great interest to verify whether inhibition of apoptosis could decrease atrial remodeling and prevent atrial fibrillation promotion by experimental CHF.

Acknowledgements. The authors thank Chantal Maltais and Nathalie L'Heureux for excellent technical assistance and Annie Laprade for secretarial help with the manuscript. They also wish to thank Denis DeBlois, Louis Robert Villeneuve and Shant Der Sarkissian for help with the development of methods to quantify apoptosis. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, the Mathematics for Information Technology and Complex Systems (MITACS) Network of Centers for Excellence and the Quebec Heart and Stroke Foundation. Dr. Thorin is a Heart and Stroke Foundation of Canada MacDonald Scholar.

References

1. Bates S, Vousden KH. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Current opinion in Genetics & Development* 1996;6:12-19.
2. Wang J, Walsh K. Resistance to apoptosis conferred by cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 1996; 273:359-361.
3. Narula J, Haider N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Eng J Med* 1996; 335: 1182-1189.
4. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, et al. Evidence of cardiomyocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; 148 :141-149.
5. Aimé-Sampé C, Folliguet T, Rucker-Martin C, et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *JACC* 1999; 34:1577-86.
6. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001 Feb 6;103(5):769-77.
7. Dispersyn GD, Ausma J, Thone F, Flameng W, Vanoverschelde JL, Allessie MA, Ramaekers FC, Borgers M. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res*. 1999 Sep;43(4):947-57.
8. Li D, Fareh S, Leung TK, et al. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs. Atrial remodeling of a different sort. *Circulation*.1999;100:87-95.

9. Lie JT, Falk RH, James TM. Cardiac anatomy and pathologic correlates of atrial fibrillation. In: Falk RH, Podrid PJ, eds. *Atrial fibrillation – Mechanisms and management*. Philadelphia, Lippincott-Raven: 1997;23-52.
10. Li D, Shinagawa K, Pang L, et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001;104:2608-2614.
11. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, et al. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997;96:1180-1184.
12. Goette A, Staack T, Rocken C, et al. Increased expression of extracellular signal-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *JACC* 2000;35:1660-1677.
13. Everett T, Li H, Mangrum M, et al. Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2000;102:1454-1460.
14. Yano M, Kim S, Izumi Y, et al. Differential activation of cardiac c-Jun amino-terminal kinase and extracellular signal-related kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res* 1998;83:752-760.
15. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111-1129.
16. Nicoletti A, Michel J-B. Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res* 1999;41:532-543.

17. Heinke MY, Yao M, Chang D et al. Apoptosis of ventricular and atrial myocytes from pacing-induced canine heart failure. *Cardiovasc Res* 2001;49:127-134.
18. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, et al. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2001;89:279-86.
19. Ma X-L, Kumar S, Gao F, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases and cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1999;99:1685-1691.
20. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2873-2892.
21. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, et al. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension* 2000;36:330-6.

Figure legends

Figure 1. Top: Examples of atrial tissue from control (I) and 24-hour VTP (II) dogs. Column a represents FITC and propidium iodide staining, column B shows TRITC staining of fragmented DNA and column C superimposed images. **Bottom:** Percentage of TUNEL-positive atrial cardiomyocytes as function of VTP duration (mean \pm SEM, n=6 for control, CTL, and n=4 for other groups). *P<0.05, **P<0.01 versus CTL.

Figure 2. Top: Representative examples of DNA gels containing 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 μ g of DNA from one dog in each group shown. **Bottom:** Mean \pm SEM fragmented DNA (n=4 for CTL, VTP groups) as function of VTP duration. *P<0.05, **P<0.01 versus CTL.

Figure 3. Mean \pm SEM caspase-3 activity as function of VTP duration (n=5 for CTL, VTP groups). *P<0.05, **P<0.01 versus CTL.

Figure 4. Top: Atrial expression of Bax and Bcl-2 (mean \pm SEM, n=5,4 for CTL, VTP groups). **Bottom:** Bax/Bcl-2 ratio as a function of VTP duration. *P<0.05, **P<0.01 versus CTL.

Figure 5. A. Atrial and **B.** plasma angiotensin-II concentration (mean \pm SEM, n=5 per group). *P<0.05, **P<0.01 versus CTL.

Figure 6. Atrial expression of phosphorylated and total ERK1/2 (**A**), P38 (**B**) and JNK (**C**). mean \pm SEM, n=5,4 for CTL, VTP groups). *P<0.05, **P<0.01 versus CTL.

Figure 7. A. Mononuclear (MN), polymorphonuclear (PMN) and total white cells per field (1000x). **B.** Percentage of non-viable (acidophilic) and TUNEL-positive cardiomyocytes. **C.** Atrial myocyte length (mean \pm SEM; n=5,4 for CTL, VTP groups). *P<0.05, **P<0.01 versus Ctl).

Figure 8. A. DAF as function of VTP duration. (mean \pm SEM, n=12/group). **B.** Percentage of atrial cross-sectional area comprised of fibrous tissue. (n=5,4 for CTL, VTP groups). **C.** Relationship between DAF and fibrous tissue content in each group of dogs.

Figure 1

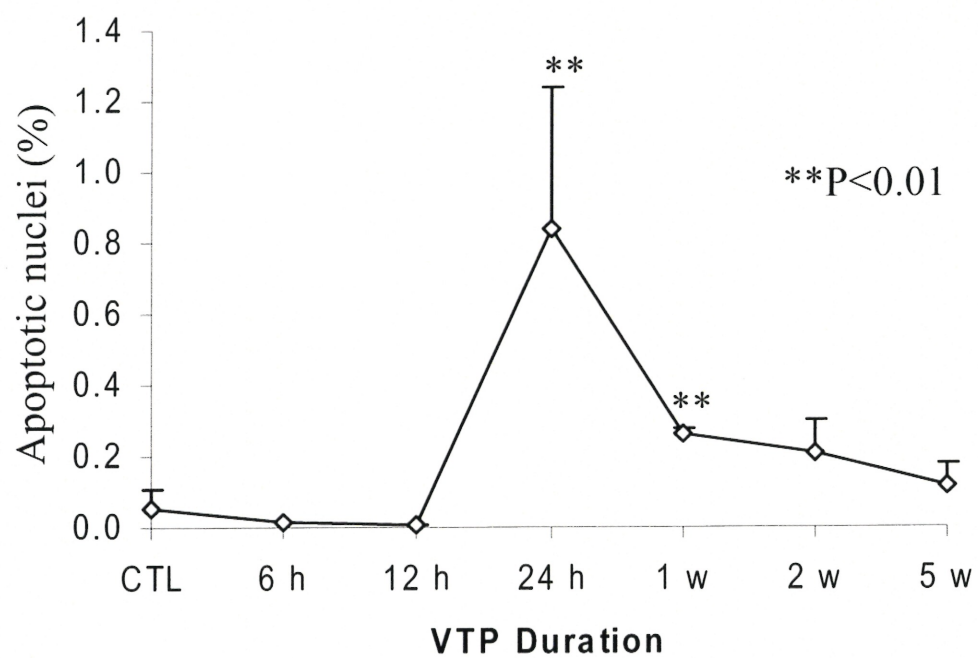
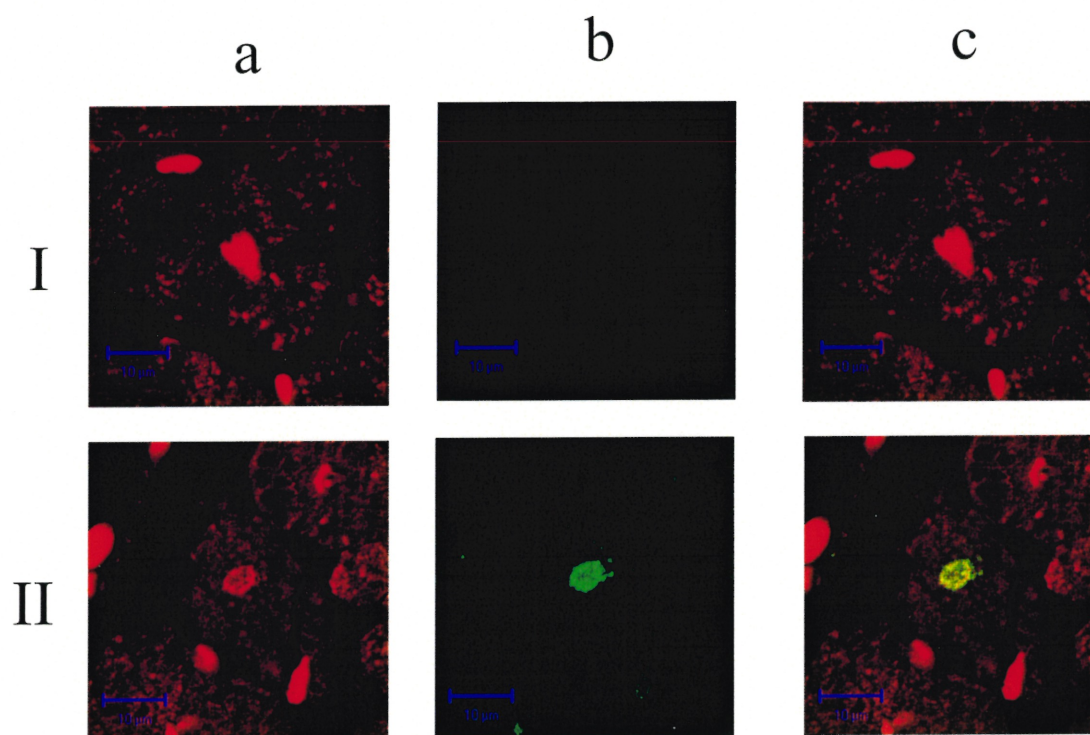


