

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Différences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire

Par  
Patricia Pelletier

Département de pharmacologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de M.Sc en pharmacologie

Août 2007

© Patricia Pelletier, 2007



## **Identification du Jury**

**Université de Montréal  
Faculté des études supérieures**

### **Ce mémoire intitulé :**

Différences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire

**Présenté par :  
Patricia Pelletier**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

Dr Denis Deblois  
(président rapporteur)

Dr Stanley Nattel  
(directeur de recherche)

Dr Eric Thorin  
(membre du jury)

## Résumé

L'IC cause un remodelage arythmogène dans l'oreillette et le ventricule et des différences ont déjà été observées à certains points spécifiques. Cette étude porte sur les différences auriculo-ventriculaires d'expression de gènes, à différents temps, dans l'IC. **Méthode:** Trois groupes de 5 chiens ont été soumis à une VTP (240 bpm) pendant 0h (contrôles), 24-h et 2 semaines. À la fin de l'étude, l'ARN des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires a été analysé par puces d'ADN (>22 000 transcrits), confirmé par PCR en temps réel et Western Blot (gènes sélectionnés). **Résultats :** L'oreillette démontre des changements dramatiques dans l'expression de gènes (1788 changés à 24-h et 2236 à 2-s). Ceux observés dans le ventricule sont plus limités (52 à 24-h et 130 à 2-s). Les gènes reliés à l'ECM, ADN/ARN, structure et mobilité cellulaire et coagulation/inflammation ont démontré des changements marqués dans l'oreillette alors que ceux observés dans le ventricule sont reliés au métabolisme et signalisation  $Ca^{2+}$ . D'importantes différences auriculo-ventriculaires ont été observées au niveau basal (743 gènes plus exprimés dans l'oreillette, 856 dans le ventricule). Ce modèle a changé avec le temps, soit 1173 gènes initialement différents dans l'oreillette vs ventricule devenant équivalents après 2-s VTP ; 576 gènes initialement équivalents devenant différents après 2-s : 399 deviennent plus forts et 177 moins forts dans l'oreillette. Les résultats de Western Blot et PCR confirment ceux des puces d'ADN. **Conclusion:** L'IC induit par VTP entraîne plus de changements d'expression de gènes dans l'oreillette que le ventricule *et al* tère les différences observées entre les deux chambres. Ces résultats sont révélateurs pour la compréhension et la prévention du remodelage arythmogène dans l'IC.

**Mots clés :** Insuffisance cardiaque, arythmie, oreillette, ventricule, expression, gènes, puces d'ADN, remodelage, fibrose, métabolisme.

## Abstract

Heart failure (HF) causes arrhythmogenic atrial and ventricular remodeling. We previously observed marked left atrial (LA)-ventricular (LV) differences at some specific points. This study assessed time dependent LA and LV gene expression changes in HF. **Methods:** Three groups of 5 dogs were submitted to ventricular tachypacing (VTP, 240 bpm) for 0 hrs (controls), 24 hrs or 2 wks. At end-study, RNA was extracted from LA and LV cardiomyocytes and analysed by canine-specific microarrays (>22,000 transcripts), confirmed by real-time RT-PCR and Western blot assessment of selected genes. **Results:** LA showed dramatic gene expression changes, with 1788 genes altered at 24-hr and 2236 at 2-wk VTP. LV gene changes were more limited, with 52 changed at 24 hrs and 130 at 2 wks. Particularly marked differences were seen in ECM genes; DNA/RNA genes; cell structure and mobility; and coagulation/inflammation. Changes in LV were genes involved in Ca<sup>2+</sup> signalling and metabolism. There was substantial atrial-ventricular differential gene expression at baseline (743 genes significantly more expressed in LA, 856 in LV). This pattern changed over time, with 1173 genes initially differential in LA vs. LV becoming equivalent at 2 wk VTP; and 576 genes initially equivalent becoming differential at 2 wk VTP: 399 becoming stronger and 177 weaker in LA. RT-PCR and Western blots confirmed microarray data. **Conclusions:** VTP-induced HF causes dramatically more gene expression changes in LA than LV and dynamically alters the LA-LV differential gene expression pattern. These results are relevant for understanding and preventing arrhythmogenic remodeling in HF.

**Key words:** Heart failure, arrhythmias, atrium, ventricle, microarray, gene expression, remodelling, fibrosis, metabolism.

## Table des matières

Identification du jury .....	ii
Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1. L'insuffisance cardiaque .....	1
1.1.1. Définition .....	1
1.1.2. Classification de l'insuffisance cardiaque.....	2
1.1.3. Incidence, pronostique et mortalité.....	5
1.2. L'arythmie et l'insuffisance cardiaque.....	7
1.2.1. Arythmies ventriculaires .....	7
1.2.2. Arythmies auriculaires .....	8
1.3. Différences auriculo-ventriculaires .....	10
1.3.1. Les protéines de transcription et le développement .....	13
1.3.2. Signalisation du Ca <sup>2+</sup> .....	15
1.3.3. Métabolisme.....	21
1.3.4. Mort cellulaire.....	26
1.3.5. Fibrose et matrice extracellulaire .....	27
1.3.6. Système rénine-angiotensine.....	34
1.4. Modèles animaux d'insuffisance cardiaque .....	36
1.5. Traitements thérapeutiques .....	38
2. Hypothèses et méthodologie .....	42
3. Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure .....	47
3.1. Abstract.....	48
3.2. Introduction.....	49
3.3. Materials and methods .....	50
3.3.1. Animal Model .....	50
3.3.2. RNA Extraction.....	51
3.3.3. Microarray Processing and Analysis.....	52
3.3.4. Real-Time RT-PCR.....	53
3.3.5. Western Blot Analysis .....	53
3.3.6. Statistics .....	53
3.4. Results.....	54
3.4.1. VTP-Induced Changes Relative to Sham.....	54
3.4.2. Evolution of LA-LV Expression Profile Differences.....	57
3.4.3. Real-Time PCR Results .....	58
3.4.4. Western-Blot Results .....	58
3.5. Discussion .....	59
3.5.1. LA-LV Gene-Expression Differences With and Without HF.....	59
3.5.2. Gene-Expression Changes in CHF and Differential Atrial-Ventricular Response.....	61
3.5.3. Extracellular Matrix Remodeling.....	62
3.5.4. Metabolism .....	63
3.5.5. Ca <sup>2+</sup> -Signaling.....	64
3.6. Potential Significance .....	64
3.7. Potential Limitations .....	65

3.8. Acknowledgments.....	66
3.9. References.....	67
4. Discussion.....	88
4.1 Relation avec les découvertes précédentes sur le remodelage auriculo-ventriculaire.....	88
4.2 Différence dans le remodelage de l'expression des gènes dans l'oreillette et le ventricule.....	91
4.3 Diminution dans le temps des différences entre l'expression auriculaire et ventriculaire.....	96
4.4 Importance de l'étude.....	98
4.5 Limitations potentielles.....	100
4.6 Recherches futures.....	104
5. Conclusion.....	108
Références.....	110
Accord des co-auteurs.....	118

**Liste des tableaux**

Tableau I. Liste de MMPs répertoriés chez l'humain et leurs substrats. ....	32
Tableau II: Drogues antiarythmiques, cibles et effets .....	40
Tableau III: Diverses comparaisons de l'expression des gènes faites dans le modèle canin d'IC par VTP .....	45
Table IV. Hemodynamic and Electrophysiological Changes .....	73
Table V. Comparison Between mRNA Expression by Microarray versus Taqman Real-time RT-PCR .....	74
Table VI. Comparison Between Microarray and Western Blot Results .....	77
Table VII. Gene specific primers and Taqman probes Sequences used in Real-time PCR analysis .....	84
Table VIII. List of Antibodies.....	85

## Liste des figures

Figure 1. Réseau de régulation de la transcription reliant le développement cardiaque et l'expression des gènes des chambres cardiaques .....	14
Figure 2. Signalisation du calcium dans le muscle cardiaque.....	18
Figure 3. Production et transport d'énergie dans le cardiomyocyte.....	24
Figure 4. Régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire.....	31
Figure 5. Overall mRNA expression-changes compared to sham at 24-h VTP in LA (A) and LV (B), and at 2-wk VTP in LA (C) and LV (D) samples .....	78
Figure 6. Total number of genes of each functional group for which mRNA was significantly. Down- or up-regulated by atrial-tachycardia remodelling (left) or ventricular-tachycardia remodelling (right) .....	79
Figure 7. Changes in mRNA expression in LA compared to LV in shams (A), 24-h VTP (B), and 2-wk VTP (C) samples .....	80
Figure 8. Total number of genes of each functional group for which levels were significantly different in atria versus ventricles in shams, 24h VTP or 2-wk VTP...	81
Figure 9. Correlation between expression changes by real-time PCR versus microarray or each samples, for each of 18 genes .....	82
Figure 10. Examples of Western blots for 8 proteins studied to compare protein versus mRNA expression changes .....	83
Figure 11. Vérification de la pureté des cardiomyocytes recueillis par isolation enzymatique.....	103

## Liste des abbréviations

Abbréviation	Nom complet
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AF	« Atrial fibrillation »
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
ANOVA	« Analysis of variance »
ANP	« atrial natriuretic peptide »
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1,2,3 et 4	Angiotensine 1, 2, 3 et 4
ATP	Adénosine triphosphate
BNP	« Brain natriuretic peptide »
C	Celsius
CaM	Calmoduline
CaMKII	Calmoduline Kinase II
CHF	« Congestive heart failure »
CK	Créatine kinase
CrP	Créatine phosphate
CRP1	« Cysteine-rich protein 1 »
DDR2	« Discoid domain receptor 2 »
Dkk3	« Dickkopf homolog 3 »
DVL1	« Dishevelled 1 »
ECG	Électrocardiogramme
ECM	« Extracellular matrix »
EDV	« End diastolic volume »
EGF	« endothelial growth factor »
ERK	« Extracellular signal-regulated kinase »
FA	Fibrillation auriculaire
FHL1	« Four and half LIM domains 1 »
FHL2	« Four and half LIM domains 2 »
FKBP12	« FK506 binding protein 12 »
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
h	Heure
HF	« Heart failure »
IC	Insuffisance cardiaque
JNK	« C-Jun N-terminal kinase »
Kg	Kilogramme
LA	« Left atrium »
LV	« Left ventricle »
Min	Minute
MLC	« Myosin light chain »

MMP	« Matrix Metalloprotease »
NAD	« Nicotinamide adenine dinucleotide »
Nm	Nanomètre
NO	Oxyde nitrique
OG	Oreillette gauche
PECAM	« Platelet/endothelial cell adhesion molecule »
P38	Protéine 38
P53	Protéine 53
PCR	« Polymerase chain reaction »
ProMMP	Pro matrix metalloprotease
PSGL	« P-selectin glycoprotein ligand-1 »
PVDF	« Polyvinylidène difluoride »
Rpm	Rotation par minute
RyR	Récepteur ryanodine
SAM	Significance analysis for microarrays
SEM	« Standard error of the mean »
SERCA	« Sarco/endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase »
SLIM1	« Skeletal muscle LIM protein 1 »
SR	Réticulum sarcoplasmique
TGF-β	« Transforming growth factor beta »
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
Tn	Troponin
TNF-alpha	« Tumor necrosis factor alpha »
VCAM	« Vascular cell adhesion molecule »
VG	Ventricule gauche
VTP	Tachystimulation ventriculaire

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Stanley Nattel, de m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Je le remercie de m'avoir confié ce projet, que j'ai trouvé fort intéressant, et je le remercie de la disponibilité et la compréhension dont il a fait preuve au cours des dernières années. Je tiens aussi à remercier Sophie Cardin. J'ai beaucoup apprécié ta compagnie tout au long de ces dernières années. Merci d'avoir pris le temps de me montrer le roulement et les techniques du laboratoire même si tu étais déjà fort occupée. Je tiens aussi à remercier Sabrina Le Bouter, Eric Libby et Dr Leon Glass pour leur précieuse collaboration. Un merci aux trois techniciennes, Chantal Maltais, Chantal St-Cyr et Nathalie l'Heureux, pour leur support technique et ces belles années passées en leur compagnie. Et finalement, les derniers mais non les moindres, un énorme merci à mon conjoint Sébastien et principalement à mes parents, Jacques et Claudelle, qui m'ont supporté à tous les niveaux tout au long de mes études. Ce que vous avez fait pour moi a est très apprécié et je ne vous remercierai jamais assez.

## 1.

## Introduction

### *1.1. L'insuffisance cardiaque*

#### *1.1.1. Définition*

Depuis plusieurs années, le fonctionnement du cœur a été défini, de manière très générale, comme étant une pompe permettant la circulation du sang à travers le système vasculaire. Il permet ainsi de procurer les nutriments et l'oxygène nécessaire au bon fonctionnement des organes et de vidanger les déchets et le dioxyde de carbone. Puisqu'il s'agit d'un syndrome et non d'une maladie, l'insuffisance cardiaque est un terme général qui englobe plusieurs étiologies, mécanismes pathophysiologiques et présentations cliniques qui entraînent une incapacité du cœur à effectuer efficacement cette fonction de pompe et dont le cœur est la première cause.<sup>2-3-4</sup> Il en résulte une déficience à rencontrer les besoins métaboliques du corps.

La conceptualisation de la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque ne cesse d'évoluer. Cette pathologie était autrefois considérée comme un simple problème dû au dysfonctionnement du ventricule gauche mais les recherches au cours des dernières décennies ont permis de constater qu'il s'agissait en fait d'un syndrome clinique d'une complexité très élevée.<sup>1-2</sup> L'insuffisance cardiaque est en fait un syndrome qui peut être causé par une multitude de facteurs étiologiques tel que l'infarctus du myocarde, l'inflammation du myocarde, des mutations génétiques entraînant une contractilité cardiaque anormale, des valvulopathies cardiaques, l'hypertension, des arythmies auriculaires et/ou ventriculaires et bien d'autres.<sup>2-4</sup>

Toutes ces pathologies agissent dans le développement de l'insuffisance cardiaque et causent un remodelage ventriculaire important entraînant tout d'abord une hypertrophie compensatoire et une dilatation des chambres causant une perte de force de contraction considérable et diminuant la fraction d'éjection. De plus, tous ces syndromes entraînent le développement de cercles vicieux ce qui fait en sorte que l'insuffisance cardiaque entraîne plus d'insuffisance cardiaque.

L'insuffisance cardiaque congestive constitue une congestion circulatoire qui survient en réponse à l'insuffisance cardiaque et à d'autres changements dans la circulation périphérique, accompagné de l'activation du système nerveux sympathique et du système rénine-angiotensine. Ce syndrome s'accompagne généralement de signes cliniques tels que la dyspnée, une grande fatigue, la tachycardie, l'œdème pulmonaire et bien d'autres. <sup>4</sup>

### *1.1.2. Classification de l'insuffisance cardiaque*

La « New York Heart Association » a divisé l'insuffisance cardiaque en quatre grandes classes selon son niveau de gravité. La classe 1 correspond aux patients atteints de maladies cardiaques mais qui n'entraînent pas de limitation de leurs activités physiques. La classe 2 englobe les patients dont l'activité physique est légèrement limitée par la maladie cardiaque. La classe 3 comprend les patients faisant preuve d'une limitation marquée alors que la classe 4 est caractérisée par une incapacité à effectuer n'importe quelle activité physique, même très simple, sans inconfort. À ce stade, les symptômes de l'insuffisance cardiaque peuvent être présents

même au repos.<sup>2-3</sup> Il existe de plus plusieurs types d'insuffisances cardiaques dont trois catégories principales : la dysfonction systolique et diastolique, l'insuffisance gauche et l'insuffisance droite ainsi que le « backward » et le « forward heart failure ».

#### *1.1.2.1. « Backward » et « forward heart failure »*

Tout système de pompe déficient peut faillir de deux manières : soit par un remplissage inadéquat, soit par une éjection réduite. Deux théories ont été établies. Le « backward heart failure » survient lorsque le ventricule est incapable de décharger complètement son contenu augmentant le volume de fin de diastole. Habituellement, le volume de fin de diastole augmente ainsi que la pression, suivi d'une augmentation de la pression dans l'oreillette du côté défaillant. Par la suite, l'oreillette se contracte plus vigoureusement et la pression veineuse et dans les lits capillaires augmente, entraînant une transudation des fluides des capillaires vers l'espace interstitiel au niveau des poumons, du foie, des tissus sous-cutanés et autres. Selon l'hypothèse du « backward heart failure », l'élévation du volume de fin de diastole dans le ventricule gauche entraînerait une augmentation de la pression dans l'oreillette gauche puis dans les veines pulmonaires et ainsi une transmission de cette pression dans la circulation des artères pulmonaires menant à l'hypertension pulmonaire et à une insuffisance du côté cardiaque droit. Une autre hypothèse a ensuite été proposée, la « forward heart failure » qui est reliée à une incapacité à délivrer efficacement le sang dans le système veineux. Les principales manifestations cliniques reliés à cette hypothèse seraient une diminution de la perfusion des organes vitaux tel que le cerveau, les muscles

squelettiques et les reins menant ainsi à une confusion, à une faiblesse musculaire et à la rétention d'eau et de sodium, augmentant le volume sanguin et entraînant ainsi une surcharge au niveau de l'autre côté du cœur.<sup>2-20</sup>

#### *1.1.2.2. Dysfonction systolique et diastolique*

Dans l'insuffisance ventriculaire, une distinction se fait au niveau de la dysfonction systolique et diastolique relatant davantage l'architecture ventriculaire que l'hémodynamie systémique. Ces deux pathologies coexistent souvent chez un même patient. La dysfonction systolique décrit un ventricule large et dilaté dont le débit est limité par une diminution de l'éjection. Elle présente souvent une augmentation du volume de fin de diastole (« end-diastolic volume », EDV), une augmentation de la pression en fin de diastole et un « stroke volume » normal ou légèrement réduit. La dysfonction diastolique représente un ventricule présentant souvent une hypertrophie concentrique, dont la cavité est très petite ou normale mais dont le remplissage est limité. La dysfonction diastolique survient dans 40% des cas d'insuffisance cardiaque et englobe les patients dont la fonction systolique est normale. Cette dysfonction accompagne souvent des maladies mal contrôlées tel que l'hypertension. Les facteurs contribuant à l'altération de la fonction diastolique sont l'hypertrophie, la fibrose, l'ischémie et la surcharge. Les gens atteints de dysfonction diastolique présentent un risque de mortalité moins élevé.<sup>2-4-20</sup>

### *1.1.2.3. Insuffisance cardiaque gauche et droite*

L'insuffisance cardiaque gauche et droite est directement en lien avec le côté le plus affecté du cœur. Puisque les deux côtés du cœur font parti du circuit sanguin, il est évident que l'un des côtés ne peut pas pomper significativement plus de sang que l'autre côté. Une insuffisance au niveau du ventricule gauche entraîne à la fois un engorgement du ventricule droit, dû à l'augmentation de la pression sanguine pulmonaire mais peut aussi affecter le côté droit du cœur via la pression exercée sur le septum, particulièrement si le péricarde est intact. En clinique, l'insuffisance gauche fait référence à des symptômes et des signes de pression élevée et de congestion au niveau des veines et des capillaires pulmonaires. L'insuffisance droite, quant à elle, est utilisée dans les cas présentant une pression élevée et une congestion au niveau des veines et des capillaires systémiques. <sup>2-3-4-20</sup>

### *1.1.3. Incidence, pronostique et mortalité*

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des plus fréquentes catégories de maladies présentes au sein de la population mondiale. Aux États-Unis, près de 80 millions d'adultes (1 sur 3) sont atteints d'une des différentes formes de maladies cardiovasculaires et près de 900 000 personnes en meurent chaque année. En fait, selon les données des 40 dernières années, une personne sur 5 a des chances de développer le syndrome de l'insuffisance cardiaque au cours de sa vie. Ces chances doublent chez les personnes atteintes d'hypertension artérielle.

L'insuffisance cardiaque est un problème majeur de santé public qui touche à elle seule plus de 5,2 millions de personnes aux États-Unis.<sup>2</sup> L'incidence de cette maladie varie de 1 à 5 cas par 1000 personnes par année (dont 75% présentent de l'hypertension) et augmente de façon considérable avec l'âge pour atteindre 40 cas par 1000 personnes par année chez les gens âgés de plus de 75 ans.<sup>4-5</sup>

L'insuffisance cardiaque est une maladie chronique qui peut évoluer sur plusieurs années à partir d'un stade léger vers un stade sévère. Comme la plupart des maladies cardiovasculaires, les hommes de moins de 75 ans sont plus susceptibles d'en être atteints que les femmes alors qu'à partir de 75 ans et plus, ce sont les femmes qui en sont le plus atteintes.

Entre 1994 et 2004, le taux de mortalité dû à l'insuffisance cardiaque a augmenté de 28%.<sup>6</sup> Le taux d'hospitalisation pour l'insuffisance cardiaque a lui aussi augmenté au cours des dernières années se situant à environ 600 000 par année, soit le double de l'ensemble des autres maladies cardiovasculaires. En fait, le taux d'hospitalisation a augmenté de 159% aux États-Unis entre 1993 et 2003. L'insuffisance cardiaque constitue la cause la plus fréquente d'hospitalisation des gens de plus de 65 ans aux États-Unis. Cela engendre des coûts de soins de santé énormes dans ce pays approchant les 38 billions de dollars US annuellement.<sup>4</sup> Malgré les avancements intéressants en recherche effectués au cours des dernières années, l'incidence de l'insuffisance cardiaque ne cesse d'augmenter au Canada. Cela est en partie dû au vieillissement de la population et à l'augmentation de l'incidence de maladies

directement liées à l'IC tel que le diabète, l'hypertension et l'athérosclérose. De plus, l'augmentation de l'incidence de l'IC coïncide avec la diminution du pourcentage de mortalité chez les patients ayant subi un infarctus. Bien que la médecine aie progressé et est maintenant plus en mesure de sauver les patients d'une crise cardiaque, les dommages engendrés au myocarde demeurent et peuvent mener à long terme au développement d'insuffisance cardiaque.

L'insuffisance cardiaque fait parti des maladies présentant une espérance de vie considérablement écourtée. Chez les personnes atteintes d'insuffisance cardiaque, 20% des personnes mourront dans la première année, 80% des hommes et 70% des femmes décèderons dans les 8 années suivant le diagnostic et seulement 15% des femmes survivent plus de 12 ans.<sup>6</sup>

## ***1.2. L'arythmie et l'insuffisance cardiaque***

### ***1.2.1. Arythmies ventriculaires***

Les arythmies ventriculaires sont généralement divisées en deux classes soit la bradycardie, où le cœur bat trop lentement (généralement moins de 50 battements par minute) et son opposé, la tachycardie. La tachycardie peut être causée par deux types importants de dysfonction soit la première où le cœur bat trop rapidement pour permettre au cœur de pomper le sang normalement, ce qu'on appelle la tachycardie ventriculaire. Cette vitesse élevée de battements, lorsque retrouvée seulement au niveau du ventricule, vient du ventricule lui-même. Cette arythmie, causant un trouble de l'éjection du sang, est promoteur de l'insuffisance cardiaque. La seconde

dysfonction est caractérisée par une dépolarisation des cardiomyocytes se faisant de manière désorganisée et empêchant la contraction significative du ventricule, ce qu'on appelle la fibrillation ventriculaire. Cette perte de contraction significative entraîne la mort à moins d'être arrêtée immédiatement.<sup>2-3-4-20</sup>

### 1.2.2. *Arythmies auriculaires*

L'insuffisance cardiaque est l'une des causes cliniques les plus communes de fibrillation auriculaire (FA), l'arythmie cardiaque soutenue la plus commune. La FA se caractérise par un battement très rapide de l'oreillette, soit généralement plus de 400 battements par minutes chez l'humain. Elle s'accompagne aussi d'activations irrégulières de l'oreillette et un manque de répétitivité du tracé de l'activité de l'oreillette sur électrocardiogramme (ECG). Étant incapable de se remplir et/ou se vider correctement, l'oreillette peut subir un important remodelage dû à une augmentation du stress sur la paroi et une perte de contractilité contrôlée. De plus, la fibrillation auriculaire peut être associée à de nombreuses complications sévères telles que des thromboembolies causées par le sang qui ne circule pas suffisamment au niveau de l'oreillette. Parmi les complications possibles, on retrouve aussi des palpitations, des douleurs à la poitrine et un souffle coupé. En plus de causer des problèmes auriculaires, la FA cause des problèmes au niveau du ventricule entre autre en empêchant le remplissage adéquat du ventricule dû à son désajustement dans la vitesse et les temps de battements cardiaques, ce qui entraîne aussi un manque au

niveau métabolique dans tout l'organisme vers lequel le sang est normalement pompé par le ventricule. Ces facteurs pouvant eux même causer l'insuffisance cardiaque, on peut donc dire que l'insuffisance cardiaque peut causer la fibrillation auriculaire qui peut à son tour causer l'insuffisance cardiaque. La fibrillation auriculaire serait d'ailleurs l'une des principales causes du passage de l'insuffisance cardiaque asymptomatique vers une symptomatique.<sup>2-3-4-20</sup>

Une étude de Li *et al* a démontré la première évidence que l'insuffisance cardiaque dans un modèle canin induit par tachystimulation ventriculaire (VTP) produit de la fibrose interstitielle au niveau de l'oreillette, ce qui produit un bris de conduction et augmente la vulnérabilité à fibrillation auriculaire.<sup>49</sup> En fait, les patients atteints d'insuffisance cardiaque ont six fois plus de chance de développer de la FA par rapport aux autres, ce qui serait entre autre dû au développement de fibrose interstitielle. La prévalence de la fibrillation auriculaire augmente avec le niveau de progression de l'insuffisance cardiaque. Plusieurs études ont démontré que les patients étant atteints d'insuffisance cardiaque sans fibrillation auriculaire auraient un meilleur pronostique que ceux qui souffraient d'insuffisance cardiaque et de FA. L'étude du remodelage physiologique et structurel de l'oreillette dans le cas des deux pathologies, l'IC et la FA, démontre un développement important de fibrose, d'activation neurohormonale, d'apoptose et de remodelage structurel important dans les deux cas. Cependant, certaines études ont démontré que contrairement à l'insuffisance cardiaque, la fibrillation auriculaire serait très souvent réversible.<sup>44</sup>

### ***1.3. Différences auriculo-ventriculaires***

Bien qu'ils fassent tous deux partie d'un seul et même muscle, le cœur, les oreillettes et les ventricules présentent un développement, une structure et une physiologie très différente. Le développement du cœur provient en fait d'une feuille du mésoderme spécifique pour le développement cardiaque qui formera un tube linéaire. Chez la souris, c'est après 8 jours de développement que les ventricules et les oreillettes commencent à se distinguer. La paroi de l'oreillette demeure mince, recevant le retour veineux, alors que le ventricule commence à s'épaissir par hyperplasie et hypertrophie, pour pomper le sang vers les artères.<sup>7-8</sup> De plus, chacune de ses chambres sont composées de cellules avec des caractéristiques structurelles, fonctionnelles, métaboliques et électrophysiologique uniques. Au cours des dernières années, plusieurs études ont été faites pour déterminer les différences entre les oreillettes et les ventricules sains, autant chez les animaux que chez l'humain. Outre les différences d'expression de l'ANF et du BNP<sup>81</sup> qui étaient bien connus, une multitude de différences ont été découvertes au niveau de l'expression des gènes dans l'oreillette et le ventricule sains.

