

UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR DE MÉDECINE

---

ÉCOLE DOCTORALE • BIOLOGIE SANTÉ (ED 502)

Année 2015

N° attribué par la bibliothèque

N° 04

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Etude des implications du gène SCN5A dans les  
arythmies et les remodelages ventriculaires  
post ischémiques observés suite à un infarctus du  
myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire**

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie, Biologie cellulaire et moléculaire

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Benoît JAGU**

*Le 19 janvier 2015, devant le jury ci-dessous*

*Président :* M. Flavien CHARPENTIER, *Directeur de recherche Inserm*, Nantes

*Examineurs :* M. Bijan GALEH-MARZBAN, *PU-PH*, Paris  
M. Sylvain RICHARD, *Directeur de recherche CNRS*, Montpellier

*Rapporteurs :* M. Dominique BABUTY, *PU-PH*, Tours  
M. Frank LEZOUALC'H, *Directeur de recherche Inserm*, Toulouse

*Directeurs de thèse :* M. Thierry LE TOURNEAU, *PU-PH*, Nantes  
M. Gilles TOUMANIANTZ, *MCU Université de Médecine*, Nantes

## REMERCIEMENTS

Je remercie Hervé Le Marec, directeur de l'institut du Thorax, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et pour ses quelques enseignements sur l'analyse des troubles du rythme au début de mon doctorat.

Merci à Frank Lezoualc'h et Dominique Babuty d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury et d'avoir examinés mes travaux de thèse. A Sylvain Richard et Bijan Ghaleh-Marzban, mes membres de comité de suivi de thèse, un grand merci pour vos questions et vos lumières, et votre présence dans mon jury de thèse.

A Flavien Charpentier, un grand merci pour votre participation active dans l'obtention de « ma patine dans la compréhension et l'identification des troubles rythmes », votre écoute, votre disponibilité afin de répondre à mes nombreuses questions, votre puits de sciences et vos conseils toujours avisés. Merci aussi de m'avoir donné les possibilités de communiquer de nombreuses fois, notamment à l'étranger.

Je tiens à remercier Thierry Le Tourneau, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné son accord et la possibilité de m'épanouir pendant ces 3 dernières années et pour son soutien matériel sur les derniers mois de cette aventure.

Comme vous avez souvent pu le dire, nous sommes un vieux couple... Et oui, plus de 6 ans que nous nous supportons...Je me souviendrai toujours de la première fois que je suis venu au laboratoire à la faculté des sciences en 2<sup>ème</sup> année de licence, avec notamment les questions de biochimie alors que vous faisiez un western blot. Au delà d'être un encadrant, vous êtes devenu comme un membre de ma famille. Mis à part le plan scientifique auquel vous avez très activement participé, vous m'avez énormément fait grandir sur le personnel en me faisant travailler.

Merci pour avoir cru en moi, votre présence, vos enseignements et votre passion transmissible. Ces années passées à vos côtés m'ont donné les armes pour poursuivre mon chemin dans ce domaine passionnant qu'est la recherche. Encore merci pour tout votre investissement.

Remerciements à tous les membres de mon équipe avec lesquels j'ai pu interagir pendant ces trois dernières années, particulièrement :

- Mickael et Cynthia pour vos discussions et vos aides scientifiques ou non ;
- Agnès C pour ta participation indirecte sur mes projets de thèse ;
- Stéphanie pour ta gestion des élevages des animaux sans laquelle les projets ne seraient pas possibles et pour les conversations que nous avons pu avoir ;

- Aurore, tout abord sur le plan scientifique pour m'avoir formé à la culture cellulaire et pour tes investissements dans les projets, et personnellement, pour nos échanges sur les séries TV, les voyages et autres sujets comme le chocolat (noir bien sûr !...);

- Agnès.H, ma comparse en salle d'expérimentation à l'animalerie, un grand merci pour tous les conseils en chirurgie et sur la prise en charge des animaux, pour ton implication dans les projets. Merci aussi pour les nombreuses conversations personnelles sur les BDs, les voyages et encore le cinéma que nous avons pu avoir au cours de ces trois dernières années.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer:

- à l'équipe d'Antoine Magnan pour les investigations sur la fonction respiratoire des animaux ;

- à Vincent Sauzeau: pour ton expertise;

- à Xavier Prieur : merci pour ta confiance et ta disponibilité dans le cadre de la caractérisation cardiaque du modèle Bsc12.

Merci à tous les étudiants qui ont participé à mon évolution en tant qu'encadrant et de m'avoir supporté... Je pense plus particulièrement à Andréa et Emeline, les deux dernières et les meilleures !... (Attention aux chevilles les filles...) Même si j'ai eu à vous reprendre sur votre gestuelle au cours des « manip » et de la transmission ou présentation de vos idées, j'espère ne pas vous avoir traumatisées... mais au contraire vous avoir transmises un peu de ma passion pour la recherche.