Figure 2

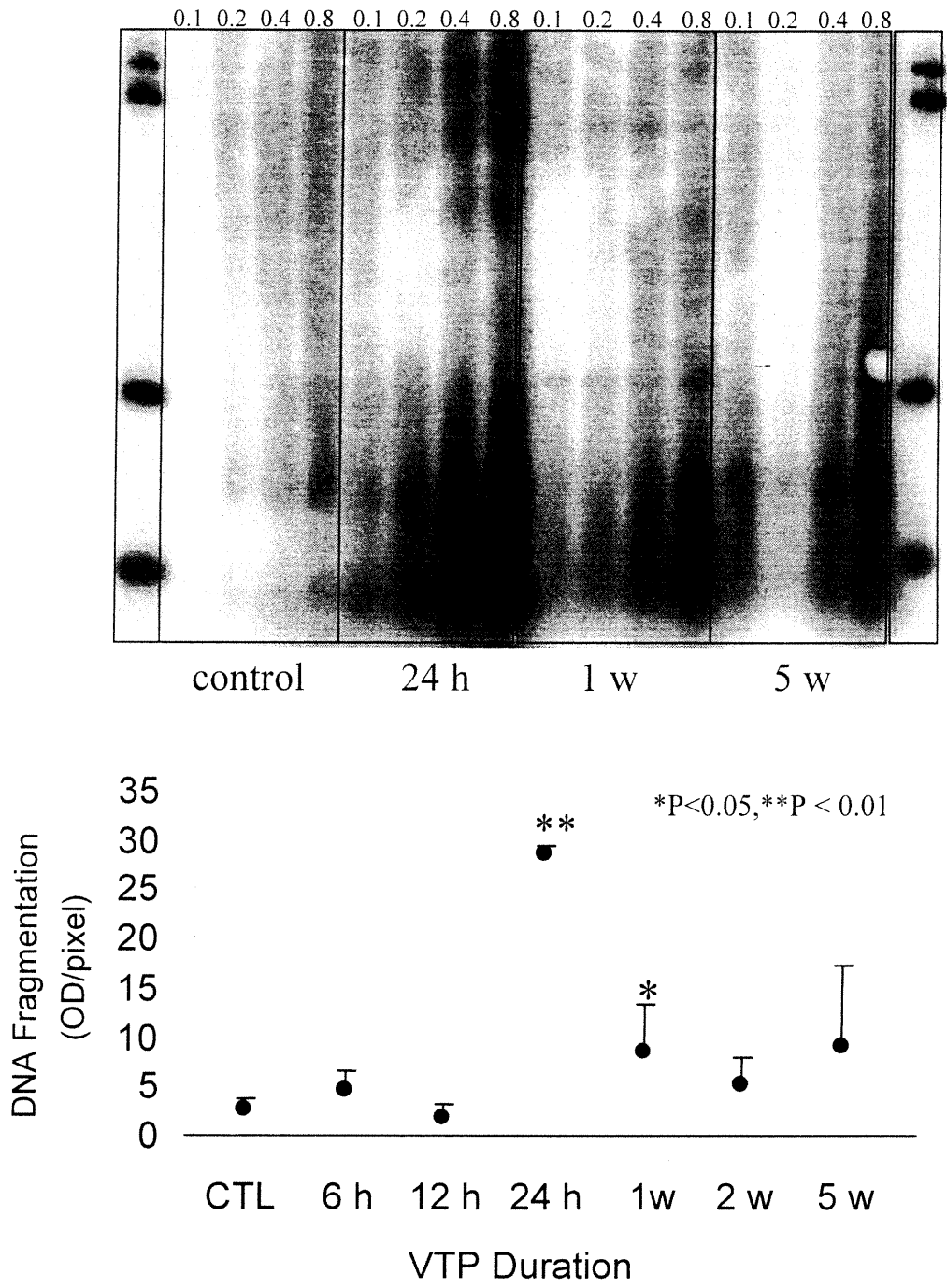


Figure 3

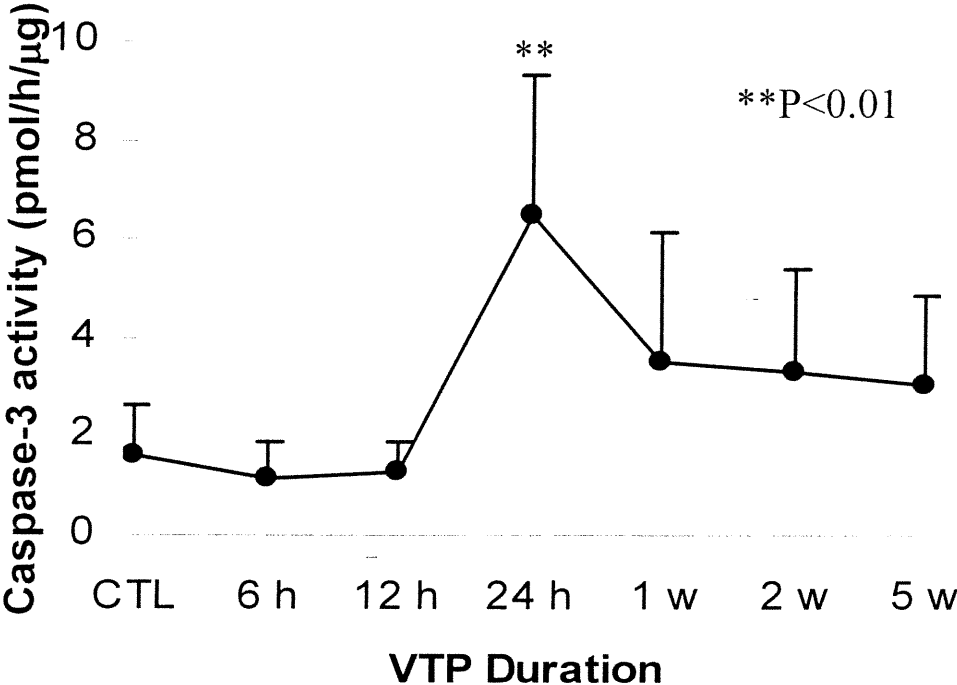


Figure 4

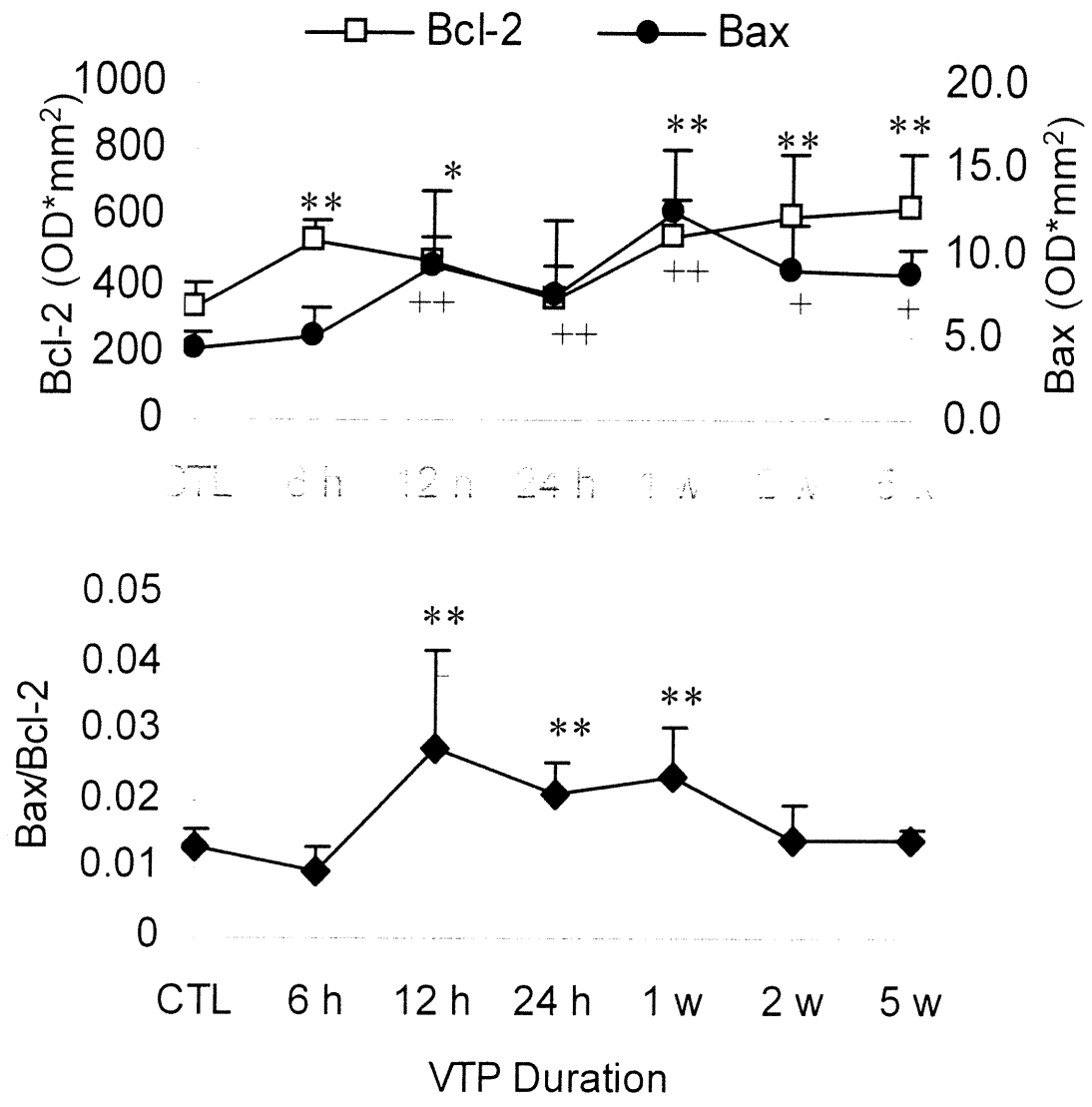