L'expression de gènes spécifiques à chaque chambre est critique pour le développement normal et la fonction du muscle cardiaque. Tabibiazar *et al* ont démontré, en étudiant son profil transcriptionnel chez la souris, que le cœur présente un motif d'expression des gènes qui est spécifique à chacune des chambres. Selon leur étude, plus de 2460 gènes présentent un niveau d'expression plus élevé dans l'oreillette alors que 2970 le sont dans le ventricule. Parmi ceux davantage exprimés

dans l'oreillette figurent des gènes encodant pour ; des gènes cytosquelettiques tel que la myosin light chain spécifiques aux oreillettes (Myla, MLC 1a), la régulatrice A (MLC 2a); des protéines reliées à l'actine; des facteurs de transcription tel que les « LIM proteins », des protéines riches en cystéine, et la protéine « dickkopf homolog 3 »; des molécules de la matrice extracellulaire tel que VCAM et « EGF containing tubulin »; des protéines reliées à la croissance tel que la cyclin 1, l' «insulin-like growth factor binding protein 6 », les protéines d'arrêt de croissance 1 et 6; ainsi que plusieurs ESTs et autres gènes non caractérisés.<sup>9</sup>

Au niveau des ventricules, les gènes présentant une expression plus forte que dans les oreillettes sont des représentants de catégories similaires à ceux des oreillettes. Il s'agit en fait des gènes tel que la myosine ventriculaire Myosin light chain-1V et la myosin light chain, plusieurs tropomyosines, des isoformes de l'actine et de la myosine incluant l'alpha-actin cardiaque, la myosine Ib et X. De plus, plusieurs gènes spécifiques aux myocytes sont plus exprimés dans les oreillettes que dans les ventricules tels que des protéines contenant des domaines LIM comme la Elfin et la « four and half Lim domain 2 ». Des différences ont aussi été remarquées au niveau de gènes impliqués dans le transport du sodium et du potassium (Na/K ATPases), dans le métabolisme du calcium (SERCAs), dans le métabolisme énergétique et plusieurs protéines de la matrice.<sup>9-17</sup>

Une étude effectuée par Tsubakihara *et al* a démontré des résultats semblables chez l'humain. Bien que le pourcentage de gènes différemment exprimés soit nettement

inférieur (1% seulement), plusieurs gènes aussi démontrés dans d'autres études ont été relevés tel que des gènes encodant pour la régulation intracellulaire du calcium, pour la production d'énergie, pour la transcription et la traduction ainsi que des protéines du cytosquelette comptant parmi les 38 protéines dénombrées. De plus, les mêmes isoformes de myosine, soit MLC-2a, MLC-1a et MLC-2 (20kDa) ont démontré un plus haut taux d'expression dans l'oreillette alors que les isoformes MLC-1v et MLC-2-cardiac slow l'étaient davantage au niveau des ventricules. Ces résultats ont aussi été confirmés en grande partie par une étude de Zhao *et al* lors de l'analyse génomique de l'oreillette et du ventricule.<sup>10-17</sup>

L'étude de Barth *et al* a présenté des résultats bien différents chez l'humain de ceux de Tsubakihara au niveau quantitatif. Cette étude a comparé, par puces d'ADN, l'expression des gènes de l'oreillette droite et du ventricule gauche. En effet, sur 11 740 gènes détectés, 6274 (53%) ont présenté une différence de niveau d'expression dans l'oreillette par rapport au ventricule. Plus précisément, 3300 étaient plus exprimés dans l'oreillette et 2974 dans le ventricule. Selon cette étude, les gènes reliés aux transcrits mitochondriaux et ribosomaux ainsi que les membres des familles des protéasomes et des cytochromes sont plus exprimés dans les ventricules alors que ceux reliés à l'appareil de Golgi et aux vacuoles le sont davantage dans les oreillettes.<sup>16</sup> Cette étude a aussi confirmé en bonne partie les résultats obtenus par Tabibiazar.<sup>9-16</sup>

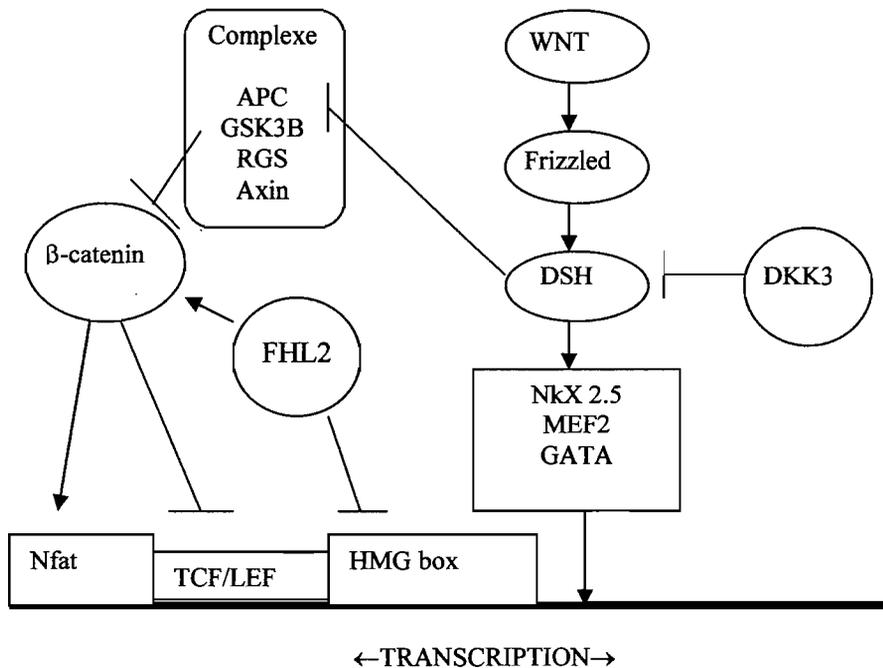
### 1.3.1. Les protéines de transcription et le développement

Les différences dans l'expression des gènes, régulées par des facteurs de transcriptions développementaux, sont importantes pour le mouvement cellulaire et la réponse locale aux signaux d'induction. D'importantes découvertes ont été faites ces dernières années et ont permis de documenter l'expression de facteurs de développement critiques dans le tissu cardiaque humain. Par les découvertes faites lors de l'étude du profil transcriptionnel du cœur sain, Tabibiazar *et al* ont pu faire d'importants liens entre les facteurs de transcription régulant le développement spécifique des différentes chambres et la définition des aspects contractiles et de l'appareil cytosquelettique, de la fonction des canaux ioniques, du métabolisme énergétique et des propriétés électrophysiologiques. Ils ont donc proposé un paradigme de réseaux de régulation de la transcription qui maintiendrait les propriétés spécifiques à chacune des chambres cardiaques. Ils suggèrent entre autre un important rôle de la protéine Dkk3, un antagoniste de la signalisation wnt, qui est fortement présente dans l'oreillette alors qu'elle est très peu exprimée dans le ventricule, ce qui suggère qu'elle jouerait non seulement un rôle important dans le développement mais aussi dans le maintien de certaines fonctions cardiaque spécifiques aux oreillettes, qui ne sont pas retrouvées dans les ventricules.

Contrairement à ce qui est retrouvé dans l'oreillette, la voie de signalisation wnt serait activée dans le ventricule par de hauts niveaux de Dvl1, ce qui permet de croire que la voie wnt aurait aussi un rôle important dans le maintien des fonctions spécifiques du ventricule. Les médiateurs de la voie wnt agissant très souvent en combinaison avec

d'autres voies de signalisation tel que les protéines LIM (incluant les protéines CIPHER, MLP, FHL2, Elfin et CRP1 et 2) et le profil unique d'expression selon les chambres de protéines LIM et de protéines qui y sont reliées renforcent aussi la théorie mettant en évidence l'importance du rôle de la modulation des facteurs de transcription dans le maintien des propriétés spécifiques et distinctes des oreillettes et des ventricules.<sup>9-16</sup>

De manière similaire, Barth *et al* ont découvert que plusieurs gènes de la voie WNT, incluant « dishevelled 1 »(DVL1) et la « four-and-half LIM domains 2 » (FHL2) étaient principalement exprimés dans les ventricules alors que les inhibiteurs de cette même voie, tel que dickkopf-2 et 3 (DKK2 et DKK3), étaient prédominants dans les oreillettes.<sup>16</sup> Tel que suggéré par Tabibiazar *et al* , la voie de signalisation WNT serait opposée par DKK3 dans l'oreillette alors qu'elle ne trouverait aucune opposition et serait même stimulée dans le ventricule par DVL1.<sup>9-16</sup> Par contre, la majorité des facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque ne montrent pas d'expression spécifique pour l'une ou l'autre des chambres.<sup>17-18</sup>



**Figure 1. Réseau de régulation de la transcription reliant le développement cardiaque et l'expression des gènes des chambres cardiaques** proposé par Tabibiazar *et al.*

### 1.3.2. Signalisation du $Ca^{2+}$

Le calcium joue un rôle crucial dans la régulation du processus de contraction-relaxation du muscle cardiaque. Les détails de l'association du flux d'ions calciques à la contraction musculaire ne sont pas encore parfaitement connus mais voici les découvertes et hypothèses bien acceptées à ce jour. <sup>2</sup>

Une petite quantité d'ions calciques pénètrent et quittent le cardiomyocyte durant chaque cycle cardiaque alors qu'une beaucoup plus grande quantité entre et sort du

réticulum sarcoplasmique (SR) dans la cellule. Chaque vague de dépolarisation traverse les tubules T et ouvre les canaux calciques de type L (L-type calcium channels) qui se situent près de la citerne terminale du SR. Près de ce même endroit sur le SR se retrouvent les récepteurs ryanodine (RyR) qui font un lien entre le SR et les tubules T et forment un macrocomplexe de quatre RyR appelé “pied”, qui constitue un canal calcique simple. Lors de la dépolarisation, les canaux calciques de type L sont activés et s’ouvrent pour permettre l’entrée de calcium qui ira se lier aux RyR. Cette liaison entraînera un changement conformationnel qui permettra l’ouverture du canal calcique formé par les RyR et entraînera le relâchement de calcium à partir du SR.

La triadine est une protéine transmembranaire majeure dans le SR qui forme un complexe quaternaire avec les récepteurs ryanodine, la junctin et la calsequestrin, protéine qui lie le  $\text{Ca}^{2+}$  entreposé dans le SR. <sup>13</sup> La triadine est responsable de l’arrimage de la calsequestrin au SR permettant le couplage fonctionnel avec le récepteur ryanodine. Une altération de l’affinité du complexe troponin (Tn) (Tn-I, Tn-C, Tn-T) pour le  $\text{Ca}^{2+}$  contrôle aussi la réponse contractile du muscle cardiaque. Une augmentation dans l’affinité du calcium augmente la tension développée durant la systole ce qui entraîne une difficulté pour le cœur de relaxer et vice versa. TN-I régule les interactions entre l’actin et la myosin, TN-C possède 2 sites de liaison pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et TN-T se lie au complexe Tn à la tropomyosine.

Les  $\text{Ca}^{2+}$  entrent dans le SR par l'activité de pompes calciques appelées SERCA.

Plusieurs isoformes de cette protéine existent mais la forme dominante dans le cœur est la SERCA2a. Cette pompe ATPase transporte deux ions calciques par molécule d'ATP hydrolysée et permettra l'accumulation de calcium dans le SR.

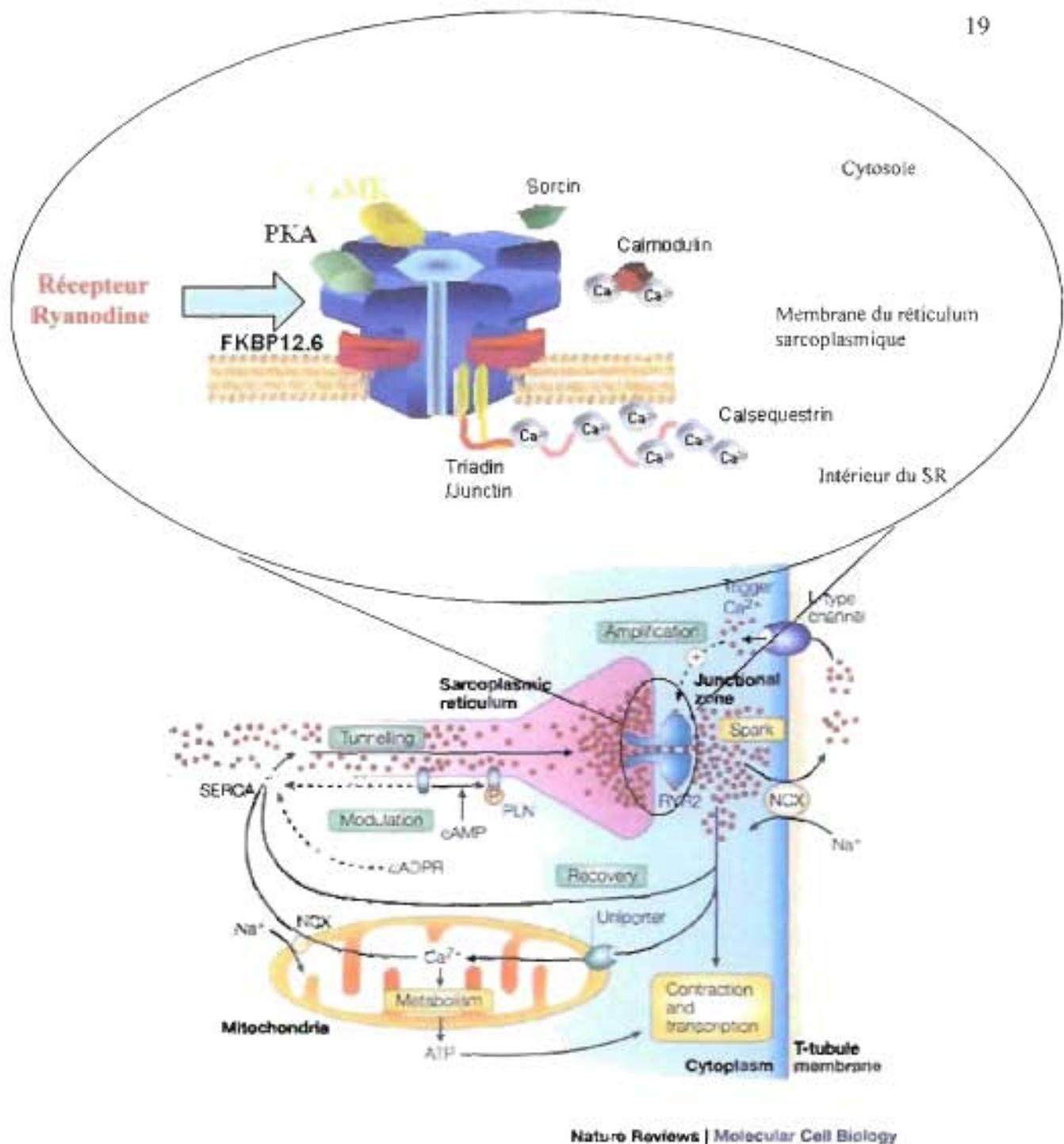
Phospholamban agit comme un inhibiteur de SERCA. Sous sa forme déphosphorylée, il inhibe l'activité de SERCA par sa charge positive alors que sous sa forme phosphorylée, l'inhibition du canal est levée. Deux protéines majeures sont impliquées dans la phosphorylation de phospholamban, soit PKA en réponse à la stimulation bêta-adrénergique et l'AMP cyclique (AMPc) et l'autre par la calmoduline et sa liaison au calcium. Ces deux protéines kinases ont deux sites distincts de phosphorylation sur phospholamban et leur effet est additif bien que la phosphorylation par PKA demeure la forme d'activation principale. Ainsi, une augmentation de la vitesse d'entrée du calcium dans le SR augmente la rapidité de la relaxation musculaire. <sup>2-10-11-12</sup>

L'étude de Tsubakihara *et al* a démontré que le niveau d'expression de SERCA était près de deux fois plus élevé dans les oreillettes que dans les ventricules alors que phospholamban, Tn-T, la calsequestrin et la triadine présentaient un niveau d'expression moins élevé dans le ventricule. Des résultats similaires ont aussi été obtenus chez la souris et le rat dans d'autres études. <sup>14-15</sup>

Le calcium entré dans le SR est entreposé jusqu'à la prochaine relâche. Deux protéines de stockage hautement chargées, la calsequestrin (dans le SR longitudinal)

et la calréticuline (dans le SR jonctionnel), se trouvent dans une partie du SR près des tubules T. Le calcium stocké qui se lie à ces protéines demeure disponible pour la prochaine décharge à travers les canaux de relâche de calcium (RyR). Certaines études suggèrent que la calséquestrin ainsi que deux protéines membranaires, la triadine et la junctin, aideraient à réguler l'activité des RyR.<sup>2-10-11-12</sup>

Pour balancer l'entrée de calcium qui survient dans les cellules cardiaques à chaque dépolarisation, une quantité similaire de calcium quitte la cellule par l'un des deux procédés suivants. 1) Par les pompes Ca/Na ATPases, chaque molécule de calcium est échangée contre 3 molécules de sodium ou 2) par la pompe Ca-ATPase du sarcolemme qui peut transférer le calcium contre un gradient de concentration. Les pompes Ca/Na ATPases échangent le calcium selon le potentiel membranaire et la concentration de sodium et de calcium des deux côtés du sarcolemme pour rétablir l'équilibre.<sup>2</sup>



**Figure 2. Signalisation du calcium dans le muscle cardiaque.** Les tubules T et les canaux calciques de type L répondent à la dépolarisation en faisant entrer une petite quantité de Ca<sup>2+</sup> qui ira activer les RyR et permettre la relâche de Ca<sup>2+</sup> du SR entraînant la contraction musculaire. Le Ca<sup>2+</sup> sera ensuite repris par les pompes SERCA et retourné vers le SR où il sera stocké en attendant une prochaine contraction. Figure adaptée de Berridge *et al.*<sup>88</sup>

Dans l'insuffisance cardiaque, l'altération du couplage d'excitation-contraction joue un rôle très important. Il est maintenant prouvé qu'un déséquilibre dans la signalisation du calcium perturbe la fonction contractile du myocarde. L'une des conséquences d'une anomalie dans la signalisation du calcium est la relation force-fréquence. Dans le cœur normal, la force de contraction et le niveau de tension développé augmentent selon la fréquence de stimulation. Dans le cœur insuffisant, on peut observer une diminution de l'activité de la pompe SERCA (Ca/ATPase) responsable de la réentrée du calcium dans le SR. Le cycle d'entrée et de sortie du calcium du SR vers le cytoplasme est donc perturbé et cela entraîne une importante diminution de la réponse force-fréquence. Puisque l'activité des pompes SERCA est elle-même modulée par plusieurs protéines, on se doute que des altérations dans l'expression ou l'activité de ces protéines peuvent elles aussi être affectées. Ainsi, certaines études ont prouvé que le niveau d'expression et de phosphorylation de phospholamban étaient diminués dans certains cas d'insuffisance cardiaque. Le nombre de RyR, constituant les canaux de relâche calcique, présente des niveaux d'expression inférieurs à la normale dans certains cas d'insuffisance cardiaque alors qu'on observe aussi une hyperphosphorylation de la protéine kinase A, responsable de la phosphorylation des RyR, ce qui entraîne une fuite importante de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du SR vers le cytoplasme. Cette fuite réduirait le niveau sarcoplasmique de calcium, le réentrée de calcium ainsi que la relâche de calcium vers le cytoplasme. À l'opposé, certaines études ont démontré une augmentation du niveau d'ARNm et de protéines d'échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . On croit que cela pourrait être un effet compensatoire de la diminution du niveau de SERCA afin de permettre la sortie du calcium du

cytoplasme. Pour ce qui est des protéines de stockage de calcium tel que la calsequestrin, plusieurs études ont démontré que leur niveau n'était pas modifié dans les cas d'insuffisance cardiaque.<sup>2-10-11-12</sup>

D'importantes différences dans l'expression de protéines reliées à la signalisation ont été notées dans l'oreillette et le ventricule. Entre autre, il a été suggéré que la durée de la contraction serait plus courte dans l'oreillette versus le ventricule. Cela serait dû à l'effet combiné d'un niveau plus bas de phospholamban et plus haut de SERCA dans l'oreillette que dans le ventricule. Un ratio plus bas de phospholamban / SERCA mène à une diminution de l'inhibition de SERCA et augmente la prise de calcium accélérant ainsi le phénomène de relaxation-contraction dans l'oreillette par rapport au ventricule.<sup>17-76</sup> D'autres protéines telles que la calsequestrin et certains RyR semblent être exprimés de manière équivalente dans les deux chambres et leur expression ne serait pas modulée par le développement de fibrillation auriculaire.<sup>75</sup> Par contre, la présence de FA a été associée avec certains changements dont entre autre la diminution de pompes  $Ca^{2+}$ /ATPase du réticulum sarcoplasmique et de canaux calciques de type L qui pourraient jouer un rôle important dans la perturbation du cycle calcique dans la FA.<sup>48-77-78-79</sup>

### 1.3.3. Métabolisme

La multitude de classes fonctionnelles exprimées différemment dans les oreillettes et les ventricules procurent les bases pour la spécialisation physiologique des différentes

régions cardiaques au niveau transcriptionnel, relatant les capacités fonctionnelles à exprimer différemment des classes de gènes.<sup>16</sup>

Le cœur est un organe aérobique ayant de grands besoins énergétiques. L'énergie est nécessaire pour la contraction myofibrillaire et pour la relaxation, pour la réentrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le SR et pour la restauration de la concentration des ions. Dans l'insuffisance cardiaque, le lactate est une source plus importante pour la génération d'énergie que dans le cœur normal.<sup>21</sup> Plusieurs études se contredisent sur le fait que la phosphorylation oxydative mitochondriale est modifiée ou non dans le cœur insuffisant. Bien qu'une altération de la chaîne oxydative ne soit pas automatiquement retrouvée dans tous les modèles d'insuffisance cardiaque, on sait par contre que défaillance du métabolisme cardiaque entraîne le développement d'insuffisance cardiaque en diminuant la force d'éjection du ventricule. Au centre de cette dysfonction se retrouve l'incapacité de la mitochondrie à subvenir aux besoins énergétiques du cardiomyocyte. La production d'ATP par la mitochondrie est en fait utilisée à 75% pour la contraction musculaire et à 25% pour le maintien de l'homéostasie ionique. Bien qu'on comprenne relativement bien l'utilisation de l'ATP par la cellule, les mécanismes menant à une dysfonction de la chaîne respiratoire sont encore mal connus.<sup>2-3-4</sup>

Les cytochromes situés dans la membrane mitochondriale interne sont des constituants de la chaîne respiratoire qui couplent l'oxydation à la synthèse d'énergie chimique. Il a été reporté que dans des cas de cardiomyopathie dilatées, le niveau de

cytochrome a était diminué alors quand dans des mitochondries de cœurs insuffisants, on observe une diminution de la consommation d'oxygène durant la phosphorylation active et un taux réduit d'activité respiratoire liée à la nicotinamide adénine di nucléotide réductrice (NADH).<sup>22-23-24</sup> Ces observations jumelées à d'autres soulèvent l'hypothèse que l'insuffisance cardiaque pourrait être due à une incapacité de la phosphorylation oxydative à subvenir aux besoins en énergie de la contraction musculaire. Katz a proposé que les anomalies mitochondriales pourraient être dues à des dommages structuraux et résulter en une diminution de la disponibilité de phosphates riches en énergie, contribuant ainsi au développement d'insuffisance cardiaque.

Dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque, le niveau d'ATP et le niveau total d'adénine nucléotides (ATP, ADP, AMP), de créatine kinase et la concentration de créatine phosphate ainsi que le ratio CrP/ATP est nettement diminué. D'un autre côté, le ratio ATP/AMP, et ATP/ADP sont maintenus pendant que la quantité totale d'AxP est maintenue. La synthèse et l'utilisation d'ATP sont toutes les deux diminués. Ces observations permettent de croire que l'insuffisance cardiaque pourrait être causée par une diminution des réserves d'énergie ou du moins une diminution que la diminution des réserves d'énergie contribue au développement d'IC.<sup>2-21</sup>

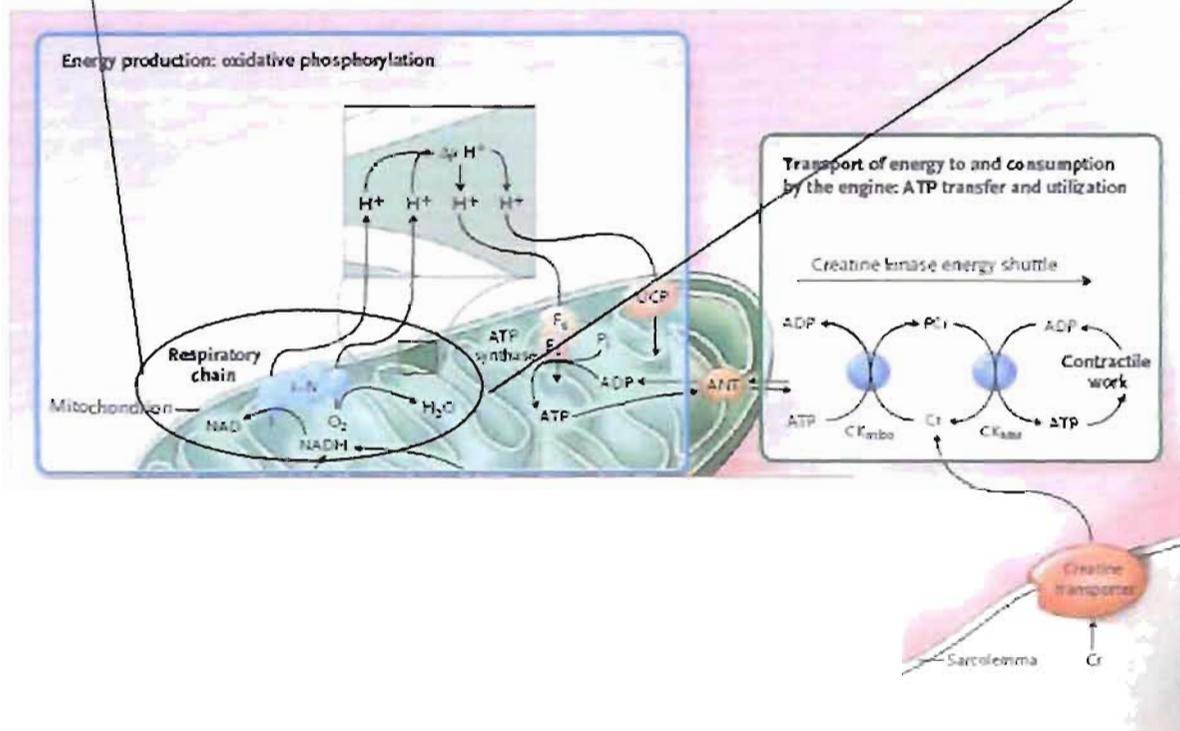
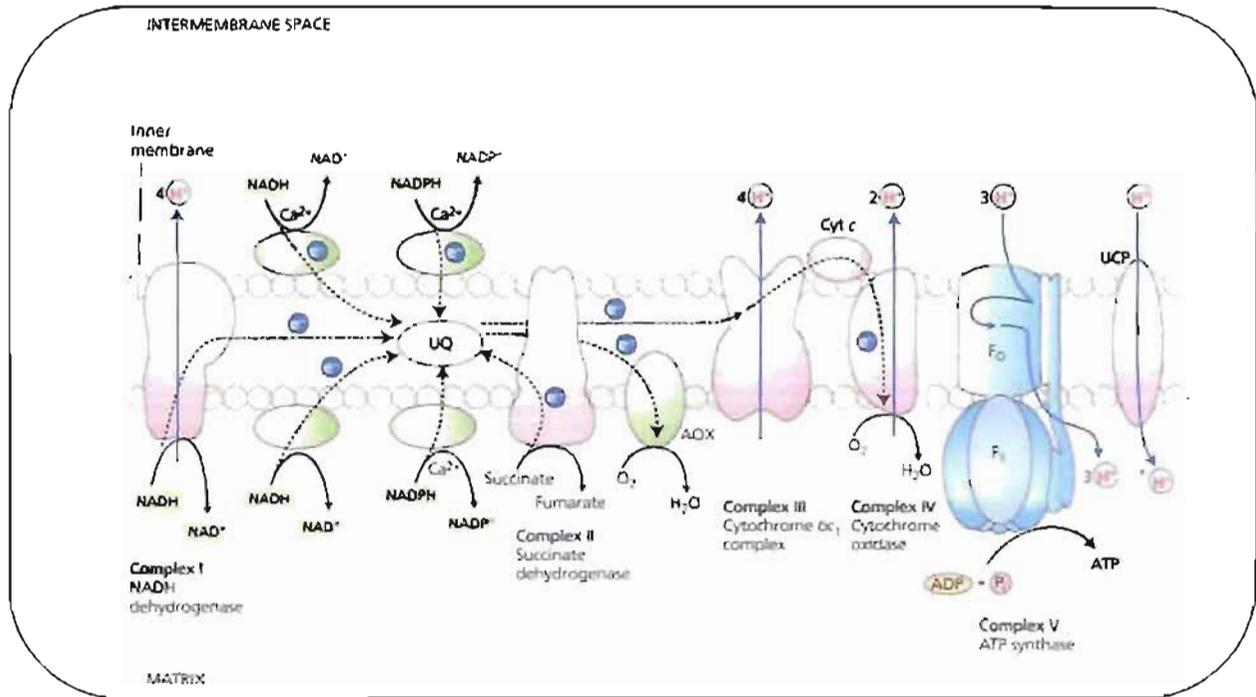
Parmi les acteurs du métabolisme cardiaque, l'enzyme créatine kinase (CK) agit en catalysant le transfert de phosphate riche en énergie de l'ATP vers la créatine pour former la phosphocréatine et l'ADP. La phosphocréatine est une molécule plus petite

que l'ATP qui diffuse de la mitochondrie vers les myofibrilles, où la créatine kinase myofibrillaire catalyse la formation d'ATP à partir de la phosphocréatine. La fonction la plus importante de la CK est qu'elle agit comme tampon d'énergie, permettant de maintenir des réserves riches en énergie sous forme de phosphocréatine, qui pourra être utilisée lors de grands besoins en énergie pour la synthèse d'ATP. Plusieurs isoformes de la créatine kinase existent, soit la CK-M, la CK-B et la CK-Mi.

L'enzyme sous forme active est présentée sous forme de dimère.

Une perte d'activité de la créatine kinase entraîne une perte important de réserves d'énergie et de la capacité de production d'ATP. Cette anomalie métabolique contribuerait grandement à la dysfonction contractile. Le ratio phosphocréatine : ATP pourrait être prédicteur de la mortalité reliée aux maladies cardiovasculaires.<sup>74</sup>

Le besoin énergétique du ventricule domine l'expression des gènes métaboliques et mitochondriaux dans le myocarde ventriculaire puisque la phosphorylation oxydative mitochondriale procure la majorité de l'énergie nécessaire pour la génération de la force. De manière intéressante, la sous-représentation des procédés métaboliques dans l'oreillette semble être le résultat d'une inhibition régionale-spécifique active des procédés métaboliques. Cela serait entre autre dû à la surexpression d'un groupe fonctionnel de « régulation négative du métabolisme » dans l'oreillette. Ce groupe comprend plusieurs facteurs de transcription, incluant des zinc finger proteins et les facteurs «kruppel-like», autant que des membres des voies de signalisation tel que le «tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3», le «transforming growth factor-beta inducible», le «early growth response 1», le régulateur négatif du récepteur



**Figure 3. Production et transport d'énergie dans le cardiomyocyte.** Le NADH est produit par le cycle de Krebs. La chaîne de transfert d'électron transfère les électrons du NADH à l'oxygène par les différents éléments des complexes I à IV créant un gradient électrochimique de  $H^+$ . Ce gradient passe à travers l'ATPase et permet la phosphorylation de l'ADP en ATP. Cet ATP est ensuite utilisé par la créatine kinase pour la synthèse de phosphocréatine, riche réserve d'énergie. Adapté de Neubauer S, 2007.

prostaglandine F2. Cela lie probablement l'inhibition transcriptionnelle du métabolisme au TNF-alpha, TGF beta et à la signalisation prostaglandine dans l'oreillette.<sup>16</sup>

#### *1.3.4. Mort cellulaire*

L'apoptose est l'une des deux formes de morts cellulaires et constitue un important déterminant du remodelage cardiaque, l'autre étant la nécrose. La nécrose survient lorsque le myocyte est privé d'oxygène ou d'énergie, menant à une perte de l'intégrité de sa membrane, l'influx de fluides extracellulaires et la relâche d'enzymes protéolytiques ce qui mène à la rupture cellulaire. Cette forme de mort cellulaire est présente dans les maladies cardiovasculaires telles que les infarctus du myocarde et les cardiomyopathies dilatées. En contraste avec la nécrose, l'apoptose est un processus dépendant de l'énergie dans laquelle la mort cellulaire est programmée par des gènes précis menant à l'activation d'une cascade qui cause la dégradation de l'ADN. Plusieurs facteurs impliqués dans l'activation de ces cascades sont présents et parfois même augmentés dans l'insuffisance cardiaque, incluant les catécholamines agissant à travers les récepteurs beta-adrénergiques<sup>26-27-28</sup>, l'angiotensine II<sup>29</sup>, le NO<sup>31</sup>, p53<sup>30</sup> et les cytokines inflammatoires.

Cette mort cellulaire, par la perte de cardiomyocytes, contribue à la perte de tissus contractile qui entraîne une hypertrophie compensatoire des cardiomyocytes et laisse place au développement de fibrose de remplacement. Ces trois facteurs constituent

des aspects importants du remodelage cardiaque impliqués dans l'insuffisance cardiaque.<sup>25</sup> L'étude de Hanna *et al* montre une plus grande mort cellulaire au niveau des oreillettes que des ventricules. Dans l'étude de Barth, ils ont observé que la classe fonctionnelle des gènes liés à la mort cellulaire est plus exprimée dans les oreillettes que dans les ventricules, ce qui pourrait entraîner une plus forte susceptibilité du myocarde auriculaire à subir la mort cellulaire programmée et identifie plusieurs voies apoptotiques spécifiques aux différentes chambres.<sup>16</sup>

#### 1.3.5. *Fibrose et matrice extracellulaire*

Les propriétés structurelles du ventricule et de l'oreillette ne sont pas uniquement régies par leur composition cellulaire mais aussi par des tissus connectifs interstitiels. Dans le cœur, ces tissus sont riches en collagène de type I et de type III, en protéoglycans tel que la fibronectine, et plusieurs facteurs de croissance tel que le TGF $\beta$ .<sup>32-34</sup>

Au site de blessure au niveau du tissu myocardique, le TGF $\beta$ 1 est relâché par les plaquettes et par les cellules inflammatoires telles que les macrophages. Le TGF $\beta$ 1 latent se lie localement à la matrice extracellulaire et peut être activé après une blessure. Cette molécule agit comme chemoattractant pour les neutrophiles, les cellules T, les monocytes et les fibroblastes. En se déplaçant vers la région affectée, ces cellules deviennent activées au fur et à mesure que la concentration locale de

TGF $\beta$ 1 augmente. Les monocytes recrutés sécrètent les facteurs de croissance des fibroblastes, le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et l'interleukine-1 (IL-1), et les fibroblastes augmentent leur synthèse de protéines de la matrice extracellulaire tel que le collagène, la fibronectine et les protéoglycans. Le TGF $\beta$ 1 inhibe de plus la synthèse de métalloprotéases (protéases de la matrice extracellulaire, MMPs) et stimule la synthèse d'inhibiteurs de protéases, les TIMPs (tissue-inhibitor metalloproteases). Le TGF $\beta$ 1 a donc pour effet d'augmenter la synthèse de la matrice extracellulaire en plus de diminuer sa dégradation. Le TGF $\beta$ 1 augmente de plus l'expression de récepteur d'intégrine situés à la surface cellulaire ce qui fait en sorte que les interactions entre les éléments de la matrice et l'assemblage de la matrice sont tous deux augmentés. Le TGF $\beta$ 1 se lie de plus aux protéoglycans de la matrice extracellulaire ou près de la surface cellulaire et cette liaison permet de terminer la production de TGF $\beta$ 1 lorsque la réparation tissulaire est complète.<sup>32-33</sup> Lors de blessures répétitives, il y a une auto-induction continue du TGF $\beta$ 1 menant ainsi à une surproduction de TGF $\beta$ 1 et à une production continue de matrice extracellulaire et de fibrose tissulaire, ce qui est en fait un excès pathologique de réparation tissulaire. Ce phénomène de surexpression de TGF $\beta$  a d'ailleurs été observé chez des humains et modèles animaux atteints de fibrillation auriculaire.<sup>80</sup> Cette surproduction de TGF $\beta$ 1 surpasse le signal d'arrêt de production et crée ainsi un cercle vicieux de production de TGF $\beta$ 1 menant à une croissance continue de fibrose. Cette fibrose myocardique est probablement l'un des plus importants procédés biologiques dans le remodelage structurel dans l'insuffisance cardiaque et les arythmies cardiaques. Le collagène de

type I, plus rigide que celui de type III qui est davantage élastique, est davantage présent et même remplace le collagène de type III dans la fibrose, augmentant la rigidité de la paroi du cœur. De plus, cette synthèse de fibrose entre les cellules peut générer des arythmies cardiaques en entraînant des bris de conduction entre les cellules cardiaques et ainsi, une hétérogénéité électrique dans le muscle cardiaque.<sup>20-</sup>

<sup>25</sup> Ainsi, la fibrose agit dans l'insuffisance cardiaque entre autre de deux manières, soit en agissant comme promoteur d'arythmies cardiaques et entraînant une diminution de la force musculaire par la modification de la rigidité et la composition de la paroi musculaire. Il existe en fait deux types de fibroses, soit la fibrose réparatrice et la fibrose réactive. La fibrose réparatrice se forme en remplacement de perte de tissus myocardique dû à la nécrose, et est interstitielle. Contrairement à cette dernière, la fibrose réactive est observée en absence de perte cellulaire et survient en réaction à l'inflammation et de façon périvasculaire. Elle s'étend par la suite dans les espaces interstitiels avoisinants. Ces deux formes de fibroses coexistent dans le remodelage de l'insuffisance cardiaque.<sup>2-20-34</sup>

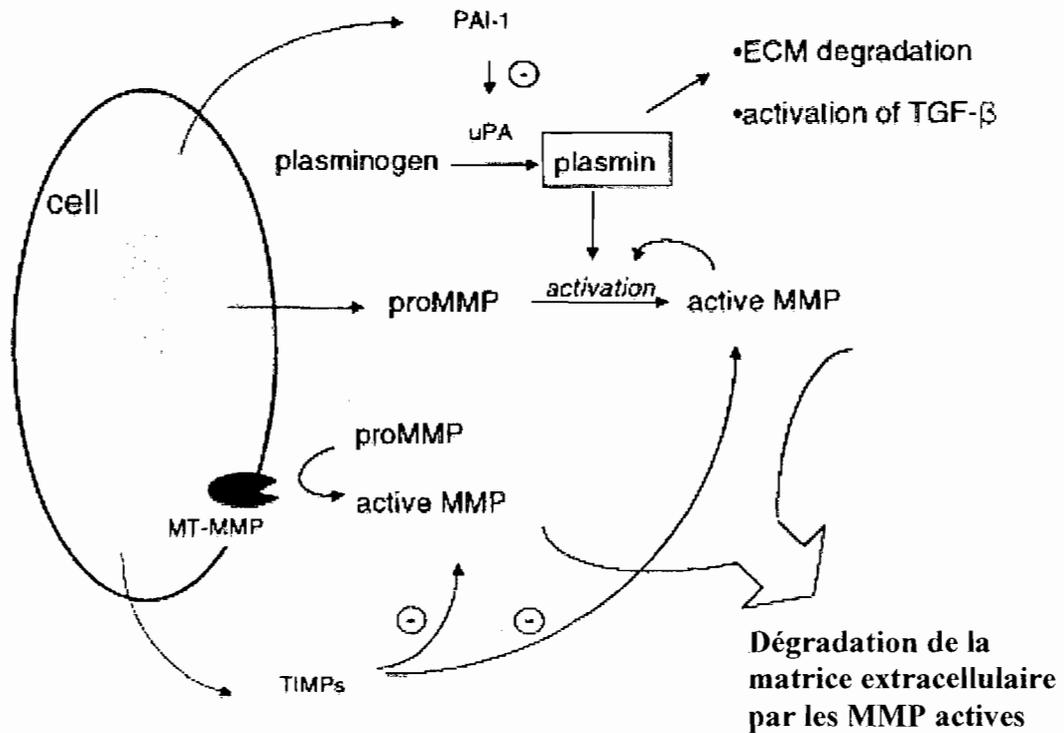
Plusieurs stimuli ont été suggérés comme augmentant le niveau de tissus fibreux dans le cœur insuffisant. Outre le TGF $\beta$ 1, l'angiotensine II agit comme autre forme de stimulus. Ce peptide agit directement sur la fibrose et régule indirectement le niveau de TGF $\beta$ 1 qui agit sur la réparation tissulaire. L'aldostérone, un stéroïde dont la production est stimulée par le système rénine-angiotensine, jouerait un rôle majeur dans le développement de matrice extracellulaire.<sup>35-36-37</sup>

En plus du TGF $\beta$ 1, du collagène et de la fibronectine, d'autres protéines jouent un rôle important dans le remodelage autant normal que pathologique de la matrice extracellulaire. Il s'agit des métalloprotéases de la matrice (MMPs) et de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs). Les MMPs constituent une famille de plus de 20 enzymes qui se divisent en deux types : celles sécrétées l'espace extracellulaire sous forme latente de proMMP et celles qui sont liées à la membrane. Des protéines sérine protéases sont responsables de l'activation des proMMPs par clivage. Ces protéases activées se lient ensuite spécifiquement à des protéines de la matrice extracellulaire tel que le collagène. Par exemple, la MMP1 est une collagenase et la MMP2 et MMP9 sont des gélatinases.

Les TIMPs agissent comme inhibiteurs des MMPs par différents mécanismes d'action en se liant à un ratio de 1 TIMP pour 1 MMP. Certains agissent en se liant aux pro-MMP ou aux MMP membranaires et peuvent avoir un effet proactivateur sur certaines MMPs. Par exemple, le complexe TIMP-2/MMP membranaire aurait pour effet de faciliter l'activation de la proMMP2. En plus de se lier aux MMPs, les TIMPs auraient aussi un effet sur la croissance cellulaire et sur le métabolisme cellulaire. Chez les patients atteints de cardiomyopathies, les gélatinases MMP2 et MMP9 ainsi que d'autres MMPs ont souvent été identifiées comme étant surexprimées et suractivées par rapport au cœur normal. Elles contribueraient grandement au remodelage de la matrice extracellulaire en dégradant les composantes de la matrice et de la membrane basale *et al* étant l'adhésion du myocyte à la

membrane basale.<sup>83</sup> Ceci mènera à une perte locale de continuité de myocytes avec la matrice extracellulaire et diminuera ainsi la capacité à correctement transmettre la contraction musculaire.<sup>46</sup> Il a aussi été démontré qu'une augmentation de l'activité de l'expression des MMPs agissait comme pro-fibrotique et qu'une inhibition à long terme des MMPs pouvait supprimer la fibrose cardiaque.<sup>82</sup>

L'étude de Barth *et al* a démontré qu'une majorité des transcrits de collagène testés étaient plus exprimés dans l'oreillette droite que le ventricule gauche sain. De plus, le niveau basal de TGF-beta1 est significativement plus élevé dans les oreillettes et une série de facteurs profibrotiques ont aussi été retrouvés en plus grande quantité. Tous ces gènes suggèrent que l'oreillette aurait une prédisposition pour le remodelage de la matrice extracellulaire.<sup>16</sup>



**Figure 4. Régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire.** La forme active de plasmine est impliquée dans l'activation des MMPs latents (proMMPs) et régule l'activation et la libération de facteurs de croissance tel que le TGFβ de la matrice extracellulaire. L'activité des MMPs est étroitement régulée par l'activité des TIMPs. Adapté de Creemers *et al.*

**Table I.** Liste de MMPs répertoriés chez l'humain et leurs substrats.

Activité enzymatique	MMP	Substrats
<u>Collagenase</u>		
Interstitielle Collagenase	MMP-1	Collagènes I, II, III, VII, et X, Gélatine, entactin, aggrecan
Neutrophile Collagenase	MMP-8	Collagènes I, II, et III, aggrecan
Collagenase-3	MMP-13	Collagènes I, II, et III, Gélatine, fibronectin, laminins, tenascin
Collagenase-4 <sup>79</sup>	MMP-18	Inconnu
<u>Gélatinases</u>		
Gélatinase A	MMP-2	Gélatine, Collagènes I, IV, V, VII, et X, fibronectin, laminins, aggrecan, tenascin-C, vitronectin
Gélatinase B	MMP-9	Gélatine, Collagènes IV, V, et XIV, aggrecan, élastine, entactin, vitronectin
<u>Stromelysins</u>		
Stromelysin 1	MMP-3	Gélatine, fibronectin, laminins, Collagènes III, IV, IX, et X, tenascin-C, vitronectin
Stromelysin 2	MMP-10	Collagène IV, fibronectin, aggrecan
Stromelysin 3	MMP-11	Fibronectin, Gélatine, laminins, collagène IV, aggrecan
<u>MMPs membranaires</u>		
MT1-MMP	MMP-14	Collagènes I, II, et III, fibronectin, laminins, vitronectin, proteoglycans; Activer proMMP-2 et proMMP-13
MT2-MMP	MMP-15	Activer proMMP-2
MT3-MMP	MMP-16	Activer proMMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Inconnu
MT5-MMP <sup>80</sup>	MMP-24	Activer proMMP-2
MT6-MMP	MMP-25	...
<u>Autres</u>		
Matrilysin	MMP-7	Gélatine, fibronectin, laminins, collagène IV, vitronectin, tenascin-C, élastine, aggrecan
Métalloélastase	MMP-12	Elastine
Unnamed <sup>81</sup>	MMP-19	Inconnu
Enamelysin	MMP-20	Aggrecan
	MMP-23	Inconnu
Endometase	MMP-26	Inconnu

Adapté de Creemers *et al.*

### 1.3.6. *Système rénine-angiotensine*

L'activation du système rénine-angiotensine joue un rôle relativement minime dans la réponse à court terme à des stimuli tels que l'exercice mais elle joue un rôle important dans la restauration du volume des fluides après une hémorragie. Il s'agit d'une réponse adaptative. Dans l'insuffisance cardiaque, la réponse du système rénine-angiotensine est cependant maladaptative. L'angiotensinogène est d'abord présent dans le système sous forme de précurseur inactif qui sera clivé par deux enzymes en un peptide actif, l'angiotensine II. La première enzyme, la rénine, clive l'angiotensinogène et libère le décapeptide, l'angiotensine I. Par la suite, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) permettra de générer un octapeptide, l'angiotensine II. Selon la littérature, l'angiotensine II peut être libérée directement à partir de l'angiotensine I par la chymase ou synthétisée directement à partir de l'angiotensinogène par l'action protéolytique de la kallikrein et la cathepsin G.<sup>2-26</sup>

L'angiotensine II agit sur quatre récepteurs : AT1, AT2, AT3 et AT4. Les récepteurs AT3 et AT4 sont encore très peu connus. Le récepteur AT2, lui, est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus lors du développement fœtal, suggérant un rôle important dans le développement fœtal et la morphogénèse. Son expression diminue rapidement après la naissance et demeure limitée principalement à l'utérus, l'ovaire, à certaines régions du cerveau et au cœur. Son activation a généralement un effet inhibiteur, contraire à l'activation du récepteur AT1, incluant la vasodilatation et l'inhibition de la croissance. Bien que le récepteur AT2 soit exprimé dans le cœur adulte, le

récepteur AT1 demeure celui qui prédomine dans cet organe. Il s'agit d'un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine G et se divisent en deux types, AT1<sub>A</sub> et AT1<sub>B</sub>, qui sont similaires au niveau de leur séquence en acides aminés, leurs propriétés pharmacologiques et leur profil de distribution dans le tissu cardiaque. C'est le récepteur AT1 qui est responsable de toutes les propriétés physiologiques bien connues reliés à l'angiotensine II, tel que l'élévation de la pression sanguine, la vasoconstriction, la relâche de l'aldostérone et l'absorption rénale de sodium et d'eau pour augmenter la pression et le volume sanguin. Ce récepteur peut en fait être vu comme un activateur puisqu'il augmente la contractilité cardiaque, cause la synthèse de tissus fibreux et stimule l'hypertrophie cardiaque, un effet compensatoire pour palier de la diminution de la force et du volume d'éjection. À long terme, cette réponse contribue grandement au développement de l'insuffisance cardiaque et devient une réponse maladaptative. Dans le cœur défaillant, l'angiotensine joue un rôle très important en stimulant entre autre l'activité des fibroblastes cardiaques et la production de matrice extracellulaire contribuant à l'augmentation de la rigidité de la paroi cardiaque et à la dysfonction diastolique entre autre en augmentant la synthèse d'ARNm codant pour le TGFβ1.<sup>40</sup> L'angiotensine II induit aussi la croissance et l'hypertrophie des cardiomyocytes en induisant l'expression de proto-oncogènes et de gènes fœtaux, et en augmentant la synthèse protéique.<sup>38-39</sup>

En plus de son action direct sur les organes régulateurs de l'hémodynamie, l'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone, de vasopressine, de

catécholamines et d'endothéline menant à l'amplification continue de plusieurs facteurs aggravants faisant parti d'un cercle vicieux dans le développement d'insuffisance cardiaque.<sup>2-20-41</sup>

#### ***1.4. Modèles animaux d'insuffisance cardiaque***

Depuis plusieurs années, l'insuffisance cardiaque est le sujet de milliers d'études scientifiques. En plus de l'étude chez les sujets humains, de nombreux modèles animaux ont été développés, montrant des profils semblables à ce qui est observé chez l'humain. Entre autre, une étude de Barth *et al* a comparé les changements dans l'expression des gènes chez des humains atteints d'insuffisance cardiaque aux changements observés chez la souris et ont obtenu un profil très similaire.<sup>16</sup> Les souris, les rats et les chiens constituent les trois espèces les plus étudiées chez lesquels différentes techniques sont utilisées pour générer le développement d'insuffisance cardiaque. Parmi ces modèles apparaît la ligature de l'artère coronaire qui génère une ischémie au niveau du ventricule provoquant à court terme un infarctus du myocarde et à long terme, le développement d'insuffisance cardiaque à différents niveaux de gravité selon l'importance de l'infarctus généré par la ligature. Une autre technique utilisée pour générer un infarctus est la création des microembolies artificielles au niveau de l'artère coronaire soit en insérant un cathéter et par l'injection de microsphères. En alternative à l'infarctus du myocarde pour générer un modèle d'insuffisance cardiaque, il existe aussi certains modèles générés par surcharge de pression au niveau ventriculaire, qui se produit par la constriction de l'aorte ou de l'artère pulmonaire, menant ainsi à une sténose dans la valve aortique ou

pulmonaire. Il est aussi possible de créer une hypertension en bloquant partiellement les artères rénales. D'autres techniques permettent de créer une surcharge de volume en créant une incompetence au niveau de différentes valves. L'administration de différentes drogues tel que l'adriamycine et la streptozotocin, l'induction du carence en vitamine E ou des cardiomyopathies virales peuvent elles aussi mener à long terme au développement d'insuffisance cardiaque mais rendent plus difficile la gestion du degré de gravité de la maladie et le temps de développement. De plus, avec les percées en biologie moléculaire, plusieurs modèles d'animaux transgéniques sont maintenant disponibles. Ces modèles affectent différentes voies de signalisations telles que le système de contraction musculaire, le métabolisme, les neurohormones et la signalisation cellulaire. Ces modèles sont très utiles pour étudier l'implication de certaines protéines, mécanismes ou voies de signalisation dans le développement d'insuffisance cardiaque.<sup>84-85-86</sup> Finalement, le modèle utilisé dans le cadre de la présente étude est celui de la tachystimulation ventriculaire.<sup>42-43-44</sup> Il est réalisé en implantant un régulateur cardiaque au niveau de l'apex du ventricule droit. Cette technique est entre autre utilisée chez le chien et reproduit les conditions de tachycardie observée chez l'humain, soit en induisant un rythme de 240 battements par minute (trois fois la vitesse normale), pour une période de 2 semaines. Cela conduit à une surcharge de travail du muscle cardiaque, induit un remodelage important tel que le développement de fibrose et une restructuration de la chambre cardiaque et entraîne le développement progressif d'insuffisance cardiaque.<sup>44</sup> De plus, l'insuffisance cardiaque prédispose à la fibrillation auriculaire, qui peut être facilement induite dans ce modèle grâce à un stimulus de courte durée.<sup>20-21</sup>

### ***1.5. Traitements thérapeutiques***

Le traitement de l'insuffisance cardiaque, des arythmies ventriculaires et des arythmies auriculaires ont fait l'objet d'innombrables études aux cours des dernières années. Bien que ces différentes pathologies soient inter-reliées, les possibilités de traitement diffèrent selon l'évolution et les causes de la maladie. Les traitements pharmacologiques de l'insuffisance cardiaque se distinguent en deux différentes approches : le traitement d'insuffisance cardiaque de décompensation aiguë et le traitement d'insuffisance cardiaque chronique et stable. Le but de ces deux types de thérapie est différent soit dans le cas d'insuffisance cardiaque aiguë, de stabiliser l'insuffisance cardiaque du patient et lorsque cet objectif est atteint, dans le cas d'insuffisance cardiaque stable et chronique, d'augmenter l'espérance de vie, de minimiser les symptômes, d'améliorer la capacité fonctionnelle du cœur et de ralentir la progression de la maladie. Parmi les agents pharmacologiques les plus utilisées figurent les diurétiques, les vasodilatateurs, les agents inotropiques positifs et les inhibiteurs neurohormonaux. <sup>2-3-4-20</sup>

Les diurétiques servent à rétablir les changements hémodynamiques reliés aux reins qui surviennent suite à l'activation du système rénine-angiotensine (libération accrue d'aldostérone) et du système adrénergique (par l'augmentation de la vasopressine) en réponse à la diminution de sang éjecté par le cœur défaillant. Ces changements se traduisent par une augmentation de la rétention de sel et d'eau, augmentant ainsi le volume des fluides afin de palier à cette baisse de pression. Cette réponse maladaptative entraîne une augmentation de la pression de fin de diastole et augmente

le stress de la paroi lors de la diastole et de la systole, contribuant ainsi au développement d'hypertrophie et de remodelage menant à l'insuffisance cardiaque. En contrôlant le volume des fluides, les diurétiques permettent de diminuer la progression du remodelage ventriculaire en diminuant la pression de remplissage. De leur côté, les agents inotropiques positifs tel que les glycosides cardiaque (ex. digoxin), les agonistes adrénergiques et les inhibiteurs de phosphodiesterase, vont agir respectivement sur les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, sur les mécanismes régis par les récepteurs bêta-adrénergiques et sur la conversion d'AMP cyclique en AMP au niveau du réticulum sarcoplasmique. Ces trois différents mécanismes permettent de réguler la contraction cardiaque dans l'insuffisance cardiaque et dans les différentes arythmies. D'un autre côté, l'administration d'agonistes  $\beta$ -adrénergiques, entre autre pour les problèmes respiratoires, a été associé avec d'importants risques d'infarctus du myocarde, de fibrillation auriculaire, d'insuffisance cardiaque et de mort subite en augmentant la vitesse des battements cardiaques et en diminuant les concentrations de potassium.<sup>87</sup>

Les inhibiteurs neurohormonaux sont à ce jour considérés comme le plus grand avancement dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ils comprennent entre autre les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et les agents antiadrénergiques. Tel que décrit plus haut, de nombreuses cascades de signalisation neurohormonale sont affectées dans l'insuffisance cardiaque tel que les récepteurs de l'angiotensine, les récepteurs beta-adrénergiques, le récepteur du  $\text{TNF-}\alpha$  et de

l'endothéline-1. Ils sont tous activés dans le cœur insuffisant et contribuent à la croissance maladaptative, au remodelage et à la dysfonction du cœur défaillant. L'inhibition de ces systèmes pourrait donc prévenir et parfois même renverser ces effets biologiques.