Figure 5

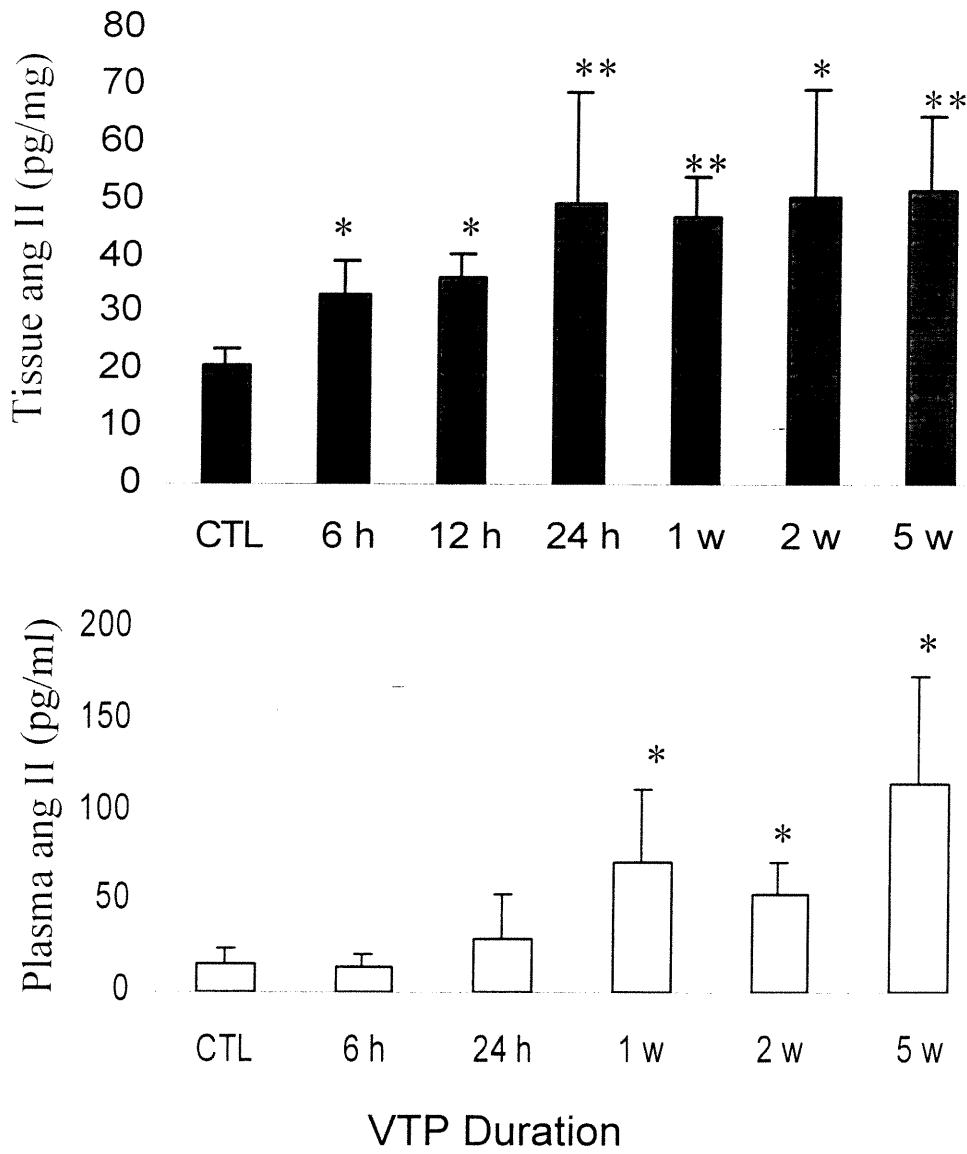


Figure 6

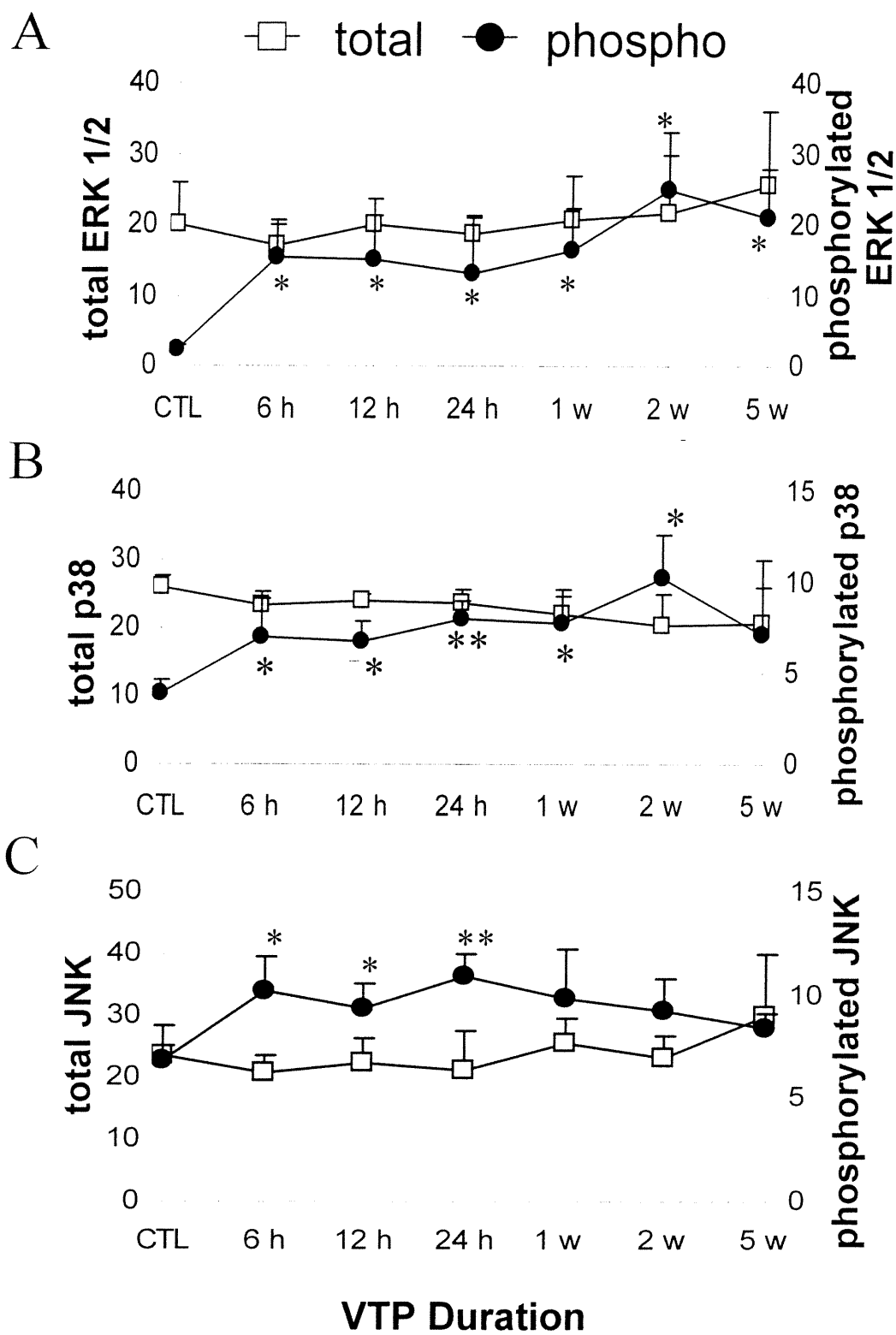


Figure 7