Tel que mentionné précédemment, les patients atteints d'insuffisance cardiaque sont plus sujets de développer de la fibrillation auriculaire et à l'inverse, la fibrillation auriculaire prédispose au développement d'insuffisance cardiaque. Sachant que les patients atteints de FA et d'insuffisance cardiaque présentent un pronostic et une espérance de vie écourtée par rapport aux autres patients atteints d'insuffisance cardiaque seulement, il est donc évident que le traitement des arythmies cardiaques joue un rôle important dans la prévention et le traitement de l'insuffisance cardiaque. Concernant le traitement des arythmies cardiaques, les drogues disponibles sont principalement classées selon le fait qu'elles exercent un blocage principalement sur les canaux sodiques, potassiques, calciques ou sur les beta-adrénorécepteurs selon la classification de Vaughan Williams (tableau 2). Selon cette classification, la classe 1 agit de façon prédominante sur les canaux sodiques et sont divisées en trois sous groupes : la classe 1A réduit le  $V_{max}$  et la durée du potentiel d'action, la classe 1B ne modifie pas le  $V_{max}$  et diminue la durée du potentiel d'action alors que la classe 1C réduit le  $V_{max}$  et prolonge la période réfractaire. La classe 2 est constituée de drogues bloquant les récepteurs beta-adrénergiques. La classe 3, elle, est constituée d'agents thérapeutiques agissant principalement sur les canaux potassiques et prolongent la repolarisation alors que la classe 4 agit sur les canaux calciques lents. <sup>2</sup>

**Tableau II: Drogues antiarythmiques, cibles et effets**

<b>Classe</b>	<b>Cible</b>	<b>Exemples de drogues</b>	<b>Effets cliniques</b>
<b>1A</b>	Canaux Na <sup>+</sup>	Quinidine Procainamide Disopyramide	- Réduit le V <sub>max</sub> - Prolonge la durée du potentiel d'action
<b>1B</b>	Canaux Na <sup>+</sup>	Mexiletine Lidocaïne	- Diminue la durée du potentiel
<b>1C</b>	Canaux Na <sup>+</sup>	Flecainide Propafenone Moricizine	- Réduit le V <sub>max</sub> - Prolonge la période réfractaire minimale
<b>2</b>	Bloqueurs beta-adrenergiques	Propranolol Metoprolol	- Bloque le récepteur beta-adrénergique
<b>3</b>	Canaux K <sup>+</sup>	Sotalol Amiodarone bretylium	- Bloque principalement les canaux potassiques (ex. I <sub>Kr</sub> et I <sub>Ks</sub> ) et prolonge la repolarisation. - Exerce aussi un effet de faible à modéré sur les canaux sodiques, calciques et les récepteurs beta-adrénergiques.
<b>4</b>	Canaux Ca <sup>2+</sup>	Verapamil Diltiazem Nifedipine	- Bloque principalement les canaux calciques de type lent (I <sub>Ca-L</sub> ). - Certaines drogues de cette catégorie agissent aussi sur les canaux I <sub>Ca-T</sub>
<b>Autres</b>	Nœud AV	Adenosine	- Produit un blocage auriculo-ventriculaire ou empêche la réentrée au nœud sinusal.
	Conduction du nœud AV	Digoxin	- Contrôle le rythme ventriculaire pendant les épisodes de fibrillation auriculaire.

## 2. Hypothèses et méthodologie

L'insuffisance cardiaque est l'une des causes d'hospitalisation les plus fréquentes dans les pays industrialisés et cause une mort prématurée des gens qui en sont atteints. Son incidence et les coûts reliés aux traitements et au suivi des patients ne cessent d'augmenter avec les années. Il s'agit en fait d'un syndrome constituant souvent une étape finale par laquelle se terminent plusieurs maladies cardiovasculaires endommageant le cœur. Bien que plusieurs études aient été faites sur le sujet, les traitements disponibles pour l'insuffisance cardiaque ne permettent que de retarder son développement mais la fin de la maladie demeure toujours fatale. L'insuffisance cardiaque, souvent causée par d'autres problèmes cardiovasculaires, entraîne elle aussi des complications importantes. Il a entre autre été démontré que l'insuffisance cardiaque augmentait considérablement les risques de développement de fibrillation auriculaire, le type d'arythmie le plus commun en clinique, en produisant de la fibrose interstitielle au niveau de l'oreillette et en favorisant le maintien de la fibrillation auriculaire. La susceptibilité à développer de la FA augmente avec la gravité de l'insuffisance cardiaque et le niveau de fibrose retrouvé à l'oreillette.

Plusieurs études à ce jour ont étudié les effets de la fibrillation auriculaire sur l'expression des gènes au niveau de l'oreillette ou de l'effet de l'insuffisance cardiaque sur l'expression des gènes de l'oreillette ou du ventricule. Cependant, une seule étude à été faite à notre connaissance à ce jour et compare le

remodelage auriculaire au remodelage ventriculaire pathologique dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque. Cette étude de Hanna *et al* a démontré qu'il existe des différences substantielles, qui évoluent dans le temps, dans le remodelage des différentes chambres dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque. On retrouve, au niveau de l'oreillette, un développement plus important et plus rapide de fibrose, un niveau d'inflammation, d'apoptose, d'activation de TGF $\beta$ 1 et de phosphorylation de ERK, JNK et p38 beaucoup plus important après 24h de tachystimulation ventriculaire ainsi qu'une quantité nettement plus élevée d'angiotensine II que ce qui est observé au niveau du ventricule.<sup>44</sup> Bien que cette étude ait permis d'établir clairement le fait qu'il doit exister de grandes différences dans le remodelage des différentes chambres cardiaques, à notre connaissance, aucun portrait global de ces différences n'a été fait à ce jour. La prévention du remodelage auriculaire est devenu une cible intéressante pour le traitement de la fibrillation auriculaire, principalement à cause des effets secondaires graves de certaines drogues antiarythmiques. Une meilleure compréhension de ce remodelage permettra probablement d'identifier des cibles potentielles afin de prévenir ces changements au niveau de l'oreillette. En 2004 est apparu sur le marché la première puce d'ADN permettant l'étude du génome canin. Or, tel que décrit plus haut, le modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire constitue un excellent modèle d'étude de l'insuffisance cardiaque et de la fibrillation auriculaire causée par l'insuffisance cardiaque. La technologie des puces d'ADN est actuellement en pleine émergence. Il s'agit d'une technique

semi-quantitative de plus en plus précise permettant d'avoir rapidement accès à une quantité importante d'information concernant les changements dans l'expression des gènes d'un organisme, dans le cas présent le remodelage spécifique des différentes chambres cardiaques.

Des travaux publiés précédemment nous ont mené à nous poser les questions suivantes: 1) Quels gènes sont affectés ou impliqués dans le remodelage auriculaire lors d'insuffisance cardiaque et quelle est l'évolution de ces changements à travers le temps? 2) Quels gènes sont affectés ou impliqués dans le remodelage ventriculaire lors d'insuffisance cardiaque et quelle est l'évolution des changements à travers le temps? 3) Quelles sont les différences dans le remodelage auriculaire (cœur insuffisant vs contrôle) versus ventriculaire (cœur insuffisant vs contrôle) dans l'évolution de l'insuffisance cardiaque? 4) Sachant que les ventricules et les oreillettes présentent à la base (cœur sain) des différences importantes dans l'expression des gènes, comment évoluent ses différence dans le développement d'insuffisance cardiaque?

C'est donc à partir de ces questions que le projet a pris forme. Des stimulateurs cardiaques ont été installés au niveau de l'apex du ventricule droite chez trois groupes de 5 chiens. Les chiens ont été tachystimulés à une vitesse de 240 battements par minute pour une période de 0h (contrôles opérés), 24h et 2 semaines, nous permettant d'étudier l'évolution du remodelage à différents temps. Bien que certaines études utilisent une tachystimulation de 4 à 5 semaines, l'étude de Hanna *et al* a démontré que les différences dans le

remodelage entre 2 et 5 semaines étaient semblables au niveau de l'apoptose, de la fibrose, de l'inflammation et certaines voies de signalisation. Nous avons donc préféré utiliser une période de deux semaines entre autre pour minimiser la période d'expérimentation sur les animaux. Par la suite, les cardiomyocytes ont été isolés du ventricule gauche et de l'oreillette gauche par digestion enzymatique. Le choix de ces cellules est dû au fait qu'il s'agit des cellules contractiles du cœur, largement impliquées dans la signalisation au niveau des tissus cardiaques et qui occupent près de 75% de la masse du tissu cardiaque (30% du nombre cellulaire). Ces cellules sont de plus les principaux acteurs de la contraction cardiaque. Suite aux isolations cellulaires, la pureté des échantillons a été testée par Western Blot, en ciblant des protéines spécifiques aux autres types cellulaires pouvant potentiellement contaminer les isolats. L'ARNm total a été extrait des cardiomyocytes et analysé par puces d'ADN contenant plus de 21 000 transcrits. Suite aux analyses statistiques, les gènes présentant une différence d'expression significative ont été classés dans différentes catégories. Différentes comparaisons ont été faites et sont présentées dans le tableau 3. Par la suite, les résultats obtenus par puces d'ADN ont été confirmés par PCR en temps réel en analysant le niveau d'expression de 18 gènes connus, choisis au hasard pour représenter différent niveaux de différences. Puisque la variation du niveau de production de protéines n'est pas toujours directement relié aux différences d'expression du gène, nous avons aussi confirmé les changements observés par puces d'ADN au moyen de Western Blot en étudiant 8 protéines différentes.

Cette étude devrait permettre une meilleure compréhension du remodelage auriculaire et ventriculaire, ainsi que de leurs différences, au cours du développement de l'insuffisance cardiaque et de fibrillation auriculaire. Une meilleure connaissance des différences permettra d'identifier des mécanismes qui évoluent différemment dans les deux chambres, et suite à des études plus approfondies, de peut-être pouvoir cerner des cibles spécifiques pour chacune des chambres permettant de traiter indépendamment, de façon appropriée, chacune des chambres et de prévenir le développement de FA et d'IC.

**Tableau III: Diverses comparaisons de l'expression des gènes faites dans le modèle canin d'IC par VTP**

VS	LA 24h VTP	LA 2 sem VTP	LV Contrôle	LV 24h VTP	LV 2 semaines
LA Contrôle	X	X	X		
LA 24h VTP				X	
LA 2 semaines VTP					X
LV Contrôle				X	X

**3. Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure**

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao,  
Stefan Käab, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel

*From Research Center, Montreal Heart Institute (P.P., S.C., S.L.B., S.N.),  
Department of Pharmacology, Université de Montréal, (P.P., S.N.)  
Departments of Pharmacology (S.C., L.X., S.N.) and Physiology (E.L., L.G.),  
McGill University, Montreal, Medical Hosp I, University of Munich (S.K.),  
Germany, and INSERM U533-Institut du Thorax (S.D.), Nantes, France.*

Short title: Atrial and ventricular genomics in CHF

### **3.1. Abstract**

Congestive heart failure (CHF) causes arrhythmogenic, structural and contractile atrial and ventricular remodelling, with some important differences: the atria show faster and greater inflammation, cell death and fibrosis. The present study assessed time-dependent left atrial (LA) and ventricular (LV) gene-expression changes in CHF. Groups of dogs were submitted to ventricular tachypacing (VTP, 240 bpm) for 24 hours or 2 weeks, and compared to sham-instrumented animals. RNA from isolated LA and LV cardiomyocytes of each dog was analyzed by canine-specific microarrays (>21,700 probe-sets). LA showed dramatic gene-expression changes, with 4785 transcripts significantly-altered ( $Q < 5$ ) at 24-h and 6284 at 2-wk VTP. LV gene changes were more limited, with 52 changed at 24-hr and 130 at 2-wk VTP. Particularly marked differences were seen in ECM genes, with 153 changed in LA (e.g. ~65-fold increase in collagen-1) at 2-weeks versus 2 in LV; DNA/RNA genes (358 in LA, 7 in LV); protein biosynthesis (LA=327, LV=14); membrane transport (LA=230, LV=8); cell structure and mobility (LA=159, LV=6) and coagulation/inflammation (LA=147, LV=1). Noteworthy changes in LV were genes involved in metabolism (35 genes; creatine-kinase B increased 8-fold at 2-week VTP) and  $Ca^{2+}$ -signalling. LA versus LV differential gene-expression decreased over time: 1567 genes were differentially-expressed ( $Q < 1$ ) at baseline, 1499 at 24-hour VTP and 897 at 2-week VTP. Real-time RT-PCR and Western-blot analyses for selected genes confirmed microarray results. VTP-induced CHF causes dramatically more gene-expression changes in LA than LV and dynamically alters the LA-LV

differential gene-expression pattern. These results are relevant to understanding chamber-specific remodelling in CHF.

**Key Words:** heart failure, arrhythmias, remodelling, gene expression, arrhythmias, metabolism, fibrosis

### *3.2. Introduction*

Congestive heart failure (CHF) is a leading cause of hospital admission and presently affects over 5 million Americans [1]. It is also one of the most important causes of atrial fibrillation (AF), the most common sustained cardiac arrhythmia [2]. Both pathologies are associated with important structural, electrophysiological, biochemical and molecular remodelling [3]. There are significant atrial-ventricular gene-expression differences [4], as well as differences between atrial and ventricular remodelling [5]. Ventricular gene-expression changes have been studied in dogs with terminal CHF caused by ventricular tachypacing (VTP) [6].

The VTP model of CHF also produces a substrate for AF that reproduces many features observed in patients [7]. As in CHF patients, ventricular-tachypaced CHF dogs show time-dependent development of fibrosis, atrial and ventricular dilatation, and impaired ventricular and atrial function, as well as time-dependent electrophysiological remodelling manifested as ion-channel alterations and AF promotion [5, 8-11]. In view of the different phenotypic features of atrial versus ventricular remodeling with the development of VTP-induced CHF [5], it is reasonable to consider the possibility that there may be chamber-specific patterns of gene-expression

alterations. Furthermore, Barth *et al* . have shown that the atrial gene-expression pattern is changed in AF patients, becoming more similar to the ventricular gene-expression pattern [12]. Whether similar changes in chamber-specific gene-expression patterns occur in animal models of AF is unknown. The canine VTP-model allows for observations at different time points during the development of CHF, as well as the possibility to isolate purified cardiomyocyte preparations in order to obtain information about cardiomyocyte gene-expression with minimal contamination from other cell-types. This study was designed to use canine-specific microarrays to compare the evolution of atrial and gene-expression changes over 2 weeks of VTP, sufficient time to achieve the fully-developed AF substrate [13], as well as to determine whether chamber-specific gene-expression patterns are altered over this time.

### ***3.3. Materials and methods***

#### ***3.3.1. Animal Model***

Animal care procedures were approved by the animal-research ethics committee of the Montreal Heart Institute following guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Experiments were performed on three groups of five mongrel dogs each, weighing 25-32 kg: 1 group each subjected to 24-hour or 2-week VTP, and a control sham-instrumented group. All groups were handled and followed as previously described [10, 13, 14]. A unipolar ventricular-pacing lead was inserted into the right-ventricular apex under 1.5%-halothane anesthesia and attached to a pacemaker in the neck. The pacemaker was programmed to pace at 240 beats/min.

On study days, an ECG was recorded to confirm continued pacemaker-capture. Dogs were then anaesthetized (morphine, 2 mg/kg s.c.;  $\alpha$ -chloralose, 120 mg/kg i.v. load; 29.25 mg/kg/hr maintenance infusion) and ventilated. Arterial and left-ventricular (LV) end-diastolic pressures were measured with fluid-filled catheters.

Dogs were then euthanized by pentobarbital overdose, hearts were removed and placed in Tyrode solution aerated with 100% O<sub>2</sub>. Left-atrial (LA) and left-ventricular (LV) free walls were removed and perfused via coronary arteries as previously described. Cell isolation was performed via collagenase digestion [15]. Cell pellets were then snap-frozen and stored at -80°C.

### 3.3.2. RNA Extraction

Cell pellets were immersed into Trizol (1 mL/100 mg of pellet) and pulverised. Samples were centrifuged at 8,000 rpm, 15 minutes, and 4°C. The aqueous phase was transferred and added to an equal volume of chloroform and centrifuged (5 minutes, 8000 rpm, 4°C). The resulting aqueous phase was added to an equal volume of isopropanol, incubated (-20°C, 45 minutes) and centrifuged (8,000 rpm, 5 minutes, 4°C). Pellets were centrifuged in ethanol, then re-suspended in 70% ethanol and incubated overnight (-20°C). Samples were then re-centrifuged (13,000 rpm, 5 minutes, 4°C) and pellets dried and resuspended in DEPC water. RNA concentrations were characterized on RNA 6000 nano-chips (Agilent 2100 Bioanalyzer). Samples with 260/280 nm OD ratios <1.8 were rejected.

### 3.3.3. *Microarray Processing and Analysis*

Fragmented cRNA (10 µg) was hybridized to Affymetrix GeneChip Canine Genome Arrays (23,836 probesets detecting 21,700 transcripts) with Affymetrix GeneChip one-cycle target labeling and control reagents kits. GeneChip Fluidics Station 450 was used to stain and wash the chips, followed by visualization on an Affymetrix GeneChip Scanner 3000.

Microarray expression data were subjected to Invariant Set Normalization in dChip to correct inter-array difference in average brightness. The dChip algorithm was also used to calculate the Model Based Expression Index to integrate probe intensities into one representative expression-value/gene. Significance Analysis for Microarrays (SAM) was used to identify differently-expressed genes in VTP versus sham comparisons at  $q$ -values $<5$ , implying that  $<5\%$  of genes identified as differentially-expressed would be false positives. Since there was an extremely large number of atrial-ventricular gene differences, we reduced the  $q$ -value for the atrial-ventricular comparison analysis to 1, to decrease false-positive identifications and have a more tractable data set.

Genes without Affymetrix annotations were BLAST-searched for mammalian sequence-homologies with  $E$ -value $<10^{-4}$ . For functional annotations, we used Affymetrix's human-to-canine gene-mapping and the human Gene Ontology (GO) database. Genes that could not be identified by this process were classified by literature search.

#### 3.3.4. *Real-Time RT-PCR*

Real-Time RT-PCR (Gene Amp 5700, Perkin-Elmer) was used to confirm microarray data for 18 selected genes. First-strand cDNA was synthesized from 2 µg total RNA (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems). On-line PCR was performed (duplicate analyses for each sample) with FAM-labelled fluorogenic TaqMan probes and primers (Assay-by-design, Applied Biosystems). Target-gene signals were normalized to 18S-ribosomal RNA-values. Primers and probe sequences are provided in Table 7. Data were analysed with the comparative threshold cycle (Ct) relative-quantification method.

#### 3.3.5. *Western Blot Analysis*

Protein-expression for 8 selected genes was analyzed by Western Blot. Protein samples (100 µg) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose or PVDF membranes and incubated with antibodies listed in Table 8. Bands were quantified with QuantityOne software and normalized to GAPDH band-intensities on the same samples.

#### 3.3.6. *Statistics*

Data are shown as mean±SEM. Comparisons were performed with analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

### **3.4. Results**

VTP caused a decrease in arterial pressure and increase in LV end-diastolic pressure at 2 weeks (Table 4). At 2 weeks, all dogs had ascites, visibly dilated hearts and pulmonary congestion.

#### *3.4.1. VTP-Induced Changes Relative to Sham*

Relative to sham dogs, 4785 LA genes were differentially expressed by 24-hour VTP and 6284 by 2-week VTP. In contrast, 52 were differentially expressed in the LV at 24-hour VTP and 130 at 2-week VTP. Figure 5 shows mean mRNA-expression for each transcript versus corresponding sham values for each group of dogs. Red points are statistically-significant changes versus sham, blue points were not significantly different between groups.

Figure 7 shows the number of significantly up- and down-regulated genes in each functional category. In LA, there were almost equal numbers of genes up- and down-regulated at 24-hour VTP (45% down, 55% up) and in 2-week VTP (50% down, 50% up). In contrast, most of the significant LV changes consisted of down-regulation at 24-hour VTP (88% down, 12% up), a predominance that remained but was less striking at 2 weeks (68% down, 32% up). Substantial changes were seen for all gene groups in LA, but particularly larger numbers of changes were seen in DNA/RNA synthesis and degradation, metabolism, protein synthesis and degradation, signal transduction and transport.

Although the numbers of genes changed were much greater in LA than LV, the relative numbers of up- versus down-regulated genes were often similar

for both. For example, at 2-week VTP gene categories with more up- than down-regulated genes in LA included cell cycle and growth (96 up/63 down), immunity (121 up/26 down), and cell structure and mobility (97 up/62 down). Corresponding results for LV were 3 up/1 down, 1 up/0 down, and 4 up/2 down. For ECM genes, 124 were upregulated and 29 down in LA after 2-week VTP, compared to 1 gene each up- and down-regulated in LV. Other gene-classes showed more downregulated than upregulated genes after 2-week VTP, once again with parallel patterns in LA and LV: metabolism-related genes (LA: 175 up/306 down, LV: 4 up/31 down) and DNA and RNA synthesis (LA: 117 up/241 down, LV: 2 up/5 down). Finally, some gene-categories showed similar numbers of up- and down-regulated genes, e.g. signal-transduction genes, with LA: 215 up-regulated and 205 down-regulated after 2-week VTP, LV: 8 up/8 down. For most gene-groups, the relative portion of up- versus down-regulated genes was qualitatively similar for 24-hour and 2-week VTP. A notable exception was protein synthesis and degradation, for which about twice as many genes were up- versus down-regulated at 24 hours (190 versus 97 respectively), whereas the ratio was inverted at 2 weeks (126 up/201 down).

Large LA-LV differences were observed in relation to ECM-gene expression. Many important ECM-genes showed large statistically-significant changes in LA without statistically-significant changes in LV. For example, 16 probe-sets corresponding to 12 transcripts encoding collagen-related genes were significantly increased in the LA at 2-week VTP. Particularly impressive differences occurred in collagen-1/alpha-1 (~65-fold increase versus sham in LA), collagen-3/alpha-1 precursor (~20-fold increase versus sham), and

collagen-1/alpha-2, collagen-5/alpha-1 and collagen-12/alpha-2 (all increased ~10-fold). The large LA-LV differences in these collagen genes and the fact that most of the collagen-gene expression increases were significant in LA at 2-week but not 24-hour VTP agrees well with the time-course and magnitude of fibrosis changes in the 2 chambers [5]. Additional differential ECM-gene changes of interest included those in fibronectin (significant, ~11- and 17-fold increases in LA at 24-hour and 2-week VTP respectively), élastin (~10-fold at 2-weeks), fibrillin-1 (~2.5 and ~8-fold at 24-hour and 2-week VTP), TIMP-1 (~6-fold increased at 24-hour and 2-week VTP) and TIMP-3 (50%-decrease at 24-hour VTP).

Although relatively few genes were significantly altered in LV, some interesting patterns emerged. The most affected categories were signal transduction, protein synthesis and degradation, and metabolism. A number of respiratory-chain complex genes were down-regulated at 2-week VTP in LV, including NADH dehydrogenase Fe-S protein 8 (35% decrease versus sham), succinate dehydrogenase (25% decrease), ubiquinol-cytochrome oxidoreductase (25% decrease). Other metabolism-related genes that were significantly and prominently decreased at 2-week VTP in LV included glutathione-transferase (~60% decrease), NADH-ubiquinone oxidoreductase 30-kDa subunit (~30%), succinate-dehydrogenase precursor (~20%), succinate co-A ligase (~25%) and succinyl-coA synthetase (~33%). Interestingly, creatine-kinase was significantly up-regulated >8-fold in LV at 2-week VTP, versus ~5-fold in LA at the same time point. Two genes encoding proteins involved in Ca<sup>2+</sup>-related arrhythmogenesis were significantly up-regulated in LV at 2-week VTP:

calmodulin (types 1 and 3 increased ~40 and 90% respectively) and FKBP12 (increased ~70%).

### 3.4.2. *Evolution of LA-LV Expression Profile Differences*

Figure 6 compares the mean value of mRNA expression levels for all transcripts in LA versus LV, based on paired samples obtained from each dog at each time point. Blue points indicate non-significant changes in LA versus LV while values in red are significantly-different ( $q$ -value $<1$ ). In the sham group, 1567 genes were differentially-expressed in LA versus LV, while 1499 were differential at 24-hr VTP and 897 at 2-wk VTP. In the sham group, almost as many genes show lower-level expression as higher-level in LA versus LV (53% versus 47%). At 24-hr VTP, fewer genes showed lower-level expression in LA (44% lower and 56% higher) and this difference increased further at 2-wk VTP (33% lower-level and 66% higher-level in LA than LV). Thus, although the number of LA-LV gene expression differences decreased with VTP, their pattern changed, with an increasing proportion becoming attributable to genes upregulated in LA.

The temporal evolution of LA-LV differentially expressed gene groups is illustrated in Figure 8. For a number of gene-groups differentially expressed in LA versus LV, differences tend to increase after 24-h VTP and then decrease after 2 wks: e.g. DNA and RNA synthesis (430 differential genes in shams, 444 at 24-h VTP, 311 at 2-wk); metabolism (sham: 458, 24-h: 487, 2-wk: 395); protein synthesis and degradation (sham: 414, 24-h: 443, 2-wk: 315); signal transduction (sham: 425, 24-h: 482, 2-wk: 387); transport (sham: 227, 24-h:

273, 2-wk: 210). For most gene categories, these changes were equally distributed between increased and decreased expression-level in LA compared to LV for each time point. Immunity-related genes showed a somewhat different pattern (sham: 103, 24-h: 127, 2-wk: 124), with differential genes remaining increased at 2-wk VTP.

#### 3.4.3. *Real-Time PCR Results*

Quantitative Real-Time-PCR was performed on 18 genes for each group of dogs. Genes believed to be of pathological importance were selected to represent over-expressed, under-expressed or nonsignificantly-changed genes. Figure 9 compares gene expression-levels by real-time RT-PCR with microarray results, which showed a good correlation ( $R^2=0.90$ ). Detailed results are presented in Table 5. Of the 72 values obtained by real-time RT-PCR, 75% (54) showed concordant statistical significance or non-significance with microarray analysis. Over 97% (70) of the sample-sets showed changes in the same direction with both methods. Thus, there was good agreement overall.

#### 3.4.4. *Western-Blot Results*

Western-blot analysis was performed on 8 selected proteins. Figure 10 presents representative blots. Table 6 compares the mean results of Western-blot analysis to corresponding microarray findings. Statistical congruence (significant changes in the same direction for both protein and mRNA or no significant change in either) was seen for 23/32 (72%) of data sets. Of the remaining 9 cases of statistical non-convergence (significant for one but

nonsignificant for the other), the values for 6 of them were of the order of  $\pm 25\%$  of each other. Although there was good overall and qualitative agreement between mRNA-expression and protein-expression changes, some quantitative differences existed, particularly for secreted proteins (e.g. IL1-Ra and collagen-3 alpha-1 chain show larger mRNA than protein changes).

### **3.5. Discussion**

In this study, we compared mRNA-expression changes in LA and LV over two weeks of VTP-induced CHF in the dog. The results show striking discrepancies in the atrial versus ventricular response, time-dependant evolution of expression-changes and alterations in chamber-selective gene-expression profiles.

#### *3.5.1. LA-LV Gene-Expression Differences With and Without HF*

A variety of investigators have noted substantial gene-expression differences between atrial and ventricular tissues of mouse [16], dog [17] and human hearts [12, 18, 19]. A particularly detailed analysis was reported by Barth *et al.* [18]. They used a commercially-available microarray directed towards 11,740 transcripts to compare gene expression between 17 right-atrial (RA) appendages from patients undergoing open-heart surgery with LV transmural tissue-slices from 5 non-failing donor hearts. At a false-discovery rate of  $<0.03$ , they found differences in 6,274 transcripts (53% of probe-sets available), with 3,300 being more strongly-expressed in atrium and 2,974 in ventricle. They noted stronger expression of genes related to metabolism in LV and a

predominance of genes involved in signal transduction and apoptosis in atrium, findings similar to ours. The overall number of atrial-ventricular differences that they observed is similar to what we noted with a similar statistical-significance cut-off (data not presented here) and the balance between atrial-predominant and ventricular-predominant genes is similar in our study compared to theirs.