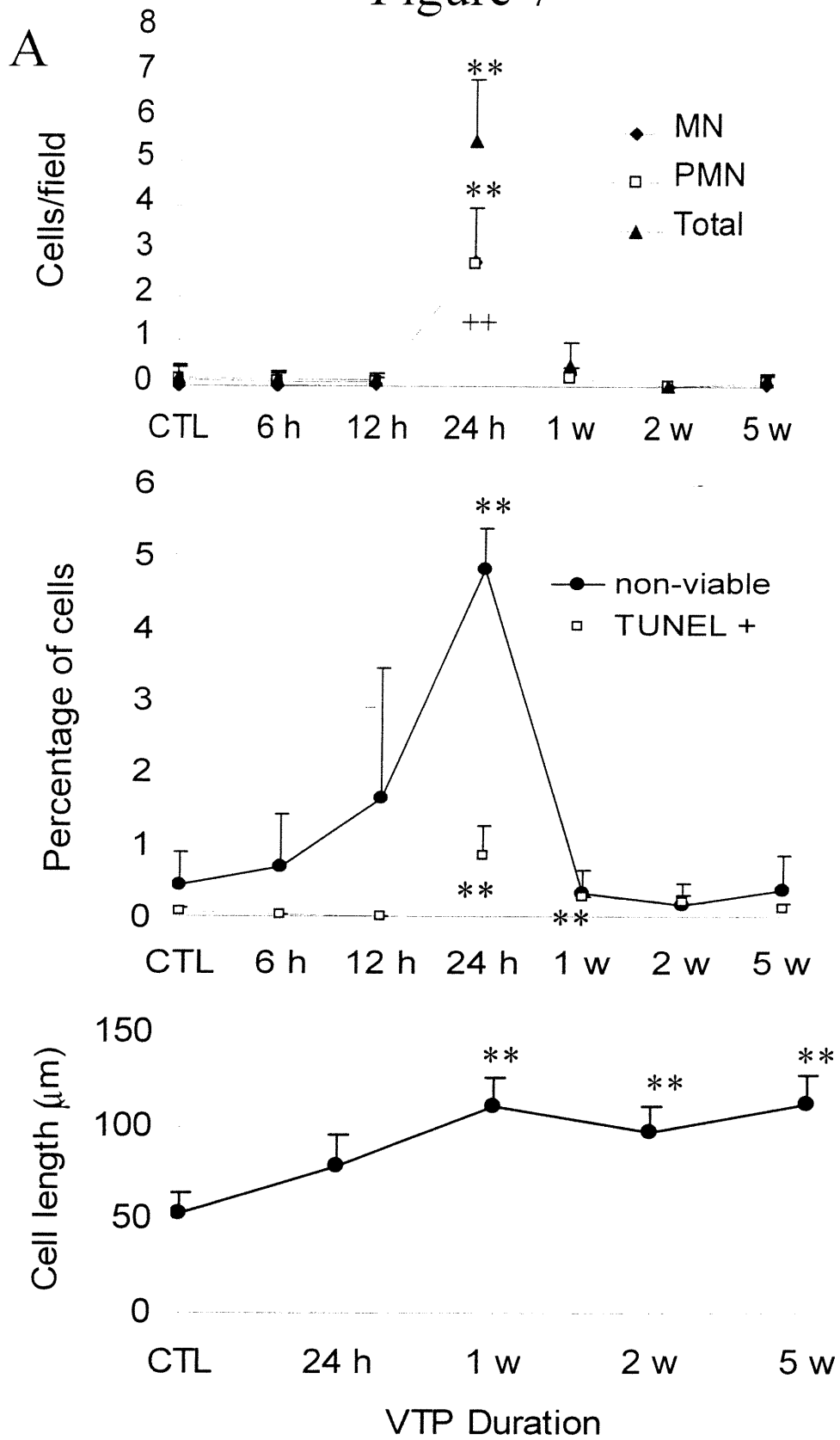
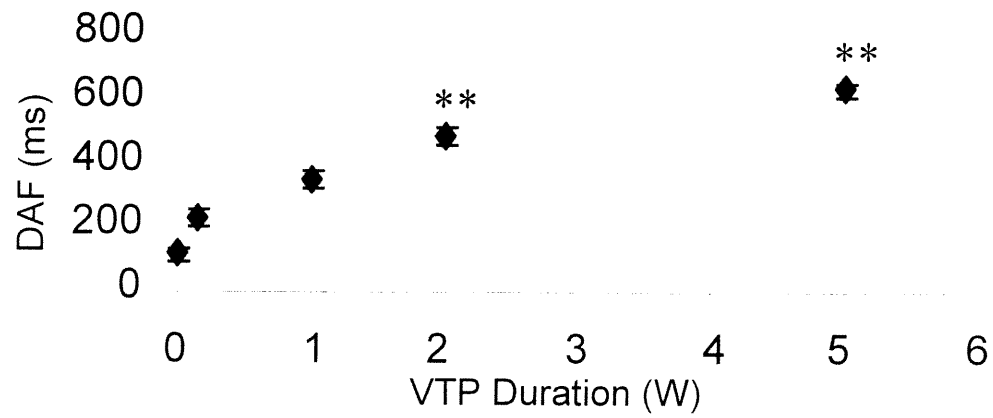
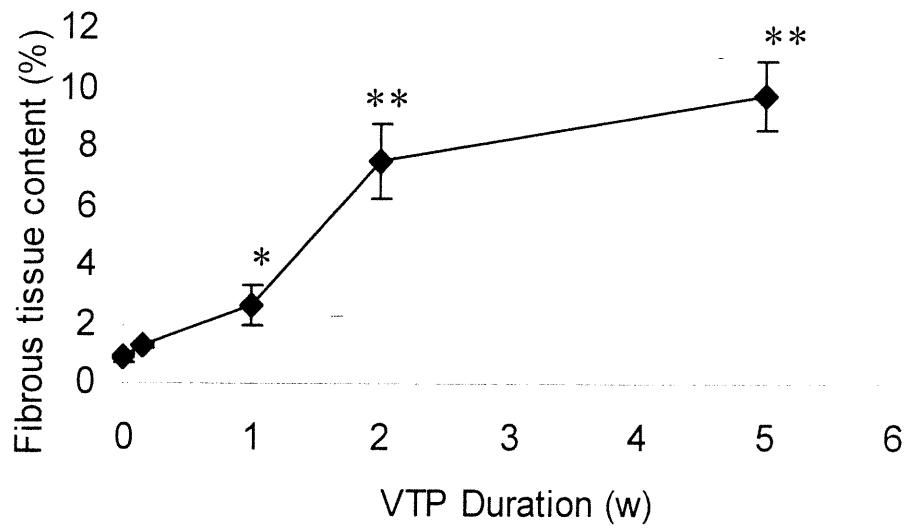
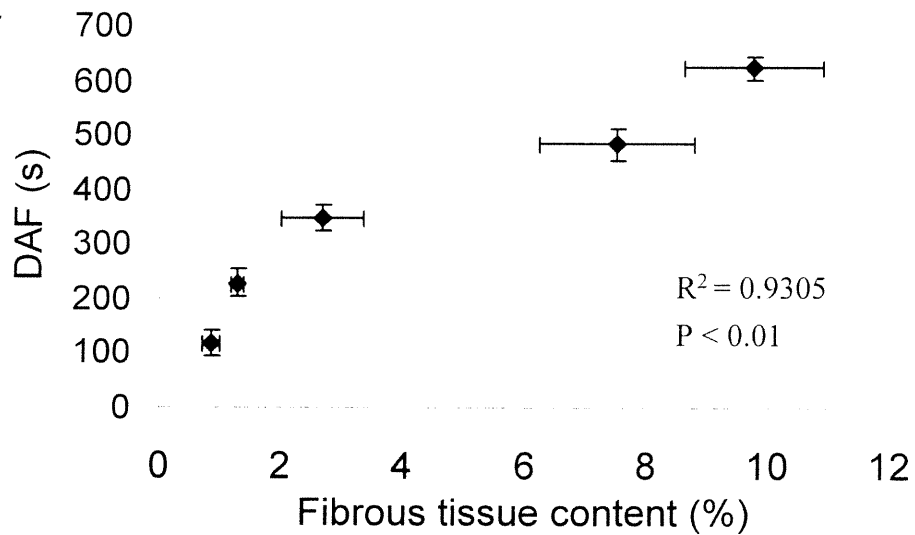


Figure 8

A**B****C**

4. Discussion

4.1 Nouveaux éléments

Notre étude fut la première dans la littérature à regarder la séquence d'évènements physiopathologiques dans un modèle de remodelage structurel auriculaire. De plus, elle est la première étude expérimentale à mettre en évidence une apoptose reliée au développement d'un substrat pour la FA et à définir l'échéancier de l'apoptose en relation avec d'autres changements cellulaires. Dans cette étude, nous avons observé une série de changements tout au long du développement de l'insuffisance cardiaque. Dans un premier temps, nous avons observé que le niveau d'angiotensine II présente dans les oreillettes augmentait significativement après 6 heures, pour demeurer élevé par la suite. Contrairement à nos attentes, les niveaux d'angiotensine II plasmatique n'étaient augmentés qu'après 1 semaine. Ceci suggère l'implication du système local rénine-angiotensine dans les premières étapes du remodelage auriculaire. Nous avons aussi observé une augmentation des niveaux d'expression de la forme phosphorylée, ou active, de trois MAPKs (P38, JNK et ERK1/2) après 6 heures d'entraînement électrique rapide. Le ratio Bax/Bcl-2 était augmenté après 12 heures et l'activité de la caspase-3 et la présence d'ADN fragmenté (TUNEL et DNA laddering) après 24 heures d'entraînement électrique rapide. Nos observations se révèlent importantes pour la compréhension des mécanismes entraînant le remodelage auriculaire et la formation d'un substrat qui facilite l'incidence et le maintien de la fibrillation auriculaire.

4.2 Comparaison des résultats avec la littérature

Il est maintenant établi que la fibrillation auriculaire est associée à une altération électrophysiologique et structurelle des tissus auriculaires. Des biopsies auriculaires effectuées chez des patients souffrant de FA ont démontré une forte incidence de fibrose interstitielle⁴⁷. Aimé-Sampé *et al*¹⁸ ont observé qu'en présence de fibrillation auriculaire survenait fréquemment un élargissement des oreillettes, une altération du matériel contractile, une augmentation de l'expression de la caspase-3 et une baisse du ratio Bcl-2/Bax. Or, le pourcentage de cellules TUNEL-positives (29%) qu'ils ont observé était grandement supérieur au taux que nous avons obtenu. Cependant, ceux-ci obtenaient un pourcentage inférieur à 29% lorsqu'ils calculaient le nombre de cellules ayant à la fois été marquées positivement au TUNEL et présentant un noyau condensé. De plus ils n'ont pu détecter aucune fragmentation d'ADN par le test de DNA laddering. Ceci suggère que le niveau total de cellules apoptotiques impliquées dans le remodelage doit être en réalité beaucoup moindre que celui rapporté dans leur étude. Par ailleurs, notons que notre modèle d'étude démontrait un remodelage auriculaire lié au développement de l'insuffisance cardiaque, chez des chiens où la FA induite était prolongée, mais non chronique. Il se peut que le remodelage auriculaire lié à l'insuffisance cardiaque diffère du remodelage auriculaire survenant lors de FA chronique observé chez les patients. Goette *et al*¹⁷ ont observé un accroissement du niveau d'ARNm encodant pour ERK2 et les formes actives, tyrosine-phosphorylées, des protéines ERK1, ERK2 et ECA chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire. Cependant, ces études cliniques ne nous permettent pas de déterminer si les altérations des tissus sont la cause ou la conséquence des FAs.

Boyden et Hoffman⁴⁸ ont développé un modèle de régurgitation de la valve tricuspide où il y avait élargissement de l'oreillette droite et ils ont alors observé un accroissement de l'incidence des FAs. Everett *et al*⁴⁹ ont observé un accroissement de la taille des oreillettes, accompagné d'une altération des myofibrilles et du réticulum sarcoplasmique et d'une hausse du nombre et de la taille des mitochondries chez des chiens souffrant de fibrillation auriculaire induite par tachycardie auriculaire. Dans un modèle de FA chronique chez la chèvre, une variété d'altérations ultrastructurales ont été décrites¹⁶. Ces changements ont été interprétés comme des altérations du phénotype reliés à une dédifférentiation cellulaire. Une étude effectuée par Li *et al*²³ suggérait que l'insuffisance cardiaque induite par tachycardie ventriculaire entraînerait le développement d'une fibrose dans les tissus auriculaires, qui pourrait favoriser la formation de micro-circuits de réentrée en affectant la conduction électrique. Dans une étude subséquente²⁴, ils ont démontré que la tachycardie ventriculaire entraînerait une augmentation de l'angiotensine II tissulaire et une activation de ERK1/2 alors qu'un traitement à l'énalapril atténuait ces changements et réduisait la fibrose interstitielle ainsi que l'incidence des FAs.

Notre étude suggère que la mort cellulaire surviendrait rapidement après le début de l'entraînement électrique rapide et que l'apoptose jouerait un rôle important. Le développement de la fibrose interstitielle surviendrait plus tardivement dans le processus de remodelage auriculaire, en parallèle avec l'augmentation de la durée des FAs.

L'accumulation de collagène dans la matrice extracellulaire des ventricules a été observée dans une variété de conditions pathologiques,

incluant l'hypertension et l'infarctus du myocarde. Il a été suggéré que l'angiotensine II pouvait constituer un facteur important de cette accumulation. En effet, la surexpression du récepteur AT1 chez un modèle de souris transgénique a entraîné le développement de fibrose interstitielle⁵⁰. Un traitement au captopril de rats, chez qui un infarctus du myocarde avait été induit, prévient l'accumulation de collagène⁵¹. Plus récemment, Prescott *et al*⁵² ont démontré que le système cardiaque intrinsèque rénine-angiotensine pouvait contrôler le niveau local d'angiotensine II et induire une fibrose interstitielle cardiaque, indépendamment de la pression systémique et du système rénine-angiotensine circulant.

Nos résultats montrent un effet très temporaire de la tachycardie ventriculaire sur la survie des cardiomyocytes auriculaires, qui diffère des observations effectuées par Cesselli *et al*⁵³ sur le même modèle expérimental. Ils ont observé une augmentation progressive de l'altération de la survie des cardiomyocytes ventriculaires, où le niveau de fragmentation de l'ADN, l'activité des caspase-3 et -9, l'activation de p53 et la relâche de cytochrome c étaient augmentés en fonction du temps, atteignant des valeurs maximales après quatre semaines de tachycardie ventriculaire. La différence entre nos résultats et ceux de Cesselli peut être attribuable aux différences qui existent entre le rôle et la structure des oreillettes et des ventricules. Latif *et al*⁴³ ont aussi observé une augmentation de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, en plus d'une hausse du nombre de cellules marquées positivement par le test de TUNEL chez des patients atteints de maladies cardiaques ischémiques ou de cardiomyopathies dilatées, comparativement à des patients sains.