We are not aware of previous studies that analyzed the evolution of atrial-ventricular gene-expression differences with the development of CHF. Barth *et al* noted that in atria of AF patients upregulation occurred predominantly in “ventricular-predominant” genes and down-regulation in “atrial-predominant” genes, producing a “ventricularization” of the atrial gene-expression profile [12]. We noted a similar type of phenomenon, with the number of statistically-significant LA-LV gene-expression differences decreasing with the advent of CHF (Figure 6). A total of 1273 of the 1599 of genes with significantly-differential LA-LV expression in shams were no longer significantly different at 2-wk VTP, presumably mostly because of LA expression changes (since few statistically-significant changes occurred in LV). On the other hand, 1086 genes that were LA-LV equivalent in shams showed significant LA-LV differences at 24-h VTP and 576 at 2-wk VTP. Thus, it seems that CHF greatly reduces the LA-LV gene-expression differences that are present in the normal heart, only to replace them by a range of pathological responses with some degree of chamber-selectivity.

### 3.5.2. *Gene-Expression Changes in CHF and Differential Atrial-Ventricular Response*

CHF produces deterioration in cardiac function and significant reprogramming of cardiac gene-expression. Barrans *et al.* found over 100 of 10,848 expressed sequence-sequence tags to be changed >1.5-fold in LVs of patients with end-stage cardiomyopathy [20]. Relatively few studies have compared atrial versus ventricular gene-expression changes in CHF. Kääb *et al.* studied human atrial and ventricular gene-expression response differences by comparing 8 terminally-failing ischemic and dilated cardiomyopathic hearts with 5 non-failing donor hearts via microarray-analysis.<sup>4</sup> They found about twice as many significantly-changed genes at the atrial level, and noted a predominance of down-regulated genes (103) compared to upregulated (13) in the ventricles. We similarly found a predominance of gene downregulation in the LV (Figure 7B), and although there was a much greater quantitative discrepancy we also noted a stronger gene-response to CHF in the atrium versus ventricle. Kääb *et al.* noted that only ~7% of significantly-changed genes were common to both atria and ventricles, a figure of similar order to that which we noted (~2%).

We were unable to identify studies comparing directly atrial with ventricular gene-expression profile changes in animal CHF models. Gao *et al.* used human gene microarrays to compare ventricular gene-expression between 4 normal dogs and 4 dogs with terminal CHF caused by 4-wk VTP [6] (atrial gene-expression was not assessed). They noted a much larger number of statistically-significant ventricular gene-expression changes in CHF, over 1000, once again with about 20 times as many genes (971) down- as up- (49)

regulated. Like us, they found down-regulation of metabolic pathways and transport genes. The discrepancy in the number of statistically-significant ventricular gene-expression changes between their study and ours is likely due to the fact that they studied dogs with terminal CHF after 4-wk VTP (LVEDP~30), whereas our dogs had less severe decompensation with a maximum of 2-wk VTP.

### 3.5.3. *Extracellular Matrix Remodeling*

Extracellular matrix (ECM) remodeling is of particular importance in creating the AF substrate in CHF [2, 3, 5, 7-11]. ECM-related genes showed dramatically-different remodeling in LA versus LV. About 150 LA ECM-transcripts were significantly altered at 2-wk VTP, compared to 2 at the LV level. Some notable examples include highly-significant ~20 and ~65-fold increases in LA collagen-3 and collagen-1 genes respectively, versus non-statistically significant 4.5 and 7.9-fold increases in the LV. LA fibronectin gene-expression increased significantly by ~12 and ~18-fold at 24-h and 2-wk VTP, while LV fibronectin averaged ~1.5 and ~2.7 times sham values at 24-h and 2-wk VTP (P=NS for both). Tissue-inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) was ~6-fold increased in LA at 24-h but not 2-wk VTP, whereas matrix metalloproteinase-9 (MMP9) was increased ~6-fold at 2-wk but not 24-h VTP; neither were significantly altered in LV. These important ECM-gene expression differences parallel and account for the much greater fibrotic response of atrial versus ventricular tissue in this model [5].

#### 3.5.4. *Metabolism*

The failing myocardium is characterized by an important reduction in high-energy phosphate and phosphotransferase enzymes such as creatine kinase. The single largest group of LV gene-changes occurred in genes involved in metabolism. Although most metabolism-related genes were down-regulated, the creatine-kinase B (CK-B) gene showed striking 8-fold up-regulation at 2-wk VTP. The creatine kinase isoenzyme CK-B is involved in the formation of the active forms CK-BB and CK-MB. Previous studies have shown that the activity of the CK-MM isoform is decreased by ~30%, but the activity of the CK-MB isoform is at least two-fold higher in the failing heart, correlating with a 5-fold increase in CK-B isoenzyme in the ventricles [21, 22].

Gao *et al* noted down-regulation of ventricular genes involved in energy production in end-stage VTP-induced CHF [6]. We also observed marked decreases in components of the respiratory chain complex-I (CI), II (CII) and III (CIII). NADH dehydrogenase Fe-S proteins 3 and 8 (CI), succinate dehydrogenase complex. (CII) and ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase (CIII) all showed reduced expression at 2-wk VTP in both atria and ventricles. NADH and succinate dehydrogenase produce reduction reactions that create a  $H^+$ -electrochemical gradient toward the inner mitochondrial membrane. These  $H^+$ -ions are driven back into the mitochondrial matrix via ATP-synthase and allow the production of ATP. Respiratory-chain systems also play an important role in regulating oxidative stress and thereby apoptosis, which is of great importance in CHF progression [23, 24].

### 3.5.5. $Ca^{2+}$ -Signaling

Remodeling of  $Ca^{2+}$ -handling is emerging as an important pathophysiological paradigm in atrial and ventricular arrhythmogenesis related to heart disease [25]. Key components include the calmodulin/ $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein-kinase-II (CaMKII) and ryanodine receptor-FKBP12/12.6 systems [25-27]. Of the relatively small number of LV genes up-regulated at 2-wk VTP, FKBP12 and calmodulin are prominent. FKBP12 was also increased in LA at 24-hr and 2-wk VTP.

### 3.6. *Potential Significance*

The present study is, to our knowledge, the first systematic assessment of atrial versus ventricular mRNA-expression remodeling differences in an animal CHF model. In addition, we made comparisons over time that allowed us to identify the dynamic development of gene-expression changes. Our findings show a striking difference between the LA and LV response, which sheds light on previously-noted differences between the atrial and ventricular neurohumoral responses, apoptosis, inflammation, cell-death and fibrosis in the same model [5]: the LA changes peaked much earlier and were up to 10-fold greater in magnitude compared to LV [5]. Taken together with the results of previous work, our findings suggest that the rapidly-developing CHF associated with tachycardiomyopathy places a particularly great burden on the atria. The differential gene-response must reflect strongly-induced programs of atrial adaptation to a very major stress. Further work designed to clarify the atrial-

remodeling programs may help in the development of novel approaches to preventing atrial arrhythmogenic substrate development, an important evolving theme in AF therapeutics [28]. The relatively limited number of LV gene-expression changes likely reflects a greater capacity of the ventricles to cope with a tachycardic stress and is consistent with previous observations of dramatic ventricular recovery upon termination of tachypacing. Interestingly, although hemodynamic function and ventricular dimensions recover completely following the cessation of VTP, atrial structural remodeling remains, as does a persistent substrate that can sustain AF [29, 30].

### ***3.7. Potential Limitations***

Atrial and ventricular remodeling could affect the expression of the control genes we used (18-S rRNA and GAPDH) but this proved not to be the case in the present study. Gene-expression changes are only part of the adaptive response to a stressor- important components not considered in the present study include wide-scale changes in protein expression, as well as in protein processing, membrane trafficking and post-translational regulation, all of which certainly must have occurred and played important roles. The time-points we examined were selected based on previous evidence for important early-phase changes at 24 hours and near steady-state late-phase changes at 2 weeks of VTP-induced remodeling, particularly at the atrial level [5, 13]. However, other time points would be interesting to study, particularly as ventricular function deteriorates rapidly towards terminal CHF. The model that we used (VTP) is widely-employed and mimics well some forms of clinical CHF [31];

however, observations of LA versus LV remodeling in other clinically-relevant experimental paradigms might provide different results and would be of great interest.

### *3.8. Acknowledgments*

Supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Quebec and Heart and Stroke Foundation. SC received a Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) studentship and Sabrina Le Bouter FRSQ-INSERM and HSFC fellowships. The authors thank Nathalie L'Heureux, Chantal Maltais and Chantal St-Cyr for technical help and France Thériault for secretarial support.

### 3.9. References

- [1] Jessup M, Brozena S. Heart failure. Review. *N Engl J Med* 2003;348:2007-18.
- [2] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Cardin S, Pelletier P. Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance. *Curr Opin Cardiol* 2005;20:21-5.
- [3] Brundel BJ, Melnyk P, Rivard L, Nattel S. The pathology of atrial fibrillation in dogs. *J Vet Car* 2005;7:121-9.
- [4] Kaab S, Barth AS, Margerie D, Dugas M, Gebauer M, Zwermann L, *et al* . Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure. *J Mol Med* 2004;82:308-16.
- [5] Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004;63:236-44.
- [6] Gao Z, Xu H, DiSilvestre D, Halperin VL, Tunin R, Tian Y, *et al* . Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:76-86.

- [7] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel B, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 2005;48:9-28.
- [8] Shinagawa K, Shi Y-F, Tardif J-C, Leung T-K, Nattel S. Dynamic nature of the atrial fibrillation substrate during development and reversal of the heart failure in dogs. *Circulation* 2002;105:2672-8.
- [9] Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, *et al* . Dissociation between ionic remodelling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004;109:412-8.
- [10] 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.
- [11] Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, *et al* . Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000;101:2631-8.
- [12] Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, *et al* . Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res* 2005;96:1022-9.

- [13] Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung T-K, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: Angiotensin-dependent and independent pathways. *Cardiovasc Res* 2003;60:315-25.
- [14] Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshta-Takeshita A, Le Meur N, *et al* . Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. *Circ Res* 2007;100:425-33.
- [15] Xiao L, Zhang L, Han W, Wang Z, Nattel S. Sex-based transmural differences in cardiac repolarization and ionic-current properties in canine left ventricles. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2006;291:H570-80.
- [16] Tabibiazar R, Wagner RA, Liao A, Quertermous T. Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ Res* 2003;93:1193-201.
- [17] Zhao XS, Gallardo TD, Lin L, Schageman JJ, Shoheit RV. Transcriptional mapping and genomic analysis of the cardiac atria and ventricles. *Physiol Genomics* 2002;12:53-60.
- [18] Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, *et al* . Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression. *Pflugers Arch* 2005;450:201-8.

- [19] Ellinghaus P, Scheubel RJ, Dobrev D, Ravens U, Holtz J, Huetter J, *et al* . Comparing the global mRNA expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1383-90.
- [20] Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew CC. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol* 2002;160:2035-43.
- [21] Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, *et al* . Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 1996;94:1894-901.
- [22] Heinke MY, Wheeler CH, Yan JX, Amin V, Chang D, Einstein R, *et al* . Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. *Electrophoresis* 1999;20:2086-93.
- [23] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, *et al* . Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999;85:357-63.

- [24] Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res* 2001;89:198-200.
- [25] Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y-H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: Heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007;87:425-56.
- [26] Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in heart failure. *Circ Res* 2005;97:1314-22.
- [27] Anderson ME. Calmodulin and the philosopher's stone: Changing  $Ca^{2+}$  into arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:195-7.
- [28] Camm AJ. Medical management of atrial fibrillation: state of the art. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17(Suppl 2):S2-6.
- [29] Shinagawa K, Shi Y-F, Tardif JC, Leung T-K, Nattel S. Dynamic nature of atrial fibrillation substrate during development and reversal of heart failure in dogs. *Circulation* 2002;105:2672-8.

- [30] Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, *et al* . Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004;109:412-8.
- [31] Moe GW, Armstrong P. Pacing-induced heart failure: a model to study the mechanism of disease progression and novel therapy in heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;42:591-9.

**TABLE IV. Hemodynamic and Electrophysiological Changes**

	<b>Sham</b>	<b>24-hrs VTP</b>	<b>2-wks VTP</b>
<b>Pressures (mmHg)</b>			
<b>Systolic-arterial</b>	136±7	109±16*	108±15*
<b>Diastolic-arterial</b>	90±5	68±9*	70±12*
<b>LV End-diastolic</b>	1±1	5±2	16±5**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus sham.

**TABLE V. Comparison Between mRNA Expression by Microarray versus Taqman Real-time RT-PCR**

	Gene ID	24-hrs LA		2-wks LA		24-hrs LV		2-wks LV	
		Real-Time	Genechips	Real-Time	Genechips	Real-Time	Genechips	Real-Time	Genechips
<b><i>Signal transduction</i></b>									
Calmodulin	1604374	1.46±0.17	0.99±0.02	1.68±0.20	1.19±0.12*	1.80±0.46	1.27±0.11	2.24±0.48	1.89±0.11*
<b><i>Apoptosis</i></b>									
p53	1582452	1.83±0.44	1.06±0.05	1.52± 0.24	0.97±0.05	1.25±0.32	1.16±0.05	1.46±0.26	1.12±0.09
Cathepsin S	1582636	14.02±5.36	5.71±1.65*	9.64± 4.19	6.98±1.75*	0.68±0.25	0.99±0.11	0.98±0.34	1.28±0.19
Caspase 1	1582623	10.69±4.14	2.53±0.52*	5.33± 2.36	1.82±0.50	0.72±0.41	0.85±0.05	0.81±0.27	0.79±0.03
<b><i>Cell structure and mobility</i></b>									
Smooth muscle gamma actin	1586210	2.39±0.44	3.39±0.52**	6.45±3.60*	5.66±2.95	1.16±0.21	1.37±0.22	1.64±0.48	1.88±0.37
Skeletal myosin light chain 2	1583107	0.50±0.03*	0.66±0.03**	0.51±0.05*	0.66±0.04**	1.16±0.16	1.18±0.10	1.01±0.27	1.32±0.32
<b><i>Extracellular matrix</i></b>									
TIMP-1	1582383	7.62±2.36	5.85±1.72*	8.91±3.57	6.53±1.84*	1.28±0.88	1.01±0.45	1.23±0.46	1.09±0.09
MMP-2	1582764	1.33±0.31	1.07±0.18	8.17±1.38**	4.46±0.34**	1.55±0.64	1.15±0.14	2.36±1.23	2.01±0.51
Fibronectin	1582768	20.19±7.15*	10.70±2.33*	23.67±7.68*	16.20±2.62*	1.68±0.84	1.49±0.32	2.04±0.46	2.75±0.42
			*	*	*				
Collagen alpha 1(III) chain prec.	1591762	3.77±0.98	2.27±0.61	36.93±7.83*	20.18±1.54*	1.41±0.80	1.83±0.61	2.75±1.11	4.46±1.11
				*	*				
<b><i>DNA-RNA synthesis</i></b>									
TFIIS	1585822	0.64±0.07	0.65±0.09*	0.52±0.14	0.51±0.06**	1.55±0.48	0.88±0.04	1.06±0.33	0.74±0.03*
EFTU	1583725	1.26±0.14	1.25±0.14	0.66±0.10	0.72±0.09*	1.50±0.34	1.00±0.07	0.85±0.16	0.80±0.09
<b><i>Immunity</i></b>									
Von Willebrand factor (VWF)	1582505	1.43±0.20	1.42±0.24	2.63±0.35**	2.54±0.18*	2.11± 0.58	1.21±0.33	2.78±0.51	1.91±0.27
Integrin beta-1	1591346	2.41±0.32**	1.97±0.21**	1.33±0.07	1.09±0.05	0.79±0.29	0.57±0.05*	0.67±0.17	0.62±0.04*
FLAP	1601853	12.83±4.28*	3.32±0.58**	12.37±3.47*	4.70±0.74**	1.23±0.52	1.19±0.10	1.02±0.27	2.47±0.29*
IL1-Ra	1582494	5.80±2.36	3.42±1.15	15.24± 8.58	9.94±3.36*	0.37±0.18	0.60±0.05	1.49±0.88	0.65±0.05
<b><i>Ion transport</i></b>									
HERG	1582833	0.57±0.04	0.76±0.04**	0.87±0.13	1.00±0.07	1.85±0.45	1.31±0.03*	1.13±0.19	1.33±0.18
Kchip-2	1582775	0.31±0.07**	0.36±0.06**	0.13±0.03*	0.17±0.03**	1.14± 0.35	0.57±0.12	0.72±0.17	0.48±0.04
<b><i>Metabolism</i></b>									
Cytochrome c oxidase subunit	1583218	2.26±0.43	1.84±0.15**	1.75±0.14**	1.64±0.04**	0.99±0.21	0.96±0.13	1.21±0.25	1.15±0.07

Vla

---

\* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$  versus sham dogs. 24-hrs LA VTP; 2-wks LA VTP=dogs ventricular-tachypaced for 24 hours in left atria and 2 weeks respectively; 24-hrs LV VTP and 2-wks LV VTP= dogs ventricular-tachypaced for 24 hours in left ventricle and 2 weeks respectively.

TABLE VI. Comparison Between Microarray and Western Blot Results

Protein	Gene ID	Group	Microarray	Western Blot (mean)	SEM	<i>P</i> versus CTL
<b>Calmodulin</b> Signal transduction	1604374	24-hrs LA	0.99	1.35*	0.08	0.014
		2-wks LA	1.19	1.37	0.25	0.111
		24-hrs LV	1.27	1.22	0.21	0.172
		2-wks LV	1.89*	1.65*	0.151	0.017
<b>P53</b> Apoptosis	1582452	24-hrs LA	1.06	0.86	0.15	0.271
		2-wks LA	0.97	0.98	0.29	0.922
		24-hrs LV	1.16	0.97	0.1	0.368
		2-wks LV	1.12	1	0.13	0.488
<b>Cathepsin L</b> Apoptosis	1583225	24-hrs LA	0.59**	0.56	0.23	0.082
		2-wks LA	1.21	0.34*	0.15	0.004
		24-hrs LV	0.78	0.96	0.15	0.381
		2-wks LV	1.07	1.06	0.06	0.184
<b>Collagen 3 <math>\alpha</math>1</b> Extracellular matrix	1591762	24-hrs LA	2.27	0.87	0.34	0.647
		2-wks LA	20.18**	1.79*	0.29	0.035
		24-hrs LV	1.83	0.91	0.05	0.075
		2-wks LV	4.46	1.09	0.15	0.267
<b>MMP-2</b> Extracellular matrix	1582764	24-hrs LA	1.07	1.73	1.13	0.443
		2-wks LA	4.46**	6.16*	2.4	0.047
		24-hrs LV	1.15	1.27	0.15	0.088
		2-wks LV	2.01	1.22	0.25	0.195
<b>FLAP</b> Immunity	1601853	24-hrs LA	3.32**	2.16*	0.45	0.037
		2-wks LA	4.70**	4.57**	1.45	0.048
		24-hrs LV	1.19	0.96	0.12	0.37
		2-wks LV	2.47*	1.38	0.18	0.063
<b>IL1-RA</b> Immunity	1582494	24-hrs LA	3.42	1.46*	0.14	0.026
		2-wks LA	9.94*	1.50*	0.18	0.032
		24-hrs LV	0.6	0.57*	0.07	0.01
		2-wks LV	0.65	0.62*	0.06	0.013
<b>KCHIP2</b> Transport	1582775	24-hrs LA	0.36**	0.24*	0.07	0.009
		2-wks LA	0.17**	0.12*	0.01	0
		24-hrs LV	0.57	0.44*	0.08	0.007
		2-wks LV	0.48	0.35*	0.06	0.002

\* Statistically significant difference; *P* versus CTL indicates *P* value for difference

from control protein expression (Western blot). Microarray results, \*\* statistically

significant  $Q < 1$ , \*  $Q < 5$ . Dark grey=significant on both Genechip and Western;

Light Grey=non-significant on both.

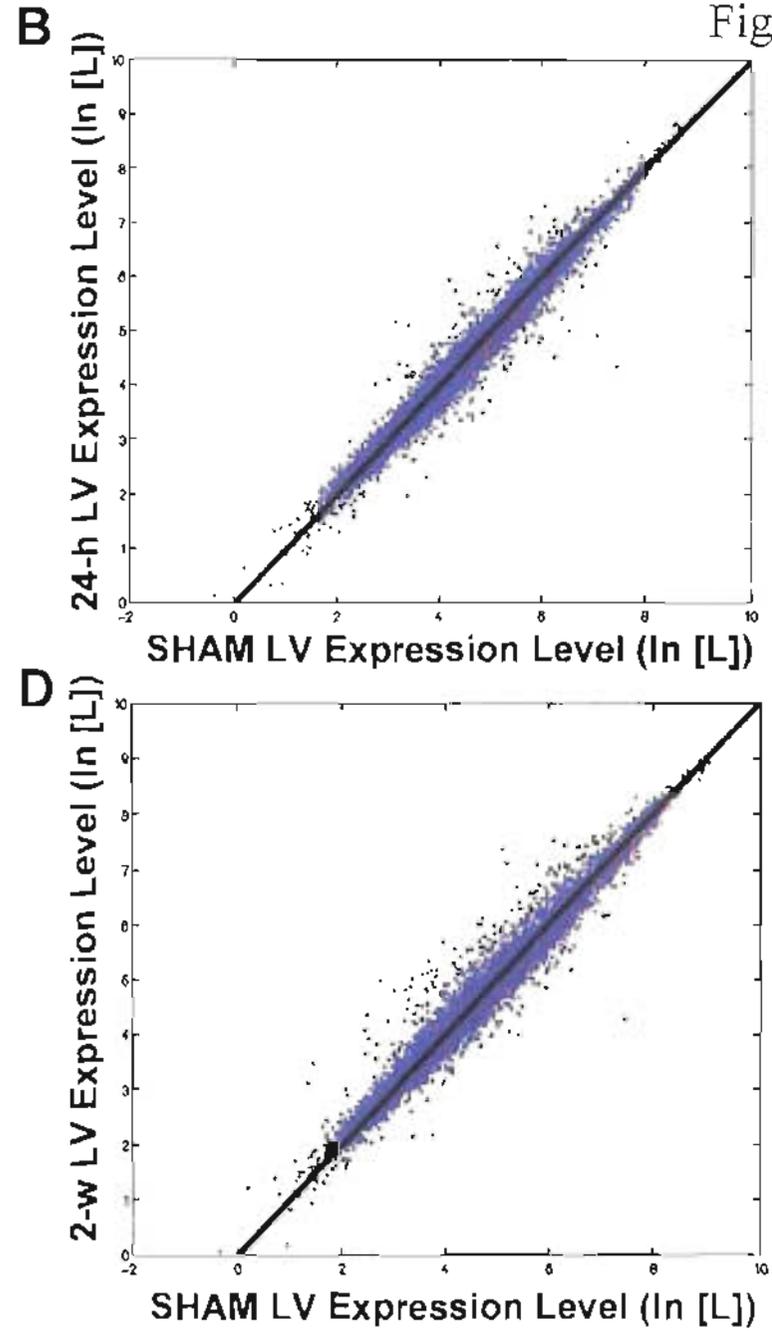
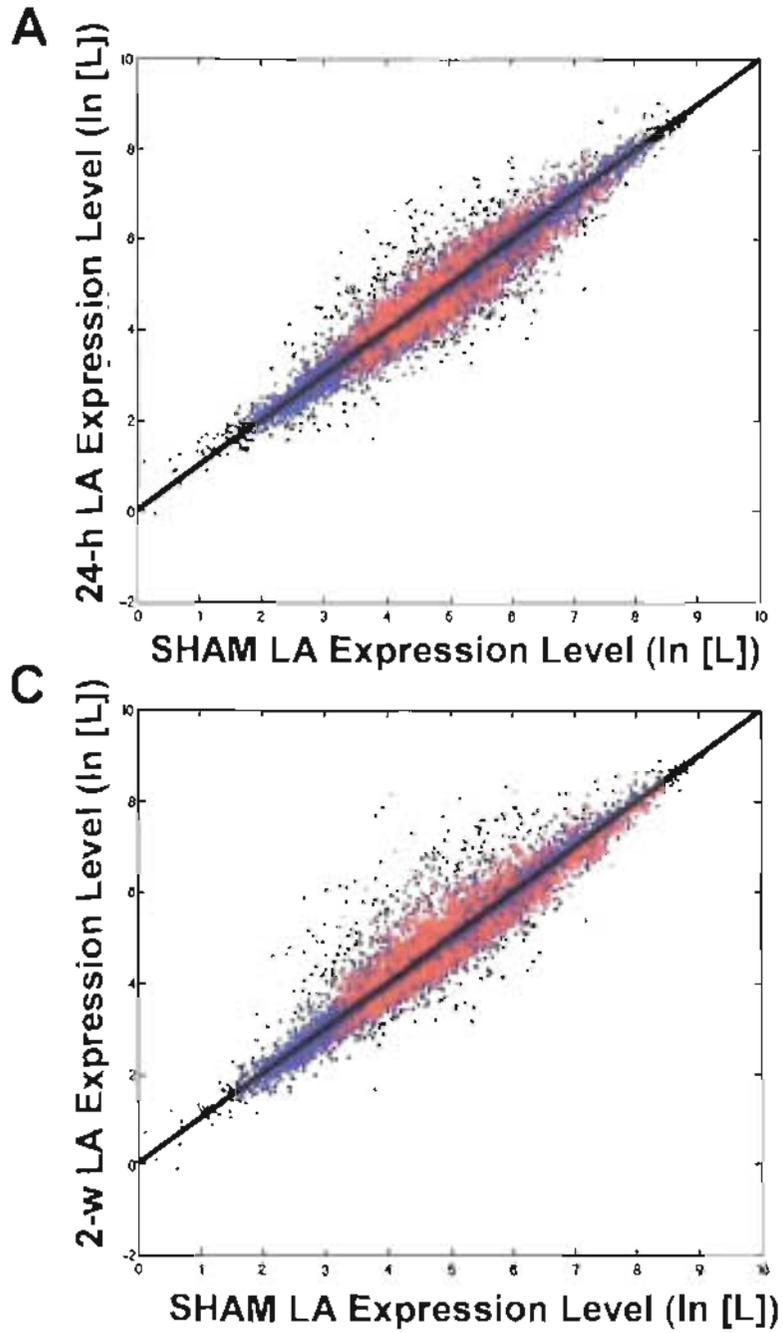