4.3 Mécanismes suggérés

Nicholson *et al*⁵⁴ ont montré que CCP32 (caspase-3) était responsable de la dégradation de PARP, un phénomène impliqué dans l'apoptose chez les mammifères. Chez *Ceanorhabditis elegans*, le gène *ced-3* est régulé négativement par le gène *ced-9*³⁵. On a démontré que chez les mammifères, les homologues de *ced-9*, les membres de la famille de Bcl-2, avaient des effets pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques⁵⁵. Dans notre étude, nous avons observé que l'augmentation du ratio Bax/Bcl-2 (après 12 heures) précédait l'augmentation de l'activité de la caspase-3 et l'augmentation du niveau d'ADN fragmenté (24 heures). Ceci est compatible avec le rôle de régulation des membres de la famille de Bcl-2 dans les premières étapes de la cascade apoptotique.

L'implication des trois MAP kinases mesurées (P38, JNK, ERK1/2) dans le remodelage a fait l'objet de nombreuses études et leur effet spécifique semble fortement sensible aux conditions expérimentales. En effet, chez les rats néonataux, l'activation de JNK sans altération de P38 entraînerait une hypertrophie⁵⁶. Par contre, la co-activation de JNK et P38 induirait des altérations phénotypiques associées à l'apoptose, sans hypertrophie⁵⁷. Une étude effectuée chez des lapins soumis à des épisodes d'ischémie-reperfusion a montré que l'administration de SB 203580 (un inhibiteur de P38) avant l'épisode d'ischémie entraînait une réduction de l'apoptose⁵⁸. Notre étude montre une augmentation simultanée de l'activité de P38 et JNK, qui pourrait induire l'augmentation du ratio Bax/Bcl-2. Après une semaine d'entraînement électrique, le niveau d'activité de la caspase-3 et de JNK-phosphorylé retourne au même niveau que chez les animaux contrôles, alors que la kinase P38-phosphorylée demeure élevée,

suggérant que l'activité de la JNK pourrait être importante pour qu'il y ait induction d'apoptose. Nous avons montré que la MAP kinase ERK était impliquée dans le processus de l'hypertrophie cardiaque⁵⁹ ainsi que dans le mécanisme conduisant à l'activation de la synthèse de collagène par l'angiotensine⁶⁰. Nos résultats montrent un accroissement de l'activité de ERK avec le temps, qui atteint une valeur maximale après deux semaines d'entraînement électrique. Ceci suggère que l'activation de ERK1/2 pourrait induire le développement de l'hypertrophie et de la fibrose interstitielle. Le traitement à l'enalapril de chiens soumis à un entraînement électrique rapide n'a pas induit de changements de l'activité de P38 et de JNK, mais a réduit l'activation de ERK et de la fibrose interstitielle²⁴, ce qui supporte l'implication de l'angiotensine et de ERK dans le développement de la fibrose auriculaire.

L'activation du système rénine-angiotensine est habituellement un mécanisme d'adaptation essentiel en réponse à un déséquilibre hémodynamique qui permet de maintenir l'homéostasie. Cependant, en conditions pathologiques telles que l'insuffisance cardiaque, le système rénine-angiotensine agit comme mécanisme de défense contre un désordre hémodynamique, mais entraîne de mauvaises conséquences à long terme⁶¹. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation du niveau plasmatique d'angiotensine II après une semaine d'entraînement électrique rapide. Cependant nous avons observé qu'une augmentation de l'angiotensine II tissulaire survenait beaucoup plus rapidement. Jusqu'à récemment, les effets du système rénine-angiotensine étaient reliés principalement au système rénine-angiotensine circulant. Au cours des dernières années, il a été démontré que le système rénine-angiotensine

tissulaire était impliqué dans des conditions physiologiques et pathologiques ⁶². Une étude a démontré une activation de ce système chez des cardiomyocytes soumis à un étirement ⁶³. Nos résultats suggèrent que la production locale d'angiotensine II augmente rapidement après le début de la tachycardie ventriculaire et qu'elle pourrait avoir un rôle important dans le mécanisme de remodelage auriculaire.

4.4 Impacts futurs

Cette étude est la première à évaluer l'évolution et la nature des changements structuraux survenant au niveau auriculaire au cours du développement de l'insuffisance cardiaque. Nos résultats suggèrent que l'apoptose est un phénomène temporaire et précoce qui précéderait le remodelage structurel et qui pourrait même en être la cause. L'apoptose est précédée par un accroissement local du niveau d'angiotensine et de l'activation de MAP kinases, suivi d'un changement de Bcl-2 qui favorise l'induction de l'apoptose. La mort cellulaire est suivie d'une fibrose interstitielle, qui s'accroît parallèlement à l'augmentation de la durée des FAs. Ces observations peuvent favoriser le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir le remodelage auriculaire et réduire l'incidence de fibrillation auriculaire. De plus, nos travaux montrent que des changements substantiels surviennent rapidement après le début de la tachycardie ventriculaire, soulignant l'importance d'une intervention rapide pour la prévention de la formation d'un substrat pour la fibrillation auriculaire.

4.5 Directions futures

Lors de travaux ultérieurs, il serait de grand intérêt de définir plus précisément les mécanismes qui entraînent la mort cellulaire par apoptose. Nous avons suggéré que l'angiotensine II, en activant les MAPKs, pourrait induire l'apoptose. Cependant, Cesselli *et al*⁵³ ont attribué la mort cellulaire ventriculaire au stress oxydatif. Or, d'après Nickenig et Harrison⁷¹, l'angiotensine pourrait, via son récepteur AT1, induire la production de radicaux oxygénés. Il se pourrait aussi, puisque nous avons observé de l'inflammation importante après 24 heures de stimulation rapide, que les cellules inflammatoires libèrent des radicaux libres qui pourraient induire la mort cellulaire. Finalement, il se pourrait à l'opposé, que comme mentionné dans l'introduction, les leucocytes viennent agir comme vidangeurs de radicaux libres. Alors, leur présence préviendrait en fait une mort cellulaire plus massive, dû au stress oxydatif qui serait plus élevé en leur absence. Il serait donc certainement intéressant de vérifier si dans notre modèle canin, un stress oxydatif survient suite à l'augmentation du niveau d'angiotensine II tissulaire ou du nombre de cellules inflammatoires.

Une étude effectuée sur des moutons a montré que l'entraînement électrique rapide induit une augmentation considérable de la pression intra-auriculaire après seulement 30 minutes⁶⁴. Cette surcharge de volume sanguin au niveau auriculaire semble aussi existante dans notre modèle de chien puisque une hypertrophie importante (allongement des cellules) survient après une semaine de tachycardie ventriculaire. Or, l'étirement, appelé généralement stretch, peut induire une surcharge de calcium intracellulaire suffisamment élevée pour entraîner la mort cellulaire. Par ailleurs, dans un modèle de sténose aortique, Teiger *et al*⁷⁰ ont observé un

accroissement important de l'apoptose de cardiomyocytes dans les 7 jours succédant l'induction de la sténose. Afin de déterminer lequel, s'il en est un, de ces mécanismes est responsable de la mort cellulaire, le traitement de chiens avec des drogues telles que l'enalapril (un inhibiteur de l'ECA), l'ibuprofène (un anti-inflammatoire), la vitamine C (un anti-oxydant) et le verapamil (un bloqueur de canaux calciques) qui seraient soumis à 24 heures d'entraînement électrique rapide pourrait permettre de mieux définir le mécanisme. En mesurant sur ces chiens traités à différents médicaments quels sont les niveaux de mort cellulaire, il serait possible de connaître d'une part l'importance de l'accroissement du niveau d'angiotensine tissulaire et de son rôle dans la survie cellulaire. Nous pourrions d'autre part déterminer si l'infiltration des leucocytes constitue une cause ou une conséquence de la mort cellulaire et si sa prévention s'avère bénéfique ou néfaste pour la prévention de la mort cellulaire. Quant au stress oxydatif, nous ne connaissons pas son implication et son importance, mais il serait intéressant de déterminer s'il est présent au niveau auriculaire afin de comparer les mécanismes impliqués dans le remodelage auriculaire et ceux impliqués dans le remodelage ventriculaire présentés par Cesselli *et al*⁵³. Nous pourrions finalement connaître l'implication du stretch, un phénomène complexe à démontrer *in vivo*, mais que l'on peut facilement soupçonner d'être présent lors d'un changement du rythme cardiaque aussi drastique que celui induit dans notre modèle animal.

Notons que bien que le test de TUNEL nous ait permis de déterminer le taux de cardiomyocytes apoptotiques, les autres tests effectués (DNA laddering, activité de la caspase-3 et ratio Bax/Bcl-2) concernant l'apoptose ne permettaient pas de distinguer dans quels types cellulaires survenaient ces

changements. Il serait envisageable que d'autres cellules que les myocytes (fibroblastes, cellules endothéliales, leucocytes) soient impliquées dans les changements des différents paramètres étudiés. L'implication des différents types cellulaires dans le phénomène de remodelage auriculaire est mal connue, mais pourrait s'avérer de grande importance dans notre compréhension de ce mécanisme complexe.

L'apoptose est un sujet d'intérêt et fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Cependant, il semble que dans notre modèle, la nécrose soit aussi impliquée, potentiellement même d'avantage que l'apoptose, dans le remodelage tissulaire auriculaire. Ce mécanisme apparemment désordonné, qui entraîne la libération du contenu cellulaire pourrait être à l'origine de l'infiltration des leucocytes, qui s'avèrent indispensables pour effectuer la digestion des résidus de cellules mortes par nécrose. De plus, il est connu que la nécrose entraîne la formation d'une fibrose de remplacement. Par conséquent, la nécrose pourrait s'avérer être un élément clé dans le processus de remodelage et une meilleure compréhension des mécanismes qui entraînent la nécrose pourrait mener au développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Un autre sujet d'intérêt est la détermination du mécanisme responsable de la fibrose interstitielle, qui a été fortement associée à l'incidence des FAs. Plusieurs études ont montré que l'angiotensine II pouvait induire le développement de fibrose interstitielle, mais le mécanisme exact entraînant le développement de fibrose demeure mal défini. La fibrose agit-elle comme un tissu de remplacement suite à la mort de cardiomyocytes ou s'agit-il d'un processus indépendant ? Une détermination des mécanismes

induisant la fibrose pourrait permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour la prévention de la fibrillation auriculaire. Il serait par exemple intéressant de déterminer si les 24 premières heures de tachycardie ventriculaire constituent un stimulus suffisant pour entraîner les réactions subséquentes. Ceci pourrait se vérifier en observant les altérations tissulaires présentes après 5 semaines chez des animaux où la tachycardie n'aurait été induite que durant 24 heures, pour être ensuite interrompue. De même, l'utilisation d'un traitement pharmacologique uniquement durant les 24 premières heures de tachycardie chez des animaux soumis à 5 semaines de tachycardie ventriculaire pourrait nous permettre d'étudier l'importance des premières 24 heures dans le phénomène de remodelage auriculaire ainsi que leur implication dans la formation du substrat soutenant les fibrillations auriculaires.

Bien que nous ayons mesuré différents éléments impliqués dans le mécanisme de remodelage auriculaire, l'insuffisance cardiaque s'est avéré altérer une grande diversité de systèmes, impliqués dans une variété de fonctions. L'approche que nous avons utilisée pour notre étude ne nous permettrait pas de définir tous les éléments impliqués dans le remodelage auriculaire ni les interactions existantes entre ces éléments. L'utilisation de technologies de pointe pour l'étude de la génomique et de la protéinomie pourrait s'avérer d'une grande utilité. En effet, en utilisant des techniques à large spectre, il est devenu possible d'observer l'effet d'une pathologie sur un grand nombre de gènes ou de protéines à la fois. À l'aide de la technique de *genechip* par exemple, il est possible de comparer l'expression génique de 36 000 gènes humains dans des tissus malades et des tissus sains. Cette technique de grande envergure permet donc d'observer la panoplie de gènes

dont l'expression est altérée pour une pathologie aussi complexe que l'insuffisance cardiaque.

Une autre approche intéressante à envisager est l'utilisation de souris modifiées génétiquement pour différents éléments du mécanisme que nous suggérons être responsables du remodelage auriculaire. Par exemple, puisque nous avons suggéré que l'apoptose pourrait entraîner une fibrose de remplacement, l'utilisation d'une souris knock-out pour le gène encodant pour la caspase-3 (nous avons démontré qu'elle était impliquée dans le processus de l'apoptose survenant au cours du remodelage auriculaire) pourrait nous permettre de vérifier si la fibrose est directement liée à la mort cellulaire par apoptose. Comme il a été mentionné plus tôt, l'apoptose est nécessaire au développement embryologique et au maintien de l'homéostasie. Pour démontrer l'importance de l'apoptose dans le remodelage auriculaire spécifiquement, sans affecter le développement embryonnaire ni l'homéostasie des différents systèmes, il serait donc préférable que la mutation soit inductible et spécifique au niveau cardiaque. Ainsi, lorsque l'expression du gène est inhibée, l'induction d'une insuffisance cardiaque ne devrait pas induire de fibrose auriculaire, si notre hypothèse s'avérait exacte. Dans le cas contraire, nous saurions que d'autres causes que l'apoptose induisent la fibrose interstitielle et à long terme augmentent l'incidence de fibrillation auriculaire. De même, l'utilisation de souris modifiées génétiquement pour les MAP kinases ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine locale cardiaque pourraient nous permettre d'évaluer l'importance de ces différents éléments dans le processus de remodelage auriculaire. Un avantage des souris transgéniques est que l'on peut déterminer le rôle d'une protéine en assumant son inhibition, plus

facilement qu'avec l'utilisation d'antagonistes qui sont généralement moins spécifiques et qui n'inhibent pas toujours totalement un récepteur. Par contre, il arrive que des souris modifiées génétiquement développent une pathologie sans que l'on ne l'ait induite. Par exemple, la souris transgénique surexprimant le récepteur AT1, décrite par Paradis *et al*⁵⁰, développait une insuffisance cardiaque reliée à cette mutation. Alors, il est possible de suggérer que l'angiotensine puisse induire une insuffisance cardiaque par l'activation de son récepteur AT1, mais cela ne permet pas d'affirmer que l'angiotensine soit généralement impliquée dans le processus de développement de l'insuffisance cardiaque. La déficience induite par une mutation génétique peut entraîner une pathologie par un processus particulier à la mutation et différent du mécanisme habituel. Les souris transgéniques peuvent donc servir d'outil pour décortiquer des mécanismes particuliers impliqués dans une pathologie, mais le mécanisme par lequel elles développent leur condition pathologique ne sera pas nécessairement représentatif de celui rencontré chez les patients. De plus, les études effectuées sur des souris génétiquement modifiées par une mutation non-inductible devraient toujours être considérées avec un certain recul, car il y a des risques d'altérations du développement embryonnaire, ce qui limite les possibilités d'utilisation du modèle.

Étant donné que nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Cesselli *et al*⁵³, il est possible que le remodelage auriculaire soit un processus différent du remodelage ventriculaire induit lors du développement de l'insuffisance cardiaque. Nous avons effectué une étude préliminaire comparative entre l'évolution de la fibrose auriculaire et celle de la fibrose ventriculaire. La différence qui existait entre les deux était notable, puisque même après cinq

semaines d'entraînement électrique rapide, les ventricules montraient un taux de fibrose très faible. Dans une étude ultérieure, il serait intéressant de faire une étude parallèle, comparative, de l'évolution ainsi que des causes des changements structuraux survenant aux niveaux auriculaire et ventriculaire au cours du développement de l'insuffisance cardiaque.

En conclusion, nous avons observé que l'insuffisance cardiaque induite par entraînement électrique rapide ventriculaire induisait un accroissement rapide de l'angiotensine tissulaire, une activation des MAP kinases P38, JNK et ERK1/2 et une augmentation temporaire de l'apoptose. Subséquemment, une augmentation de fibrose corrélant avec l'augmentation de l'incidence de la fibrillation auriculaire est survenue. Nos résultats suggèrent que d'importants changements surviennent dans les premières heures suivant l'initiation de la tachycardie ventriculaire et pourraient être induits suite à l'activation des MAP kinases. Cette étude est la première à décrire l'évolution temporelle des changements structuraux induits par entraînement électrique rapide. Elle souligne l'importance d'une intervention hâtive pour la prévention du remodelage auriculaire et dirige les futurs travaux de recherche vers la compréhension du rôle du système local rénine-angiotensine, des MAP kinases et de l'apoptose dans le mécanisme de remodelage auriculaire.