Figure 5

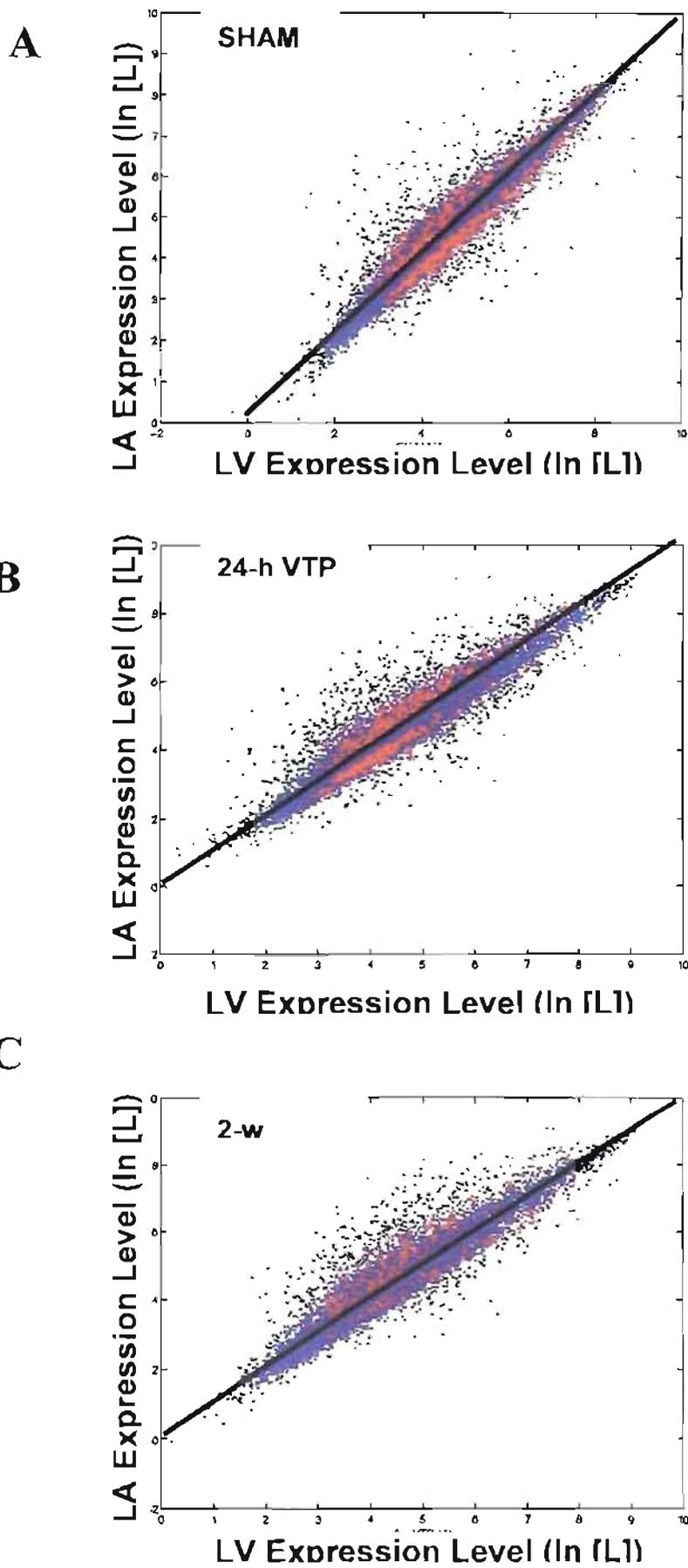


Figure 6

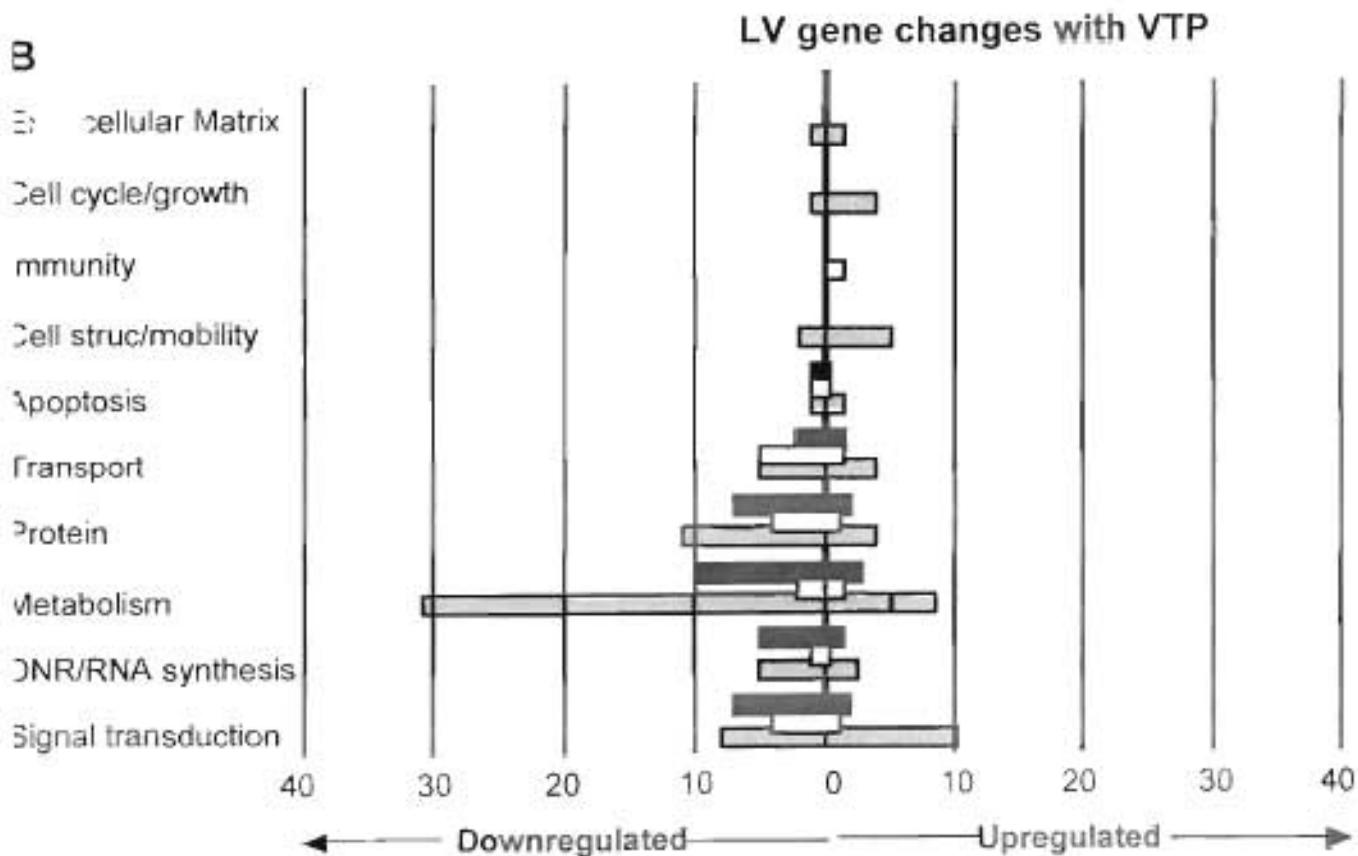
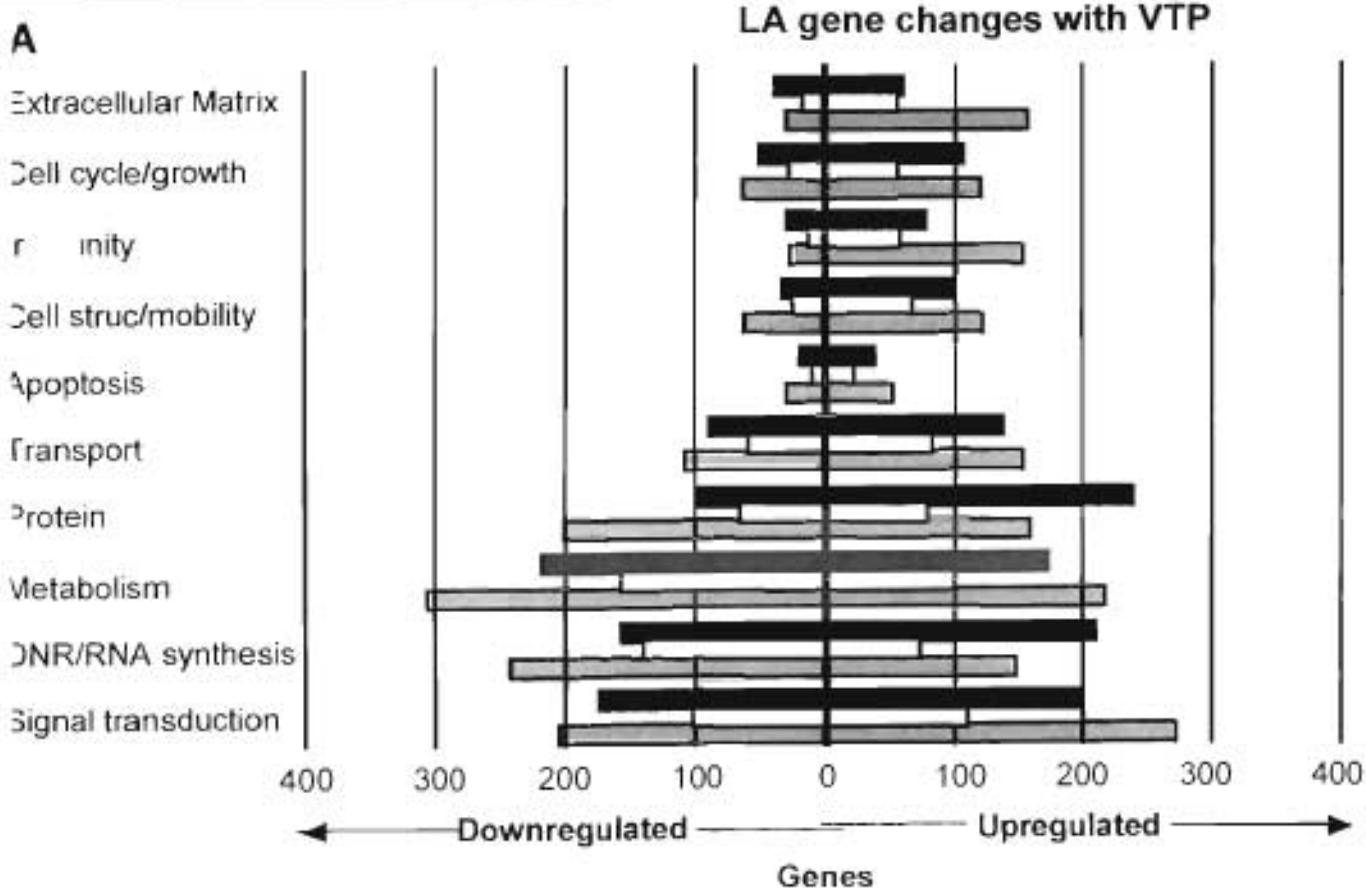


Figure 7

24-hour VTP
  2-week VTP
  Overlap

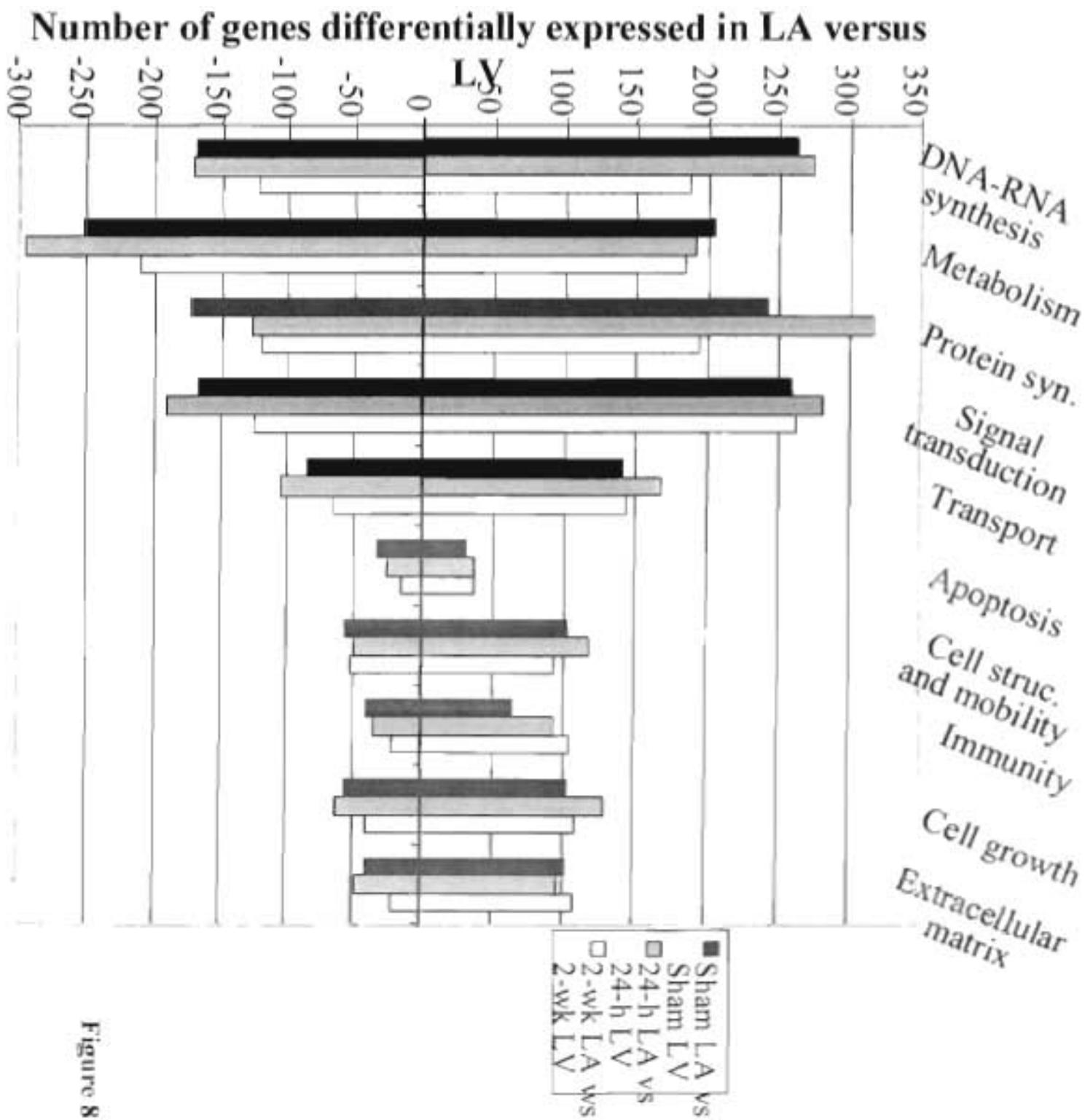
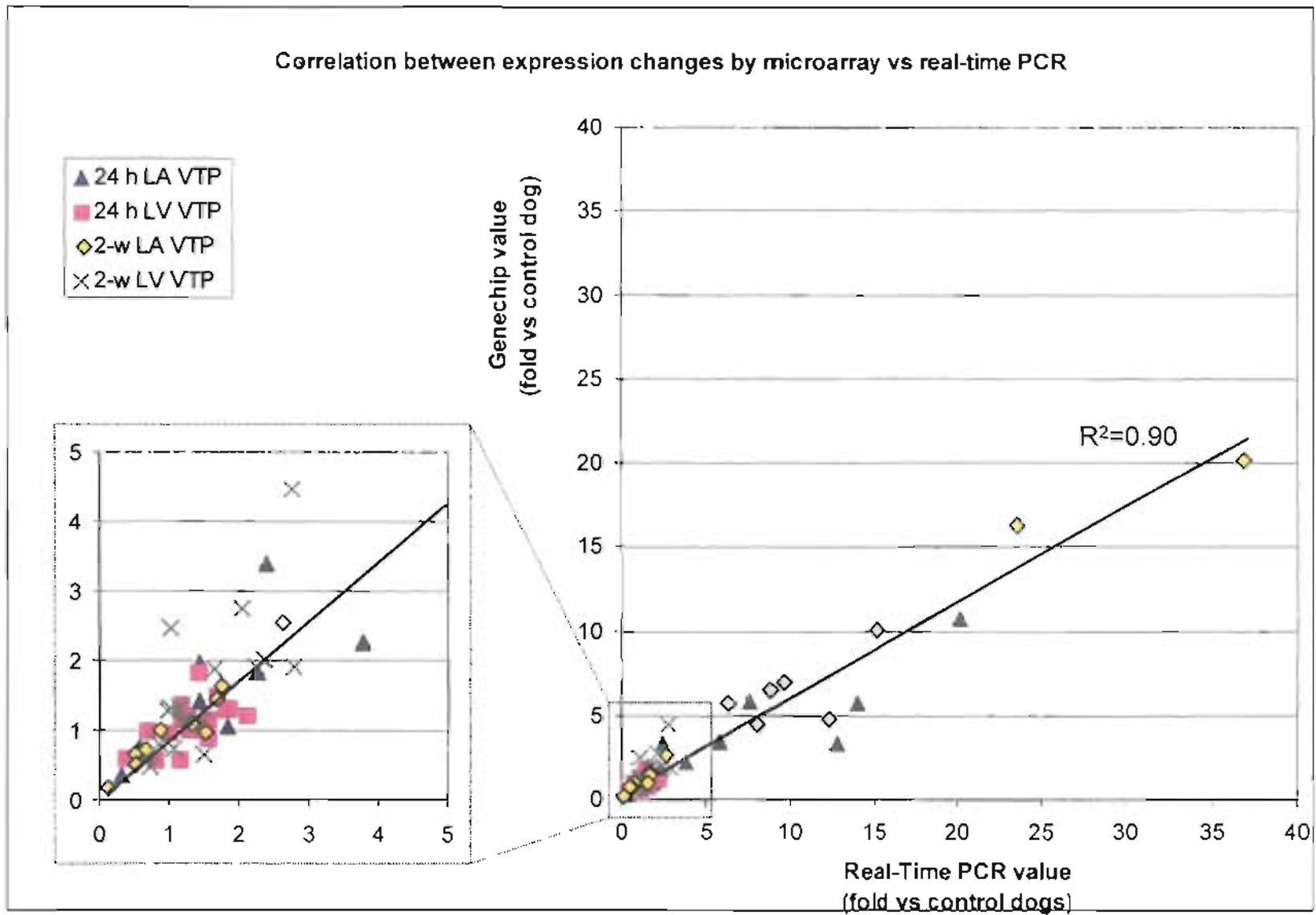


Figure 8

**Figure 9**

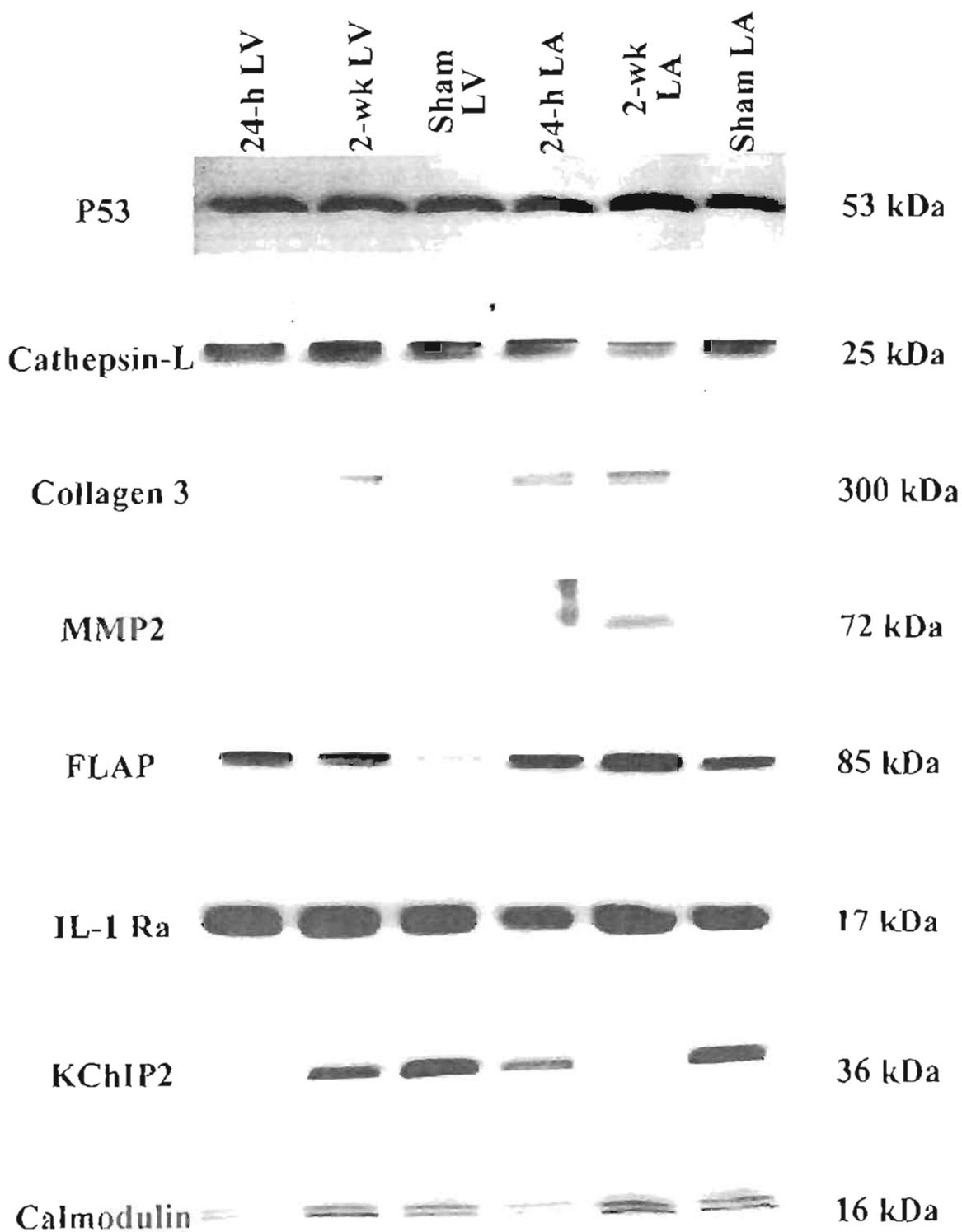


Figure 10

**Table VII. Gene specific primers and Taqman probes Sequences used in Real-time PCR analysis**

<b>Assay ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Forward Primer Sequence</b>	<b>Reverse Primer Sequence</b>	<b>Probe sequence</b>
1604374	Calmodulin	GGCTGACCAGCTGACTAG	CGTCCTTGTCAAAGAGGGAGAAG	CTTGA ACTCTGCAATCTG
1582623	Caspase 1	CAAACCGAAGGTCATCATCATCCA	AGTCGCTGACCCACAGTTC	CAGAGGTGAAAATCCTG
1582636	Cathepsin S	TGGAACACTCAATGGGAATGCA	CAGGGAACCCATCAAAGATATCACT	CACCAGTCATGTCTCCC
1591762	Collagen alpha 1 (III) chain prec.	GGACCTCAAATTCTGCCATCCA	CTTTGATCGCATCCA ACTTGCA	CAGTACTCTCCGCTCTT
1583218	Cytochrome c oxydase subunit Vla	GTATGATTACCATCTCCCCAGGGA	CATCGCCTACCCCCATCTC	CAGGTCCAAGCCCTT
1585822	Elongation factor TFII S (EF- TFIIS)	TCTTATGCAATGAATGTGGCAATCG	CCTCACCTTGTTCACTGAAATCCT	CTATCAGCAGAACTTCC
1583725	Elongation factor TU (EFTU)	TGACCGCGGCCATCAC	CCTCGGGCTCGTTCTTTCAG	CTCGGGCTAAAATCTTG
1582768	Fibronectin	GTTCCGGGAGGAGGTTGTTACC	GAGTCATCTGTAGGCTGGTTTAGG	CCTTGGTCCACAGAGT
1591346	Integrin beta-1 binding protein 2	GCAGAGTTGGTAGGCATGACT	GCCAATCATGACGGCAAGATG	CTGGCAGCTGCTTCC
1582494	IL1-Ra	GGGAAGAGACCTTGCAGGAT	TGTTATTCTCAGGTAGAAGGTCTT	CAAGCCTTCAGAATCT
1601853	5-lipoxygenase activating protein (FLAP)	GCCTTTGAGCGGGTCTACA	CCAGAGCACAACAAGGAAAGTG	CTGCCAACCAAAACT
1582764	Matrix Metalloproteinase-2 (MMP- 2)	GGAGCAAGAACAAGAAGACCTACAT	CCAGGATCCATCTTCTTCTTGACTT	CAAGTTCTGGAGATACAA
1582452	p53 protein (p53)	ACTGAGGAGGAGAATTTCCACAAGA	TCCATCTAGTGGCTTCTTCTTTTGC	CAAGCGAGCACTGC
1582833	Potassium channel HERG	AGCAGCGACACCTGTAACC	CAGAAGCTGAAGATGTTGGACACT	CTGTCAGGCGCCTTC
1582775	Potassium channel Kchip-2	CCTCAACAAGGATGGCTGCAT	AGGTATACTTGCCCATCATGTCATAGA	CCAAGGAGGAAATG
1583107	Skeletal myosin light chain 2	CGCAGTGTGACCGCTTCT	GCAAATGTTCTTGTAGTCCACGTT	ATGTTCTGATCTCCTC
1586210	Smooth muscle gamma actin	CCTCCAATCCAGACTGAGTACTTC	CAGGATGCAGAAGGAGATCACA	CATGAAGATCAAGATAT
1582383	Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP1)	CCGCAGCGAGGAGTTTCT	CGAAACTGCAGGTGTTGATCTG	CAGGTTTCCGGCGACC
1582505	Von Willebrand factor (VWF)	CATTCAGCTAAGAGGAGGACAGATC	ACAGCCATCCTGGATAGTCTCAT	ATGACACTGAAGCGTG

**Table VIII. List of Antibodies****Primary antibodies used:**

<i>Protein</i>	<i>Primary antibody</i>	<i>Compagny</i>	<i>Catalog number</i>	<i>Lot</i>
Collagen type III	Mouse	Chemicon	MAB3392	23110303
GAPDH	Mouse	RDI	RDI-TRK5G4-6C5	New lot
Cathepsin S	Rabbit	Calbiochem	219384	B57054
Calmodulin	Mouse	Upstate	05-173	30033
P53	Mouse	Chemicon Europe	CBL423	423212JF
MMP-2	Mouse	Chemicon	MAB3308	25040134
IL1-RA	Rabbit	Abcam	Ab2573	92671
FLAP	Mouse	Transduction laboratories	F82720	1
Cathepsin L	Rabbit	Biomol research laboratories	SA-362	L1658

**Secondary antibodies used:**

<i>Primary antibody</i>	<i>Secondary antibody</i>	<i>Compagny</i>	<i>Catalog number</i>	<i>Lot</i>
Mouse	Goat anti-mouse IgG	Chemicon international	AP124P	25050017
Rabbit	Goat anti-mouse IgG	Chemicon international	AP132P	2505014

### Figure legends

- Figure 5.** Overall mRNA expression-changes compared to sham at 24-h VTP in LA (A) and LV (B), and at 2-wk VTP in LA (C) and LV (D) samples. The absolute expression, in  $\log(L)$ , where  $L$ =mean sample luminescence, of each intervention-group gene is plotted as a function of the corresponding value for the VTP-sham group gene and represented as a single point. Red points are significantly different from sham-controls ( $Q < 5$ ) whereas blue points are not significantly different. Without any changes in mRNA-expression, all points would fall on the black line of identity.
- Figure 6.** Total number of genes of each functional group for which mRNA was significantly. Down- or up-regulated by atrial-tachycardia remodelling (left) or ventricular-tachycardia remodelling (right). “Overlap” refers to the number of genes that were significantly affected in the same direction at both 24-hrs and 2-wks.
- Figure 7.** Changes in mRNA expression in LA compared to LV in shams (A), 24-h VTP (B), and 2-wk VTP (C) samples. Format as in Figure 1. The absolute expression, in  $\log(L)$ , where  $L$ =mean sample luminescence, of each intervention group gene is plotted as a function of the corresponding value for the VTP-sham group gene and represented as a single point. Red points are significantly different from sham-controls whereas blue points are not significantly different. Without any changes in mRNA-expression, all points would fall on the black line of identity.
- Figure 8.** Total number of genes of each functional group for which levels were significantly different in atria versus ventricles in shams, 24h VTP or 2-wk VTP.

**Figure 9.** Correlation between expression changes by real-time PCR versus microarray or each samples, for each of 18 genes. Regression lines are shown. Many points are clustered in the <5-fold change range, which is therefore shown on an expanded scale at the left.

**Figure 10.** Examples of Western blots for 8 proteins studied to compare protein versus mRNA expression changes.

Dans l'étude faisant objet de ce mémoire, nous avons analysé et comparé les changements dans l'expression d'ARNm dans les oreillettes et les ventricules, à différents temps, dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire. Les résultats démontrent une importante évolution, dépendante du temps, dans les changements observés dans l'expression des gènes. Une remarquable différence existe dans les bases moléculaires du remodelage des chambres gauches du cœur insuffisant.

#### ***4.1 Relation avec les découvertes précédentes sur le remodelage auriculo-ventriculaire***

Plusieurs études utilisant des puces d'ADN ont été effectuées sur des patients ou des modèles animaux d'insuffisance cardiaque, mais seulement quelques unes d'entre elles comparent l'expression des gènes au niveau des oreillettes et des ventricules. À notre connaissance, cette étude est la première à comparer dans le temps l'expression des gènes au niveau de l'oreillette et du ventricule gauche, dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque et principalement, dans les cardiomyocytes.