5. Bibliographie

1. Falk RH. Atrial fibrillation. Medical Progress. *N Eng J Med* 2001;344; 14;1067-1078.
2. Wyse DG, Anderson JL, Antman EM, et al. Atrial fibrillation following-up investigation of rhythm management-the AFFIRM study-design. *Am J Cardiol* 1997; 79:1198-202.
3. Lévy S. Nosologie de la fibrillation auriculaire. Dans: Le Heusey J.-Y. La fibrillation auriculaire. Éds Louis Pariente, 1997 : 31-37.
4. Kulbertus H. Épidémiologie de la fibrillation auriculaire. Dans: Le Heusey J.- Y. La fibrillation auriculaire. Éds Louis Pariente, 1997 : 39-50.
5. Le Heusey J.-Y, Piot O, Copie X, Henry P, Lavergne T, Guize L. Mécanismes de la fibrillation auriculaire. Dans: Le Heusey J.- Y. La fibrillation auriculaire. Éds Louis Pariente, 1997 : 65-76.
6. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Eng J Med* 1998; 339:659-66.
7. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on . *Nature* (in Press).

8. Li D, Zhang L, Kneller J, Shi H, Nattel S. Ionic mechanism of repolarisation differences between canine right and left atrium. *Circ Res* 2001; 88: 1168-1175.
9. Wiffjels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: a study in awake instrumented dogs. *Circulation* 1995; 92: 1954-68.
10. Sun H, Chartier D, Leblanc N, Nattel S. The cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation* 2001; 98: 719-727.
11. Gaspo R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S. Tachycardia-induced changes in sodium current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 81:1047-1052.
12. Yue L, Feng J, Gaspo R, et al. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 81: 512-517.
13. Bosh RF, Zeng X, Grammer JB, et al. Ionic mechanisms of electrical remodeling of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; 44: 121-131.

14. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 80:772-781.
15. van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, et al. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 476-486.
16. Ausma J, Wiffjels M, Thoné F, Wouters F, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997;96: 3157-3163.
17. Goette A, Staack T, Röcken C, et al. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *JACC* 2000; 35: 1669-1677.
18. Aimé-Sampé C, Folliguet T, Rücker-Martin C, et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *JACC* 1999; 34:1577-1586.
19. Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1996; 78: 262-273.
20. Koumi S, Arentzen CE, Baker CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic K⁺ channel response to acetylcholine and to G protein-

mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994; 90: 2213-2224.

21. Li D, Melnyk P, Feng J, et al. The effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2001; 101:2631-2638.
22. Hobai IA, O'Rourke B. Enhanced Ca (2+)-activated Na(+)-Ca(2+) exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res* 2000; 87: 690-698.
23. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999; 100: 87-95.
24. Li D, Shinagawa K, Pang L, et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on the development of atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001; 104: 2608-2614.
25. Saoudi N, Poty H, Anselme F, Letac B. Réduction de la fibrillation auriculaire. Dans: Le Heusey J.-Y. La fibrillation auriculaire. Éds Louis Pariente, 1997 : 276-287.
26. Blanc J.-J, Mansourati J. Traitement anti-thrombotique au cours de la fibrillation auriculaire. Dans: Le Heusey J.-Y. La fibrillation auriculaire. Éds Louis Pariente, 1997 : 261-273.

27. Podrid PJ. Oral antiarrhythmic drugs used for atrial fibrillation : clinical pharmacology. Dans : Falk RH, Podrid PJ. Atrial fibrillation. Mechanisms and Management. Éds Raven Press, 1992 : 197-231.
28. Fuch T, Podrid PJ. Pharmacologic therapy for reversion of atrial fibrillation and maintenance of sinus rythm. Dans : Falk RH, Podrid PJ. Atrial fibrillation. Mechanisms and Management. Éds Raven Press, 1992 : 233-254.
29. Fareh S, Bénardeau A, Nattel S. Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 762-770.
30. Katz AM. Heart failure. Pathophysiology, molecular biology, and clinical management. Éds Lippincott Williams & Wilkins. 2000 381p.
31. Francis GS, Gassler JP, Sonnenblick EH. Pathophysiology and diagnosis of heart failure. Dans: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA. Hurst's The heart. Éds McGraw Hill 2001; volume 1: 655-681.
32. Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-472.

33. Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV, Kyriakis. Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circ Res* 1996; 78: 947-953.
34. Smith HJ, Nuttal A. Experimental models of heart failure. *Cardiovasc Res* 1985; 19: 181-186.
35. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 663-698.
36. Holtz J, Darmer D. Death receptors and their ligand. Dans: Schunkert H, Riegger GAJ. Apoptosis in cardiac biology. Éds Kluwer academic publishers. 2000 : 5-28.
37. Schlottmann K, Schölmerich J. Bcl-2 family members and mitochondria. Dans: Schunkert H, Riegger GAJ. Apoptosis in cardiac biology. Éds Kluwer academic publishers. 2000 : 72-90.
38. Rudel T. Caspase cascades and caspase targets. Dans: Schunkert H, Riegger GAJ. Apoptosis in cardiac biology. Éds Kluwer academic publishers. 2000 : 5-28.
39. Kasjura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab invest* 1996; 74: 86-107.
40. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, et al. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling

- method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1325-1331.
41. Yue TL, Wang C, Romanic AM, et al. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: a potential role of Caspase-3. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 495-507.
42. Li WG, Zaheer A, Coppey L, et al. Activation of JNK in the remote myocardium after large myocardial infarction in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 816-820.
43. Latif N, Khan M, Birks E, et al. Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *JACC* 2000; 35; 1769-1777.
44. Agnoletti L, Comini L, Gaia G, et al. Pro-inflammatory and pro-apoptotic factors in heart failure. Dans: Schunkert H, Riegger GAJ. Apoptosis in cardiac biology. Éds Kluwer academic publishers 2000 : 261-271.
45. Feuerstein GZ. New opportunities for heart disease therapeutics. Dans: Schunkert H, Riegger GAJ. Apoptosis in cardiac biology. Éds Kluwer academic publishers. 2000 : 299-308.
46. Adams JW, Sokota Y, Davis MG, et al. Enhanced G α signaling : a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 110140-10145.

47. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, et al. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997;96: 1180-1184.
48. Boydan PA, Hoffman BF. The effects on atrial electrophysiology and structure of surgically induced right atrial enlargement in dogs. *Circ Res* 1981; 49: 1319-1331.
49. Everett T, Li H, Mangrum M, et al. Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2000; 102: 1454-1460.
50. Paradis P, Dali-Yousef N, Paradis FW, et al. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *PNAS* 2000; 97: 931-936.
51. Smith JF, van Krimpen C, Schoemaker RG, et al. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 20: 772-778.
52. Prescott G, Silversides DW, Chiu SM, Reudelhuber TL. Contribution of circulating renin to local synthesis of angiotensin peptides in the heart. *Physiol Genomics* 2000; 4 : 67-73.

53. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, et al. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2001; 89: 279-86.
54. Nicholson DW, All A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
55. Haunstetter A. Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111-1129.
56. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ et al. Stimulation of stress-activated mitogen-activated protein kinase and c-jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1996; 79: 162-173.
57. Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem* 1999; 274: 6272-6279.
58. Ma X-L, Kumar S, Gao F, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1999; 99: 1685-1691.

59. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, et al. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2873-2892.
60. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension* 2000; 36: 330-336.
61. Studer R, Reinecke H, Muller B, et al. Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in failing human heart. *J Clin Invest* 1994; 94: 301-310.
62. Zisman LS, Abraham WT, Meixell GE, et al. Angiotensin II formation in the intact human heart. Predominance of the angiotensin-converting enzyme pathway. *J Clin Invest* 1995; 95: 1490-1498.
63. Malhotra R, Sadoshima J, Brosius FC 3rd, Izumo S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. *Circ Res* 1999; 85: 137-146.
64. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000; 36: 355-359.

65. Pombo CP, Bonventre JV, Avruch J, et al. The stress-activated protein kinase (SAPKs) are major c-Jun amino-terminal kinase activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 1994; 269: 26546-26551.
66. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372: 739-746.
67. Han J, Lee JD, Bibbs L, et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265: 808-811.
68. Galcheva-Gargova Z, Derijar B, Wu IH, et al. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 1994; 265: 806-808.
69. Rouse J, Cohen P, Trigon S, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78: 1027-1037.
70. Teiger E, Than VD, Richard L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97(12) : 2891-7.

71. Nickenig G, Harrison D.G. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. Part II: AT1 receptor regulation. *Circulation* 2002; 105: 530-536.
72. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2873-2892.
73. Damas JK, Gullestad L, Veland T, *et al.* Cxc-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure -possible role of platelets and monocytes. *Cardiovas Res* 2000; 45(2): 267-291.
74. Sasayama S, Okada M, Matsumori A. Chemokines and cardiovascular diseases. *Cardiovas Res* 2000; 45(2): 428-436.
75. Minden A, Lin A, Claret FX, *et al.* Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995; 81: 1147-1157.
76. Nobes CD, Hall A. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev.*1994; 4: 77-81.