Kääb *et al* ont démontré que 288 gènes étaient différemment exprimés dans le myocarde insuffisant comparé au myocarde normal chez l'humain. Parmi ces changements, on observait 4,5 fois plus de diminution que d'augmentation de l'expression des gènes, et les changements dans l'oreillette étaient deux fois plus nombreux que ceux observés dans les ventricules. De leur côté, Barth *et al* ont démontré, chez des patients atteints de fibrillation auriculaire, que l'expression des gènes auriculaires montrait une signature ventriculaire, c'est-à-dire que l'expression des gènes auriculaires dans un modèle de FA tendait à s'approcher de

l'expression ventriculaire normale (saine) de ces mêmes gènes.<sup>48</sup> Bien qu'elles contribuent grandement à une meilleure compréhension du remodelage et des différences auriculo-ventriculaires, ces études possèdent certains facteurs limitants tel que les difficultés d'obtenir des échantillons homogènes à partir de différents patients avec différentes causes d'insuffisance cardiaque et les différents traitements que ceux-ci ont suivi (ex. inhibiteurs ACE,  $\beta$ -bloqueurs, glycosides cardiaques) pouvant affecter le remodelage et l'expression des gènes. D'autres études ont été effectuées afin d'étudier l'expression auriculaire et ventriculaire chez des humains et des modèles animaux sains. Parmi les gènes démontrant une importante différence d'expression figurent plusieurs isoformes de l'actine et de la myosine, des protéines du cytosquelette, des facteurs de transcription ainsi que des protéines impliquées dans la régulation intracellulaire du calcium.<sup>7-9-10</sup>

Les changements observés dans le modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire sont semblables aux changements hémodynamiques, électrophysiologiques et structuraux observés dans le cœur humain insuffisant.<sup>49-50-51</sup> Hanna *et al* ont examiné les différences auriculo-ventriculaires de différents mécanismes tel que l'apoptose, la fibrose, l'angiotensine II et l'infiltration de lymphocytes dans les tissus cardiaques de chiens tachystimulés. Ils ont démontré qu'au niveau tissulaire, les changements étaient beaucoup plus importants et plus rapides au niveau de l'oreillette que du ventricule. Par contre, cette étude a été effectuée seulement au niveau de protéines spécifiques et aucune mesure d'ARNm n'a été effectuée.<sup>45</sup> Gao *et al* ont eux aussi utilisé le modèle canin d'insuffisance cardiaque et l'ont comparé aux humains et certains modèles de souris transgéniques d'insuffisance cardiaque. Ils ont étudié les différences d'expression entre le ventricule gauche et le ventricule droit, démontrant que dans l'insuffisance cardiaque en stade final comparativement au cœur normal, on observait une importante réduction de l'expression

de gènes reliés à la production d'énergie, la contraction cardiaque et la modulation de l'excitation-contraction.

Notre étude est la première, à notre connaissance, à comparer le remodelage génomique auriculaire et ventriculaire dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque en utilisant une puce d'ADN de plus de 21 700 transcrits. Nos résultats démontrent clairement une énorme différence quant au nombre et au type de gènes affectés et impliqués dans le remodelage au niveau des différentes chambres et à des temps différents. Après 24h VTP, on observe environ 100 fois plus de gènes dont l'expression est modifiée dans l'oreillette (VTP vs contrôle) par rapport au ventricule. Après 2 semaines VTP, cette différence demeure énorme (50 fois) alors que 6284 gènes présentent une différence d'expression dans l'oreillette gauche par rapport à 130 dans le ventricule gauche. En analysant le niveau d'expression des gènes de l'OG et le VG chez un même chien et pour une même durée de VTP, il a aussi été observé que l'expression des gènes dans l'oreillette et dans le ventricule est très différente chez les contrôles opérés et que cette différence tend à diminuer avec la période de VTP (soit 50% de moins après 2 semaines VTP). D'importantes différences ont été observées dans les deux chambres cardiaques relativement aux gènes de la matrice extracellulaire (ex. collagène type I alpha III augmenté 30 fois dans l'oreillette et non changé dans le ventricule), du métabolisme (créatine kinase B augmentée 5 fois dans l'oreillette et 8 fois dans le ventricule à deux semaines VTP) et de la transduction du signal (calmoduline inchangée dans l'oreillette et augmentée de 2,2 fois dans le ventricule).

#### ***4.2 Différence dans le remodelage de l'expression des gènes dans l'oreillette et le ventricule***

L'insuffisance cardiaque induite par tachystimulation ventriculaire mène à un important remodelage structurel et ionique qui ressemble à l'insuffisance cardiaque observée chez l'humain en causant une dilatation cardiomyopathique dans les deux chambres et remodèle l'oreillette d'une manière qui favorise fortement le développement de fibrillation auriculaire.<sup>44-53</sup> Nos résultats présentent de nouvelles informations au sujet de ce remodelage. Parmi les plus spectaculaires se trouvent les gènes de la matrice extracellulaire qui présentent un remodelage très différent dans les deux chambres. La fibrose a été identifiée comme une importante cause d'arythmie à la fois dans le ventricule et l'oreillette en causant des bris de conduction qui stabilisent la réentrée et encourage la fibrillation. Dans le modèle d'IC induit par VTP, après 2 semaines de VTP, il a été démontré que la fibrose est plus présente ( $10 \pm 1\%$ ) dans l'oreillette que dans le ventricule ( $0,4 \pm 0,1\%$ ).<sup>45</sup> Ceci est en accord avec nos résultats puisque plusieurs gènes important dans le développement de fibrose présentent un niveau d'expression augmenté dans l'oreillette et non dans le ventricule. La majorité de ces changements apparaissent dans l'oreillette après 2 semaines, moment où la fibrose est très présente, et sont absents à 24 heures alors que la fibrose n'a pas encore commencé à se développer de manière significative. Par exemple, l'expression de gènes codant pour 9 différentes protéines de collagène est dramatiquement augmenté à deux semaines mais inchangés (ou beaucoup moins changées) à 24h et complètement inchangé dans les ventricules aux deux temps d'étude. D'autre part, les gènes impliqués dans la réponse aiguë du développement de la fibrose, tel que la fibronectine, sont augmentés dès les premières 24h de VTP. De plus, une évidence que les cardiomyocytes jouent un rôle important dans le remodelage cardiaque est qu'en plus de moduler le niveau d'expression du collagène et de la

fibronectine, on observe des changements dans l'expression de certaines métalloprotéases de la matrice extracellulaire (entre autre MMP-2) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP-1 augmenté de 6 fois et TIMP-2 de 2 fois à 2 semaines alors que TIMP-3 est diminué à 0,5 fois et 0,8 fois à 24 heures et 2 semaines respectivement). Cela corrèle avec le fait que le développement de fibrose est beaucoup plus important dans l'oreillette que dans le ventricule et joue un rôle important dans le développement et la maintenance de la FA .<sup>45</sup>

Tel que discuté dans le papier de Cardin *et al* , projet de recherche auquel l'auteur du présent mémoire a participé activement pendant sa maîtrise, le TGF $\beta$  a été identifié comme étant un important facteur profibrotique.<sup>54-55</sup> Pour continuer l'étude du développement de la fibrose, nous avons utilisé le « Human Protein Reference Database » et par la suite, le BLAST pour identifier un total de 214 gènes présents sur les puces d'ADN utilisées et codant pour des protéines qui interagissent avec le TGF- $\beta$ . Parmi ces gènes, 85 gènes sont différemment exprimés avec une valeur Q<1 dans l'oreillette alors qu'aucun de ces 214 gènes ne présente de changement de niveau d'expression dans le ventricule.

En contraste avec le remodelage auriculaire, le remodelage ventriculaire présente un nombre de changements beaucoup moins élevé. Parmi les plus importantes catégories de gènes les plus affectées figurent le métabolisme et la signalisation cellulaire. Le myocarde défaillant est caractérisé par une importante réduction de phosphates riche en énergie et d'enzymes de phosphotransferts tel que la créatine kinase. Dans la présente étude, le gène présentant le changement le plus dramatique dans le ventricule est la créatine kinase B (CK-B) avec augmentation de 8 fois dans le ventricule à 2 semaines VTP. Ce gène est aussi augmenté à 24h et 2 semaines dans l'oreillette (3 et 5 fois respectivement). L'isoenzyme de la créatine

kinase CK-B est impliquée dans la formation des formes actives CK-BB et CK-MB de créatine kinase. Les changements du niveau de CK-B dans la myocarde surviennent avec les changements de stress de la paroi cardiaque et sont probablement régulés par une régulation post-transcriptionnelle complexe. Des études précédentes ont démontré que l'activité de l'isoforme CK-MM est diminuée de 30% mais que l'activité de CK-MB est au moins deux fois plus élevée dans le cœur insuffisant comparativement au cœur normal, ce qui corrèle avec une augmentation significative du contenu de l'isoenzyme CK-B dans les ventricules.<sup>56-57</sup>

Basé sur les résultats de Shem *et al* , nous espérons une augmentation du niveau d'ARNm codant pour CK-B dans l'insuffisance cardiaque mais aucun changement significatif dans l'isoforme CK-M, ce qui corrèle parfaitement avec nos résultats.<sup>58</sup>

L'une des voies les plus affectées dans les ventricules est aussi reliée au métabolisme, la chaîne de transfert d'électron. Une importante diminution a été observée dans différentes composantes des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire. La NADH déshydrogénase Fe-S protéine 3 et 8 (CI), le complexe succinate déshydrogénase (CII) et l'ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase (CIII) démontrent tous un niveau d'expression plus bas ( 30% moins) dans l'oreillette et le ventricule à deux semaines VTP mais demeurent inchangées à 24h VTP. La NADH déshydrogénase et la succinate déshydrogénase sont responsables de la réaction de réduction qui produit un gradient électrochimique de H<sup>+</sup> à travers la membrane interne mitochondriale. Ces H<sup>+</sup>, ensuite localisés dans l'espace intermembranaire sont redirigés dans la matrice mitochondriale via l'ATP-synthase et permettent la production d'ATP, énergie qui sera utilisés par l'actomyosine ATPase et les pompes ioniques durant la contraction et la relaxation des cellules cardiaques. En plus de sa responsabilité dans la diminution de la production d'ATP, la chaîne respiratoire a aussi été étudiée pour son rôle potentiel dans le stress oxydatif. Des études effectuées précédemment ont démontré une

importante diminution au niveau des complexes III et IV.<sup>59</sup> L'étude de Ide *et al* a fourni les premières évidences qu'une défaillance dans le transfert d'électron résultant d'une diminution de l'activité enzymatique du complexe I menant à la production délétère de ROS dans l'espace intracellulaire, ce qui résulte en endommagement du myocyte dans l'insuffisance cardiaque en augmentant la génération de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.<sup>60</sup> D'autres études ont prouvé qu'un lien intime existe entre ROS, l'endommagement de l'ADN mitochondrial et une défectuosité dans la fonction de transport d'électrons et pourrait mener à une génération additionnelle de ROS lequel pourrait jouer un rôle important dans le développement et la progression du remodelage du ventricule gauche dans l'insuffisance cardiaque.<sup>61</sup> Les résultats obtenus dans le cadre de la présente étude démontre une diminution importante du niveau d'ARNm codant pour des enzymes du complexe I, II et III qui, en accord avec les études précédentes, pourrait à la fois causer et être causé par le stress oxydatif qui joue un important rôle dans différents mécanismes de l'insuffisance cardiaque tel que l'apoptose.<sup>62-64-65</sup> Un même ordre de diminution (30%) a été observé dans l'oreillette et le ventricule pour les gènes affectés précédemment cités, suggérant que la dysfonction de la chaîne de transfert d'électron peut à la fois jouer un rôle et être similaire dans les deux chambres cardiaques gauches.

Une autre protéine étant affectée de façon remarquable est la protéine « Lim 1 slimmer » (FHL1, SLIM1) qui est augmentée de près de 9 fois dans les oreillettes et 6 fois (mais non significatif) dans les ventricules à 24h et cette augmentation diminue à 3 fois, dans l'oreillette et le ventricule, après 2 semaines de VTP. Il a été démontré que cet isoforme des protéines LIM est augmenté dans le tissu ventriculaire et septal chez l'humain atteint d'hypertrophie ou d'insuffisance cardiaque.<sup>66-67</sup> Ces résultats sont par contre contrastants avec les résultats obtenus par Yang *et al* qui ont démontré que l'expression de SLIM1 était diminuée dans les cardiomyopathie ischémiques en phase terminale et les cardiomyopathies dilatées. Bien que

son rôle ne soit pas encore bien connu, la surexpression de FHL1 dans les muscles squeletiques induit une hyperélongation et la formation de multiples branchements cytoplasmiques. Cette protéine a aussi été associée avec une fonction similaire aux protéines LIM musculaires comme étant impliqué dans l'interaction entre le filament mince et le cytosquelette.<sup>68/69</sup> Mises ensembles, ces informations et nos résultats pourraient suggérer que la protéine SLIM1 joue un rôle dans le développement de l'hypertrophie du cardiomyocyte dans l'insuffisance cardiaque, principalement au début du développement de l'insuffisance cardiaque. Ce serait encore plus important dans l'oreillette que dans le ventricule.

Une quantité d'informations qui ne cesse d'augmenter prouve que la déféctuosité des canaux ioniques peuvent mener à des arythmies ventriculaires et auriculaires. L'un des types de canaux majeurs impliqués dans les arythmies sont les canaux ryanodine récepteurs qui relâchent le  $Ca^{2+}$ , une composante clé impliquée dans le couplage excitation-contraction qui survient dans le myocarde à travers le mécanisme de relâche de calcium induite par le calcium. Les récepteurs RyR sont les principaux acteurs du complexe protéique qui module directement ou indirectement leur fonction. Parmi ce complexe, on retrouve la calmoduline (CaM), la calmoduline kinase II (CaMKII) et les FKBP binding proteins (FKBPs).<sup>70</sup> La protéine FKBP12 est l'isoforme le plus présent au niveau du cœur même s'il a été proposé que la protéine FKBP12.6 jouerait un rôle plus important. L'isoforme FKBP12 se lie principalement au récepteur ryanodine I (RyR1) et maintient ce canal dans un état fermé dans le muscle. Il a été proposé que CaMKII phosphorylerait les récepteurs RyR, causant ainsi un relâchement FKBPs et par le fait même, l'ouverture du canal calcique. Puisque CaMKII est activé par la calmoduline liée au calcium, une surexpression (et activation) de la calmoduline pourrait mener à une suractivation de la CaMKII et une hyperphosphorylation des récepteurs RyRs menant à une fuite de calcium du réticulum sarcoplasmique. Chez le modèle canin

d'insuffisance cardiaque, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont démontré que la calmoduline et le FKBP12 sont tous les deux augmentés dans le ventricule gauche après 2 semaines de VTP (respectivement 1,9 et 1,7 fois). Cependant, FKBP12 est aussi augmenté dans l'oreillette à 24h et 2 semaines VTP mais pas la calmoduline. Comme FKBP12 ne semble pas agir énormément dans le cœur, nous pouvons supposer que l'augmentation du niveau de CaM sera plus efficace et augmentera le risque de fuite de  $Ca^{2+}$  du SR dans le ventricule. De plus, puisque la CaMKII est responsable de nombreuses cascades de phosphorylation, l'augmentation de la CaM peut aussi mener à un important nombre de changements dans les voies de signalisation.

#### *4.3 Diminution dans le temps des différences entre l'expression auriculaire et ventriculaire*

Il existe de substantielles différences auriculoventriculaires dans l'expression des gènes dans le cœur sain. En fait, 1599 gènes sont différentiellement exprimés dans l'oreillette et le ventricule (dont 743 sont plus exprimés dans l'oreillette et 856 dans le ventricule). Ce modèle d'expression change avec la durée de la VTP alors que 1467 gènes sont différemment exprimés dans les deux chambres après 24h VTP et diminue à 897 gènes après 2 semaines VTP. En fait, 538 gènes qui étaient initialement plus et 635 gènes moins exprimés dans l'oreillette deviennent équivalents à 2 semaines VTP et 576 initialement équivalents deviennent différentiellement exprimés (399 deviennent plus et 177 moins exprimés dans l'oreillette que le ventricule).

Il semble que 426 gènes plus et 624 gènes moins exprimés dans l'oreillette que dans le ventricule chez les contrôles opérés deviennent équivalents à 24h et demeurent équivalents à 2

semaines de VTP. De plus, un total de 223 gènes différemment exprimés dans le LA et le LV chez les groupe contrôle et à 24h de VTP deviennent équivalents à 2 semaines de VTP. Cette équivalence est principalement due à un changement de l'expression des gènes au niveau de l'oreillette puisque très peu de changements sont observés au niveau du ventricule. Barth *et al* ont démontré que le transcriptome auriculaire démontre une signature ventriculaire chez les patients atteints de fibrillation auriculaire. Nos résultats confirment cette tendance à la ventricularisation de l'expression des gènes auriculaires puisqu'un total de 1273 sur 1599 gènes différemment exprimés deviennent équivalents après 2 semaines de VTP, alors que la fibrillation auriculaire est facilement présente dans le modèle animal. Ce phénomène semble être dû aux changements observés dans l'oreillette davantage que ceux observés dans les ventricules, tel qu'expliqué précédemment. D'un autre côté, un total de 1086 gènes qui étaient initialement équivalents dans le groupe contrôle présentent une expression différente dans les deux chambres après 24 heures et 576 après 2 semaines de VTP. En excluant les répétitions, un total de 1563 gènes d'expression initialement similaire présentent une différence significative lors du développement de l'insuffisance cardiaque. Nous pouvons donc dire que la tachystimulation ventriculaire cause une expression des gènes auriculaires similaires à ceux des ventricules pour une partie des gènes mais ce n'est pas le cas de la majorité des gènes puisque certains développent une différence avec le développement de l'insuffisance cardiaque. Une grande partie de ces différences (63%) sont observées après à peine 24 heures d'insuffisance cardiaque et redeviennent équivalents après 2 semaines de VTP.

Parmi les résultats observés, le niveau d'expression de l'inhibiteur de métalloprotéases TIMP-3 est 1,5 fois plus élevé dans l'oreillette que dans le ventricule dans le groupe contrôle tel que répertorié dans la littérature<sup>47</sup> mais cette différence devient non significative après 24h VTP, alors que l'expression dans l'oreillette (VTP vs contrôle) diminue de 50% et que l'expression

ventriculaire ne change pas par rapport au contrôle. Cela signifie que le niveau auriculaire de TIMP-3 est plus élevé dans le groupe contrôle et atteint le même niveau que l'expression ventriculaire du même gène après 24 heures de VTP, soit une signature ventriculaire. Une déficience en protéine TIMP-3 a été montrée comme causant une profonde dysfonction systolique et diastolique en plus d'altérer la structure cardiaque (tel que l'hypertrophie) dans les souris knock out pour TIMP-3.<sup>69</sup> Cette déficience permet entre autre une hyperactivation de MMP-9, résultant en un remodelage pathologique de la matrice extracellulaire. Selon ces informations, l'importante diminution de l'expression de TIMP-3 dans les oreillettes par rapport au niveau basal pourrait contribuer à l'activation des MMPs et résulter en un remodelage pathologique de la matrice extracellulaire. Ces changements concordent aussi avec les résultats obtenus par Hanna *et al* démontrant un niveau plus élevé du remodelage de la matrice extracellulaire dans l'oreillette que dans le ventricule. D'autres études ont démontré que le fait de réstorer le niveau de TIMP-3 est associé avec une inversion du remodelage (une récupération) de la fonction et de la structure cardiaque.<sup>70-71</sup>

#### ***4.4 Importance de l'étude***

Les études effectuées sur l'humain sont à la fois très révélatrices par rapport à l'état pathophysiologique chez l'humain mais sont aussi limitées par une série de facteurs tel que les différents traitements thérapeutiques, l'étiologie de l'insuffisance cardiaque, le sexe, l'évolution de la maladie qui diffère d'un patient à l'autre... Dans le cadre de l'étude de l'insuffisance cardiaque et de la fibrillation auriculaire, les modèles animaux permettent de contrôler ces facteurs et d'obtenir une homogénéité afin d'étudier le remodelage dû à la maladie seulement. Ceci contribue considérablement à diminuer les différences intra-groupe et la variabilité des résultats de puces d'ADN ce qui permet de faire ressortir plus clairement

les gènes affectés par l'insuffisance cardiaque. La présente étude est, à notre connaissance, la première étude des différences entre l'expression des gènes dans l'oreillette et le ventricule gauche dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque. L'importance de cette étude est augmentée par le fait que cette comparaison est faite à travers le temps tel que des contrôles sains (sham opérés), après 24 heures de tachystimulation représentant la phase aiguë de développement d'insuffisance cardiaque et après 2 semaines représentant la phase tardive de développement d'insuffisance cardiaque. Cette comparaison permet d'identifier les différents mécanismes affectés dans le développement de l'insuffisance cardiaque et l'évolution des changements dans le temps. Les comparaisons ont été faites de deux manières différentes, soit en comparant le niveau d'expression pathologique au niveau d'expression sain dans une même chambre pour voir l'effet du remodelage sur l'expression des gènes. Cela permettait ensuite de comprendre les différences en comparant les changements observés dans l'oreillette et dans le ventricule. Une autre comparaison a aussi été effectuée, il s'agit de comparer l'expression des gènes dans l'oreillette et le ventricule dans un même animal pour la même période de tachystimulation (0h, 24h et 2 semaines). En voyant les différences observées entre l'expression auriculaire et ventriculaire dans une même phase de développement de l'insuffisance cardiaque, il est possible de voir l'évolution des différences dans une même chambre et vérifier la thèse de la ventricularisation de l'expression des gènes auriculaires. Cette étude a démontré que l'expression des gènes de l'oreillette se rapproche de l'expression ventriculaire en phase tardive de développement de l'insuffisance cardiaque, comparativement à la phase hâtive et le cœur normal. En plus de ce phénomène, le remodelage cause aussi une différenciation de l'expression de certains gènes (presque le même nombre que pour la ventricularisation) de l'oreillette par rapport au ventricule. Tous ces changements sont principalement dus au remodelage auriculaire et non ventriculaire.

En comparant l'évolution des changements dans chacune des chambres au cours du développement de l'insuffisance cardiaque par rapport aux contrôles, cette étude a permis de découvrir que les changements étaient de 100 et 50 fois supérieurs à 24 heures et 2 semaines VTP respectivement dans l'oreillette par rapport au ventricule. Ceci démontre que la tachystimulation ventriculaire cause un remodelage génomique modéré au niveau du ventricule et un remodelage très important au niveau de l'oreillette. Cela le fait que l'insuffisance cardiaque cause un remodelage important au niveau de l'oreillette et peu entraîner le développement de fibrillation auriculaire. Il a aussi permis d'identifier plus de 10 000 changements d'expression de gènes observés dans les deux chambres cardiaques. La classification et l'étude de ces gènes a permis d'identifier des mécanismes potentiellement affectés et ainsi de mieux comprendre en partie le remodelage qui prend place dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Ces différences trouvées constituent de plus une mine incroyable d'informations pour l'étude du développement de la fibrillation auriculaire, de l'insuffisance cardiaque et du remodelage des deux chambres qui pourra servir de base pour l'étude plus poussée de mécanismes précis, qui n'ont pu être fait dans le cadre de ce projet.

#### ***4.5 Limitations potentielles***

Nous ne pouvons certifier que les changements observés sont dus à une dégradation de l'ARNm ou à sa synthèse mais les analyses nécessaires à résoudre cette question ne sont pas faisables à grande échelle présentement. Le remodelage auriculaire et ventriculaire pourrait affecter l'expression des gènes contrôles tel que l'ARNr 18s et GAPDH mais la présente étude prouve que ce n'est pas le cas. De plus, l'expression des gènes de l'oreillette pourrait ne pas refléter les changements de production de protéines. Par le fait même, les changements

observés par PCR en temps réel et par puces d'ADN pourrait ne pas refléter les changements de production de protéines, bien que les résultats obtenus prouvent le contraire pour les protéines et gènes étudiés. Des différences dans les facteurs de niveau de changements ont été observés et reflètent les limites actuelles des puces d'ADN. Les changements observés par puces d'ADN sont moins marqués que ceux par PCR. Bien que cette technique soit de plus en plus précise, la puce d'ADN est encore considérée comme une technique semi-quantitative ayant une moins grande sensibilité que le PCR. L'avantage marqué de la puce d'ADN qui permet l'analyse 22 000 transcrits justifie son utilisation mais certains changements ont pu être sous-estimés. Il aurait aussi été intéressant d'étudier les animaux après 5 semaines de VTP, tel que dans quelques études utilisant le même modèle animal. Cette période de tachystimulation ventriculaire permet d'obtenir une insuffisance cardiaque en phase finale chez les chiens. Le choix d'utiliser un temps maximal de deux semaines de tachystimulation ventriculaire a été justifié par le fait que les animaux présentent un important remodelage structurel, ionique et électrophysiologique et ne présente pas de différences majeures avec le remodelage observé après 5 semaines VTP en ce qui a trait à l'inflammation, la fibrose, l'angiotensine II et l'activation de ERK, JNK et certaines autres protéines. Le coût de l'étude des gènes par biopuces et de la production du modèle étant très élevé en plus de demander un temps important et d'aggraver l'état de santé des animaux (certains animaux décèdent avant la fin du protocole), nous avons jugé que ce temps n'était pas nécessaire.

Il a été démontré que l'insuffisance cardiaque entraîne une augmentation du ratio de tissu interstitiel par rapport au tissu myocardique dans le coeur. Cela est principalement dû à la mort des cardiomyocytes et à l'augmentation significative de la croissance des fibroblastes. La présente étude et celle de Hanna et al, entre autre, démontrent que le remodelage observé dans le développement d'insuffisance cardiaque causé par tachystimulation ventriculaire

entraîne un remodelage nettement plus important au niveau auriculaire que ventriculaire. Bien que l'objet de ces études ne soient pas de déterminer la contribution des fibroblastes à ce remodelage mais plutôt la contribution des cellules contractiles, ces résultats suggèrent tout de même une augmentation de la croissance des fibroblastes, directement liés au développement de la fibrose. Une contamination des échantillons par ce type cellulaire pourrait en partie expliquer l'augmentation de l'expression de collagène et de fibronectine observés au niveau de l'ARNm.

Nous avons cherché des protéines cibles, spécifiques pour chaque type cellulaire pouvant potentiellement contaminer les isolations de cardiomyocytes. Il s'agit de DDR2 pour les fibroblastes,<sup>90</sup> PECAM-1 et PSGL pour les cellules endothéliales et les lymphocytes, caldesmone pour les cellules musculaire lisses et la NA/K ATPase pour les cardiomyocytes. Nous avons comparé l'expression de ces protéines dans les isolations de cardiomyocytes de l'oreillette, du ventricule, dans les tissus cardiaques tel que le septum, l'oreillette et le ventricule, dans le cerveau et dans l'aorte. Nous n'avons détecté aucune présence de DDR2, PSGL, PECAM-1 et caldesmone dans les isolats de cardiomyocytes. Ces protéines étaient fortement présentes dans les échantillons tissulaires. Cela suggère que le niveau de contamination des échantillons est très minime. De plus, on observe une augmentation de la quantité de NA/K ATPase dans les échantillons d'isolations cellulaires par rapport aux échantillons tissulaires.

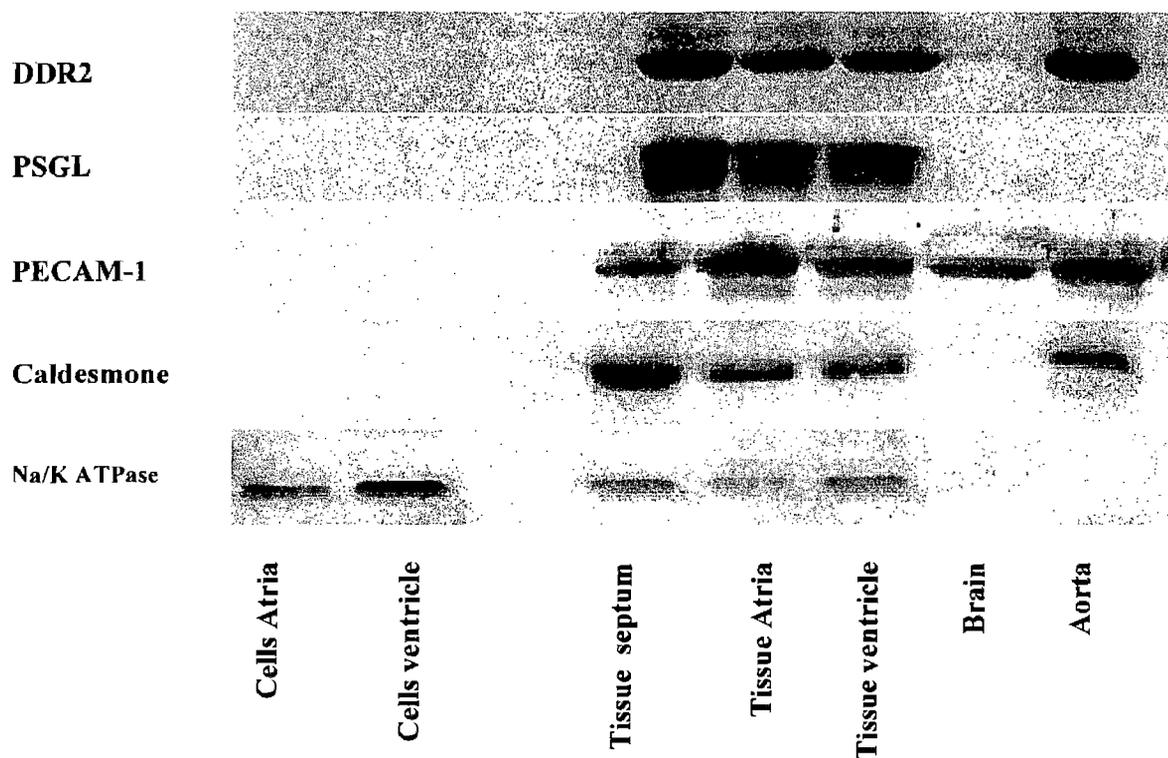


Figure 11. Vérification de la pureté des cardiomyocytes recueillis par isolation enzymatique.

Bien que nous ne puissions écarter totalement la possibilité de contamination des échantillons de cardiomyocytes par d'autres types cellulaires tel que les fibroblastes, ces résultats suggèrent que cette contamination est minime. Les changements dans l'expression du collagène et de la fibronectin seraient donc reliés aux changements dans l'expression des gènes au niveau des cardiomyocytes et non du tissu cardiaque entiers.

De plus, involontaire mais inévitable, l'isolation enzymatique des cardiomyocytes entraîne un stress au niveau cellulaire et un changement au niveau des protéines de la surface cellulaire. Bien que la dissociation enzymatique des cardiomyocytes puisse avoir un effet sur l'expression des gènes des cardiomyocytes, ces changements ne devraient pas influencer

grandement les résultats puisque tous les échantillons ont subi un traitement semblable. Ainsi, en comparant par exemple l'expression des gènes dans les oreillettes 24h VTP aux oreillettes contrôles, les cardiomyocytes des deux échantillons comparés devraient avoir subi un stress semblable et les changements encourus le seront dans les deux échantillons, s'annulant ainsi lors de la comparaison de l'expression des gènes entre les deux échantillons.

#### *4.6 Recherches futures*

Les recherches faisant l'objet de ce mémoire constituent un avancement scientifique par les découvertes faites concernant les gènes dont l'expression est affectée dans l'insuffisance cardiaque. Il est maintenant démontré que les oreillettes et les ventricules réagissent très différemment et que ces différences évoluent dans le temps dans le développement d'insuffisance cardiaque. Avec plus de 4000 gènes présentant une différence d'expression après 24 h de VTP et 6000 après 2 semaines, cette étude a généré une foule de résultats qui sont impossibles à analyser en totalité dans le cadre d'un projet de maîtrise. Parmi les projets intéressants qui pourraient faire suite à cette étude figure l'étude approfondie de diverses voies de signalisation identifiées. Par exemple, les résultats ont démontré que la matrice extracellulaire était grandement affectée dans l'oreillette mais que ces changements étaient quasi inexistant dans le ventricule. Une étude plus poussée des métalloprotéases, des inhibiteurs de métalloprotéases et des différentes protéines structurelles de la matrice extracellulaire tel que le collagène et la fibronectine permettrait probablement d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles afin de réduire le remodelage structurel de la matrice extracellulaire cardiaque dans le développement d'IC. Les modifications de la matrice étant à la fois responsables d'une perte de force de contraction et une perte de conduction dû à la fibrose, le ralentissement, l'arrêt ou même une inversion des changements liés à ces gènes

contribuerait grandement à ralentir le développement de l'insuffisance cardiaque. Plusieurs études ont démontré que le TGF $\beta$ 1 et l'angiotensine II peuvent induire le développement de la fibrose interstitielle. Dans le présent projet, 85 gènes reliés au TGF $\beta$ 1 présentent un changement de niveau d'expression significatif dans l'oreillette, là où le développement de fibrose s'est avéré être le plus important dans l'étude de Hanna *et al*. Ces changements d'expressions sont absents au niveau du ventricule, là où la fibrose est peu développée après 2 semaines de VTP. Ces gènes reliés au TGF $\beta$ 1 pourraient donc être intimement reliés au développement de la fibrose. La comparaison de l'expression des gènes traités avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine pourrait nous permettre d'identifier des mécanismes clés dans le développement de fibrose relié à l'angiotensine II et au TGF $\beta$ 1, dans l'insuffisance cardiaque. De plus, bien que les cardiomyocytes représentent 75% du tissu cardiaque, d'autres cellules, telles que les fibroblastes, agissent fortement dans le développement de la fibrose. L'étude de tissus entiers ainsi que l'isolation de fibroblastes et l'étude de l'expression leurs gènes, à travers le temps, permettraient de mieux comprendre la contribution des différents types cellulaires dans le développement de la fibrose et d'identifier les mécanismes clés dans le développement d'insuffisance cardiaque. Bien que l'expression des gènes soit un bon indicateur des changements observés dans une voie de signalisation, différentes protéines peuvent ne présenter aucune différence d'expression mais présenter un niveau de production modifiée ou encore un niveau d'activation différent. L'étude de la quantité de protéines par Western Blot et de l'activation des métalloprotéases et des inhibiteurs de métalloprotéases par zymographie permettrait de mieux comprendre les principaux acteurs et leurs liens au niveau tissulaire, au niveau des cardiomyocytes et des fibroblastes dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Le collagène étant sécrété à l'extérieur de la cellule, l'étude tissulaire de l'expression des gènes permettrait certainement

une meilleure compréhension au niveau protéique que l'étude au niveau de cardiomyocytes seulement.

Neubauer a rapporté qu'un changement dans le métabolisme est souvent observé dans l'insuffisance cardiaque, point qui a aussi été reflété dans notre étude de l'expression des gènes. Parmi les rares mécanismes affectés de manière similaire dans l'oreillette et le ventricule figurent l'expression des gènes de la chaîne respiratoire. Les différents mécanismes par lesquels la chaîne respiratoire est affectée et affecte le développement de l'insuffisance cardiaque sont encore mal connus. De plus, le rôle des changements observés dans la chaîne de transport d'électron fait encore l'objet de nombreuses questions et discussions à savoir si ces changements sont la cause ou la conséquence du développement de la dysfonction cardiaque. Parmi les espèces canines, le doberman pinscher a démontré une plus grande fréquence de développement de cardiomyopathies dilatées. L'une des hypothèses reliée au développement de ces problèmes cardiaques est reliée au fait que les doberman présentent un profil d'expression des gènes reliés à la chaîne respiratoire différent des autres races tel qu'une diminution la NADH déshydrogénase et de l'activité de l'ATP synthase. Une étude plus approfondie des changements observés dans l'expression de la chaîne respiratoire permettrait sans doute de mettre en lumière les différentes protéines et gènes modulés dans l'insuffisance cardiaque. De plus, une étude de leur activité et de la synthèse d'ATP qui y est reliée permettra de voir les modifications réelles de l'énergie disponible pour la contraction des cellules musculaires. La majorité des inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont actuellement fatals pour l'animal (ex. certains poisons à rats). La capacité d'inhiber partiellement un ou des gènes cibles de la chaîne respiratoire permettrait de déterminer si ce changement serait un élément causal de l'insuffisance cardiaque. Cette étude peut cependant

être faite au niveau cellulaire avec des agents tel que l'antimycine A bloquant les complexes III et IV de la chaîne respiratoire et en étudiant l'effet sur la contraction cellulaire.

Ces projets ne représentent qu'une partie des études possibles à partir des données générées par la présente étude. Puisque des changements dans l'expression des gènes ont été démontrées dans plusieurs classes de gènes (ex. matrice extracellulaire, métabolisme, inflammation, ADN/ARN, apoptose...) plusieurs approches peuvent être utilisées afin d'identifier des mécanismes impliqués dans le remodelage cardiaque et ainsi identifier des cibles pharmacologiques potentielles.

## 5. Conclusion

Il a été démontré dans des études antérieures que l'insuffisance cardiaque causait un remodelage structurel, fonctionnel, ionique et génique au niveau de l'oreillette et du ventricule. Cependant, peu d'études se sont attardées aux différences de remodelage entre l'oreillette et le ventricule. Une étude de Hanna *et al* à dernièrement démontré d'importantes différences entre le remodelage auriculaire et ventriculaire. L'oreillette démontre un remodelage quantitativement plus important et plus rapide au niveau du développement de la fibrose, de l'infiltration de globules blancs et de l'apoptose au niveau tissulaire. Ces résultats nous ont poussé à nous poser certaines question qui n'avaient, à notre connaissance, jamais été étudiées. Tout d'abord, cette étude avait pour but d'identifier quels gènes sont affectés ou impliqués dans le remodelage auriculaire et dans le remodelage ventriculaire lors d'insuffisance cardiaque, quelles sont les différences entre les deux chambres et quelle est l'évolution de ces changements à travers le temps. Dans le cadre de ce projet de recherche, la tachystimulation ventriculaire entraîne un changement d'expression de 4785 gènes après 24 heures par rapport aux contrôles opérés et 6284 gènes après 2 semaines. Les changements au niveau ventriculaire sont beaucoup moins spectaculaires puisque seulement 52 gènes démontrent une différence de niveau d'expression après 24 heures de VTP et 130 après 2 semaines. Un portrait (diminutions vs augmentation) des changements observés a été établi pour les différentes classes de gènes permettant d'identifier les gènes liés à la matrice extracellulaire, à l'ADN/ARN, à la synthèse protéique et à la coagulation/inflammation comme étant des classes de gènes étant particulièrement plus affectées dans l'oreillette que dans le ventricule. D'importants changements ont été observés tel que l'expression du collagène alpha I type III qui est près de 65 fois plus exprimé dans l'oreillette après 2 semaines VTP que dans les contrôles. Parmi les catégories de gènes présentant le plus de changements d'expression dans les ventricules figurent les gènes liés au métabolisme, tel

que la créatine kinase B et certains gènes de la chaîne respiratoire, ainsi que des gènes reliés à la signalisation du calcium tel que la calmoduline et FKBP12. L'étude à différents temps a permis de constater une importante réponse aigue (24h VTP) puisque plus de 4000 gènes sont affectés, en plus de démontrer que le remodelage augmente en stade avancé (2 semaines VTP). De plus, certains gènes affectés en phase aigue ne le sont pas en phase avancée et vis versa. Plusieurs études ont démontré que les ventricules et les oreillettes présentent à la base (cœur sain) des différences importantes dans l'expression des gènes. La présente étude avait aussi pour but de voir comment évoluent ces différences dans le développement d'insuffisance cardiaque. Les résultats ont démontré que près de 1567 étaient différemment exprimés au niveau basal (contrôle) alors que ce nombre diminue à 1499 gènes à 24h et 897 gènes à deux heures. Les changements étant peu nombreux dans le ventricule, ce rapprochement de l'expression des deux chambres est principalement dû aux changements d'expression à travers le temps dans l'oreillette. Une étude précédente a démontré une ventricularisation de l'expression des gènes des oreillettes lors de fibrillation auriculaire. Nos résultats confirment partiellement cette hypothèse puisque certains gènes de l'oreillette s'approchent effectivement du niveau d'expression ventriculaire après deux semaines de VTP, mais on observe aussi un nombre important de gènes, qui était initialement équivalents dans les deux chambres, devenir différemment exprimés. Ceci démontre une fois de plus des mécanismes de remodelage différents dans l'oreillette et le ventricule.

En plus d'avoir répondu aux hypothèses de départ, ce projet fourni une foule de renseignements sur les différences auriculo-ventriculaire dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque pouvant être analysés en profondeur dans des projets de recherche futurs. Ces projets pourraient mener à la découverte de cibles pharmacologiques pour le traitement ou la modulation du développement de l'insuffisance cardiaque.

## Références

- 1- Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001 May 7;110 Suppl 7A:37S-46S. Review.
- 2- Heart disease, A textbook of cardiology medicine, 7<sup>th</sup> Edition, Elsevier Saunders, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Tobert O. Bonow, Eugene Braunwald, 2005.
- 3- The Heart, Volume 1, 10<sup>th</sup> edition, Hurst's. Calentin Fuster, R. Wayne Alexander, Robert A. O'Rourke, Robert Roberts Spencer B King III, Hein J. J Wellens. 2001
- 4- Textbook of cardiovascular medicine, second editionm Editor Eric J Topol, Lippincott Williams et Wilkins, 2002.
- 5- Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003 May 15;348(20):2007-18. Review.
- 6- Wayne Rosamond, Katherine Flegal, Gary Friday, Karen Furie, Alan Go, Kurt Greenlund, Nancy Haase, Michael Ho, Virginia Howard, Bret Kissela, Steven Kittner, Donald Lloyd-Jones, Mary McDermott, James Meigs, Claudia Moy, Graham Nichol, Christopher J. O'Donnell, Veronique Roger, John Rumsfeld, Paul Sorlie, Julia Steinberger, Thomas Thom, Sylvia Wasserthiel-Smoller, Yuling Hong for the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics—2007 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation*, Feb 2007; 115: e69 - e171
- 7- Zhao XS, Gallardo TD, Lin L, Schageman JJ, Shohet RV, Transcriptional mapping and genomic analysis of the cardiac atria and ventricles, *Physiol Genomics* 2002; 12:53-60.
- 8- Chen JN, Fishman MC. Genetics of heart development. *Trends genetic*, 2000; 16: 383-388.
- 9- Tabibiazar R, Wagner RA, Liao A, Quertermous T, Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ Res* 2003; 93: 1193-1201.
- 10- Tsubakihara M, Williams, NK, Keigh A, dos Remedios CG, Comparison of gene expression between left atria and left ventricles from non-diseased humans. *Proteomics* 2004; 4: 261-70.
- 11- MacLennan DH. Ca<sup>2+</sup> signalling and muscle disease. *Eur J Biochem*, 2000; 267: 5291-97.

- 12- Frank K, Kranias EG, Phospholamban and cardiac contractility. *Ann Med* 2000; 32: 572-78.
- 13- Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi, YM, Reinke, U, Schmitz, W, Jones, LR. *J Biol Chem* 2001; 276: 4142-9.
- 14- Luss I, Boknik P, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Luss H, Meissner A, Muller FU, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J. *J Moll Cell Cardiol* 1999; 31: 1299-1314.
- 15- Artman M, Kithas PA, Wike JS, Strada SJ, Inotropic responses change during postnatal maturation in rabbit. *Am J Physiol* 1988; 255: H335-342.
- 16- Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, Sterinmeyer K, Bleich M, Kaab S, Pfeufer A, Uberfuhr P, Dugas M, Steinbeck G, Nabauer M, Functional profiling of the human atrial and ventricular gene expression, *Eur J Physiol* 2005; 450: 201-8.
- 17- Franco D, Lamers WH, Moorman AFM, Patterns expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc Res* 1998; 38:25-53.
- 18- Small EM, Krieg PA, Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14:13-18
- 19- Sobie EA, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Song LS, Hartmann H, Saleet Jafri M, Lederer WJ. The Ca<sup>2+</sup> leak paradox and “rogue ryanodine receptors”: SR Ca efflux theory and practice. *Prog. Biophys Mol Biol* 2006; 90(1-3): 172-185.
- 20- Katz AM, Heart failure. Pathophysiology, molecular biology, and clinical management. Eds Lippincott Williams and Wilkins. 2000.
- 21- Ingwall JS, Energetic basis of heart failure. In Mann DL (ed): Heart failure; a companion to Braunwald’s Heart Disease: E textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia, WB Saunders, 2004, pp 91-108.
- 22- Katz AM: Heart Failure, Philadelphia, Lippincott William and Wilkins, 2002.
- 23- Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V: Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1990 Jun;11 (6):509-16
- 24- Jarreta D, Orús J, Barrientos A, Miró O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F, Casademont J. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2000 Mar;45(4):860-5.

- 25- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79:215-262.
- 26- Communal C, Singh L, Pimentel DR, Colucci WS: Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activating beta-adrenergic pathway. *Circulation*; 98:1329: 1998.
- 27- Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M, Kakita T, Morimoto T, Sasayama S. alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation.* 1999 Jul 20;100(3):305-11.
- 28- Singh K, Xiao L, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol.* 2001 Dec;189(3):257-65.
- 29- Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P.J. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *Clin Invest.* 1998 Apr 1;101(7):1326-42.
- 30- Leri A, Liu Y, Malhotra A, Li Q, Stiegler P, Claudio PP, Giordano A, Kajstura J, Hintze TH, Anversa P. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes. *Circulation.* 1998 Jan 20; 97(2):194-203.
- 31- Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res.* 1999 Jan 8-22; 84(1):21-33.
- 32- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10; 331(19):1286-92.
- 33- Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004 May; 18(7):816-27.
- 34- Everett TH 4th, Olgin JE. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2007 Mar;4 (3 Suppl):S24-7. Epub 2006 Dec 28.
- 35- Lijnen PJ, Petrov VV. Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003 Sep; 25(7):541-64.
- 36- Kiribayashi K, Masaki T, Naito T, Ogawa T, Ito T, Yorioka N, Kohno N. Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38 MAPK. *Kidney Int.* 2005 Mar; 67(3):1126-35.
- 37- Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation.* 2003 Sep 23; 108(12):1499-505. Epub 2003 Sep 2.

- 38- Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000 Mar; 52(1):11-34.
- 39- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan; 292(1):C82-97. Epub 2006 Jul 26.
- 40- Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004 Aug 15; 63(3):423-32.
- 41- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.J. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1; 35(3):569-82.
- 42- Gupta S, Sen S. Animal models for heart failure. *Methods Mol Med.* 2006; 129:97-114.
- 43- Lebeche D, Dalal R, Jang M, del Monte F, Hajjar RJ. Transgenic models of heart failure: elucidation of the molecular mechanisms of heart disease. *Heart Fail Clin.* 2005 Jul; 1(2):219-36.
- 44- Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis.* 2005 Jul-Aug; 48(1):9-28.
- 45- Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 2004 Aug 1;63(2):236-44.
- 46- Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002 Mar 22; 90(5):520-30.
- 47- Kaab S, Barth AS, Margerie D, Dugas M, Gebauer M, Zwermann L, Merk S, Pfeufer A, Steinmeyer K, Bleich M, Kreuzer E, Steinbeck G, Nabauer M. Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure. *J Mol Med.* 2004 May; 82(5):308-16.
- 48- Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, Steinmeyer K, Bleich M, Kaab S, Hinterseer M, Kartmann H, Kreuzer E, Dugas M, Steinbeck G, Nabauer M. Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res.* 2005 May 13; 96(9):1022-9.
- 49- Li D, Farih S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation.* 1999 Jul 6; 100(1):87-95.

- 50- Armstrong PW, Stopps TP, Ford SE, de Bold AJ. Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation*. 1986 Nov; 74(5):1075-84.
- 51- Pak PH, Nuss HB, Tunin RS, Kaab S, Tomaselli GF, Marban E, Kass DA. Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Aug; 30(2):576-84.
- 52- Gao Z, Xu H, DiSilvestre D, Halperin VL, Tunin R, Tian Y, Yu W, Winslow RL, Tomaselli GF. Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Jan; 40(1):76-86.
- 53- Brundel BJ, Melnyk P, Rivard L, Nattel S. The pathology of atrial fibrillation in dogs. *J Vet Car*. 2005 Nov; 7 :121-129.
- 54- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, *et al* . Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun; 83(12):4167-71.
- 55- Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, Léger J, Demolombe S, Ponton A, Glass L, Nattel S. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation .*Circ Res*. 2007 Feb 16; 100(3):425-33.
- 56- Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, Pessina AC, Allen PD. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation*. 1996 Oct 15; 94(8):1894-901.
- 57- Heinke MY, Wheeler CH, Yan JX, Amin V, Chang D, Einstein R, Dunn MJ, dos Remedios CG. Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. *Electrophoresis*. 1999 Jul; 20(10):2086-93.
- 58- Shen W, Spindler M, Higgins MA, Jin N, Gill RM, Bloem LJ, Ryan TP, Ingwall JS. The fall in creatine levels and creatine kinase isozyme changes in the failing heart are reversible: complex post-transcriptional regulation of the components of the CK system. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Sep; 39(3):537-44.
- 59- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW. Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res*. 2001 Oct; 52(1):103-10.
- 60- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 1999 Aug 20; 85(4):357-63.
- 61- Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001 Mar 16; 88(5):529-35.

- 62- Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res.* 2001 Aug 3; 89(3):198-200.
- 63- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996 Oct 17; 335(16):1182-9.
- 64- Lim DS, Roberts R, Marian AJ. Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy : Insight into the pathogenesis of phenotypes. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Oct; 38(4):1175-80.
- 65- Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SK, Wayne MM, Fung KP, Lee CY, Liew CC. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation* 1997 Dec 16; 96(12):4146-203.
- 66- McGrath MJ, Mitchell CA, Coghill ID, Robinson PA, Brown S. Skeletal muscle LIM protein 1 (SLIM1/FHL1) induces alpha 5 beta 1-integrin-dependent myocyte elongation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Dec; 285(6):C1513-26.
- 67- Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 2000 Dec 19;102(25):3046-52.
- 68- Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res.* 2005 Dec 9; 97(12):1314-22.
- 69- Fedak PW, Smookler DS, Kassiri Z, Ohno N, Leco KJ, Verma S, Mickle DA, Watson KL, Hojilla CV, Cruz W, Weisel RD, Li RK, Khokha R. TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004 Oct 19; 110(16):2401-9.
- 70- Li YY, Feng Y, McTiernan CF, Pei W, Moravec CS, Wang P, Rosenblum W, Kormos RL, Feldman AM. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation.* 2001; 104: 1147–1152.
- 71- Walther T, Schubert A, Falk V, Binner C, Kanev A, Bleiziffer S, Walther C, Doll N, Autschbach R, Mohr FW. Regression of left ventricular hypertrophy after surgical therapy for aortic stenosis is associated with changes in extracellular matrix gene expression. *Circulation.* 2001; 104 (suppl I): I-54–I-58.
- 72- Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Cardin S, Pelletier P. Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance. *Curr Opin Cardiol.* 2005 Jan; 20(1):21-5.

- 73- Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Natel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation*. 2000;101 :2631-2638.
- 74- Neubauer S, The failing heart –An engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007 Mar 15; 356(11):1140-51.
- 75- Minajeva A, Kaasik A, Paju K, Seppet E, Lompré AM, Veksler V, Ventura-Clapier R. Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart. *Am J Physiol*. 1997 Nov; 273(5 Pt 2):H2498-507.
- 76- Boknik P, Aunkel C, Kirchhefer U, Kleideiter U, Kleinwiele O, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Schmitz W, Vahlensieck U, Zimmermann N, Jones LR, Neumann J. Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovasc Res* 43: 67-76,1999.
- 77- Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U, Shimada K Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. *Int J Cardiol*. 2005 Jul 10; 102(2):233-8.
- 78- Brundel BJ, van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG, Grandjean JG, van Gilst WH, Crijns HJ. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999 May; 42(2):443-54.
- 79- Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Huang SK, Tseng YZ, Lien WP. Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Apr; 33(5):1231-7.
- 80- Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier C, Lande G, Demolombe S, Escande D, Nattel S, Léger JJ, Steenman M. Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Jan; 40(1):173-84.
- 81- Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20; 99(17):11387-92.
- 82- Jugdutt BI: Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when enough is enough? *Circulation* 2003, 108: 1395-1403.
- 83- Khan A, Moe GW, Nili N, Rezaei E, Eskandarian M, Butany J, Strauss BH. The cardiac atria are chambers of active remodeling and dynamic collagen turnover during evolving heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jan 7;43(1):68-76.
- 84- Hasenfuss G, Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1998, 30: 60-76.

- 85- Balakumar P, Singh AP, Singh M. Rodent models of heart failure. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007 Jul-Aug;56(1):1-10.
- 86- Gupta S, Sen S. Animal models for heart failure. *Methods Mol Med*. 2006;129:97-114. Review.
- 87- Salpeter SR, Ormiston TM, Salpeter EE. Cardiovascular effects of beta-agonists in patients with asthma and COPD: a meta-analysis. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2309-21.
- 88- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29. Review.
- 89- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *CircRes*. 2001;89:201
- 90- Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO, Potts JD, Price RL, McFadden A, Rice M, Borg TK. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn*. 2004 Aug;230(4):787-94.

## Accords des co-auteurs

### Co-authors agreement

#### Student identification:

Patricia Pelletier  
 Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal  
 3-520-1-0 M.Sc pharmacology

#### Description of the article :

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouer, Ling Xiao, Stefan Kaab  
 Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel. **Marked differences between atrial and  
 ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**  
*in preparation, will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

#### Declaration of co-authors :

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master  
 thesis that is for title « Differences marquées dans le remodelage génomique au niveau de  
 l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par  
 tachystimulation ventriculaire ».

[information retirée / information withdrawn]

Co-author name

Date

28/06/07

Co-authors agreement**Student identification:**

Patricia Pelletier  
 Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal  
 2-520-1-0 M.Sc pharmacology

**Description of the article :**

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao, Stefan Kaab, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel. **Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**  
*In preparation, will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

**Declaration of co-authors :**

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master thesis that as for title « Différences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire ».

Klinikum der Universität München  
 Medizinische Klinik u. Poliklinik I, Großhadern  
 Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Kaab  
 Marchioninistr. 15  
 81377 München  
 Tel: 0049 (0)89-7095-3049  
 Fax: 0049 (0)89-7095-6876

---

 Co-author name



6.6.07

---

 Date

### Co-authors agreement

#### Student identification:

Patricia Pelletier

Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal  
2-520-1-0 M.Sc pharmacology

#### Description of the article :

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao, Stefan Kaab, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel **Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**

*In preparation. will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

#### Declaration of co-authors :

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master thesis that as for title « Différences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire ».

[information retiree / information withdrawn]

Signature

June 8, 2007  
Date

Co-authors agreement**Student identification:**

Patricia Pelletier

Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

2-520-1-0 M.Sc pharmacology

**Description of the article :**

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao, Stefan Kaab  
Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel, **Marked differences between atrial and  
ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**

*In preparation - will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

**Declaration of co-authors :**

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master thesis that as for title « Différences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire ».

[information retirée / information withdrawn]

June 28, 2007  
Date

26

G.

Co-authors agreement**Student identification:**

Patricia Pelletier  
 Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal  
 2-520-1-0 M.Sc pharmacology

**Description of the article :**

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao, Stefan Kaab, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel. **Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**  
*In preparation, will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

**Declaration of co-authors :**

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master thesis that as for title « Differences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire ».

[information retirée / information withdrawn]

Co-author name

June 6, 2007

Date

Co-authors agreement

**Student identification:**

Patricia Pelletier

Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal  
2-520-1-0 M.Sc pharmacology

**Description of the article :**

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Boutet, Ling Xiao, Stefan Kaab, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel. **Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**

*In preparation will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

**Declaration of co-authors :**

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master thesis that as for title « Differences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire »

[information retirée / information withdrawn]

Co-author name

Date

*June 4/07*

### Co-authors agreement

#### **Student identification:**

Patricia Pelletier  
Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal  
2-520-1-0 M.Sc pharmacology

#### **Description of the article :**

Patricia Pelletier,\* Sophie Cardin,\* Eric Libby, Sabrina Le Bouter, Ling Xiao, Stefan Käab, Sophie Demolombe, Leon Glass, Stanley Nattel. **Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure.**  
*In preparation, will be submitted to Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

#### **Declaration of co-authors :**

As co-author of the article, I agree that Patricia Pelletier includes this article in her master thesis that as for title « Différences marquées dans le remodelage génomique au niveau de l'oreillette et du ventricule dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque induit par tachystimulation ventriculaire »

(information retirée / information withdrawn)

Co-author name

Date

06/07/07