A Corinne, merci pour ton attention et toutes les démarches que tu as pu réaliser pour moi.

Merci à Marie-France, Martine et Thierry pour vos discussions et les rires autour de cette bonne vieille cafetière Senseo qui a fait couler un nombre incalculable de cafés dans mon mug...

Merci aux autres membres de l'institut du Thorax qui donnent vie à ce laboratoire et pour la bonne ambiance qu'ils transmettent chaque jour.

Aux membres de l'équipe de l'Unité Thérapeutique Expérimentale, merci de votre disponibilité, votre bonne humeur et votre travail sans lesquels les conditions des animaux et d'expérimentation ne seraient pas idéales. Votre investissement est un gage de qualité pour nos travaux de recherche.

Merci à Thierry Dintinger de m'avoir permis de réaliser une année de monitorat au cours de ma 3<sup>ème</sup> année de thèse. Sans les citer, merci à tous les membres de l'équipe enseignante que j'ai eu la chance de croiser, pour leur bonne humeur et leurs conseils. Cette expérience d'enseignement, aussi courte soit-elle, a été personnellement riche et très formatrice. Si la possibilité avait pu se présenter, j'aurais signé pour une autre année avec grand plaisir !

A Mallo, (alias « ma maman scientifique » comme tu le dis si bien, même si je te définirai comme « Jiminy Cricket » 1<sup>er</sup> du nom...), 7 ans sont déjà passés depuis que j'ai passé la porte du

gymnase au dessus de l'IUFM pour taper du volant !!!... Un grand merci pour ta présence, ton soutien, ton écoute, ta disponibilité à aller boire une bière ou autres...et tester les restaurants nantais au cours de toutes ces années ! Ayant tous les deux la même façon d'appréhender les choses, tu as été l'une des personnes qui a su apporter les conseils quand ils devaient être transmis, encore merci pour tout ça. Notre amitié se sera forgée avec et sans la science !

A Lili (alias « Jiminy Cricket », 2<sup>ème</sup> du nom ...), merci pour tous tes conseils, ton écoute et ton soutien au cours de ces trois dernières années, pour ta présence et ton amitié.

A Maxime (alias Maxou ou mon collègue pour les conneries sur des bonbons suisses et autres...), Julie (alias Juju ou La suisse disant ne pas l'être...), Emilie (alias l'Infirmière!...) et Laurent (alias Lolo ou Mister Power Ranger... avec Mamette bien sûr...), merci pour tous les bons moments passés et à venir!

A Romain (alias le Jeune...), Gwladys (alias Glad la mère maquereille...), David (alias Ma poule ou le précieux de Gollum...), Fanny (alias Gollum, oui je sais c'est facile mais actualisé!...), Romain (Alias mon Grand ou le Chieur...), Kristel (alias Petit Scarabée ou la porteuse de Petit Pois...), merci à tous pour votre amitié inconditionnelle, votre soutien et toutes ces soirées qui ont été ressourçantes.

A mes deux retraités (ou vieux croûtons défraîchis...) préférés... Je ne vous remercierai jamais assez d'être présents pour votre éducation et les valeurs que vous m'avez transmis, pour votre soutien permanent et inébranlable, et pour m'avoir toujours donné la liberté de faire mes choix et les opportunités de les accomplir au cours de ce long parcours. L'expérience de la thèse n'aurait pas vu le jour sans vous. Merci à tous les deux.

A ma « very old old old sister »... Au delà de ton soutien matériel, merci pour ta présence, ta bonne humeur, ta volonté à vouloir me changer les esprits en faisant seulement ce que sont capables de faire des enfants Jagu...

A toi, ma « Penny » ma moitié juridique ou encore la rédactrice en chef de « radio boulet »... Tu es arrivée dans ma vie au début de cette thèse. Même si, je ne l'ai pas forcément toujours montré, ta présence, ton soutien et ton écoute ont été importants dans l'accomplissement de cette période de ma vie. Même si ce message n'est pas réellement représentatif de l'importance que tu représentes pour moi, merci d'être là pour tout ce que tu m'apportes. Tendrement.

**"L'expérience est une bougie qui n'éclaire que celui qui la porte."**

Confucius

**"Much to learn, you still have."**

Yoda

# SOMMAIRE

<b>Table des illustrations.....</b>	<b>1</b>
<b>Index des Tableaux.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>1</b>
<b>I- Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>I-1 Le réseau artériel coronarien et le métabolisme cardiaque : rappels généraux.....</b>	<b>1</b>
I-1-1 Le réseau artériel coronarien .....	1
I-1-2 Métabolisme cardiaque : une respiration cellulaire aérobie, un mécanisme clé pour l'intégrité de la fonction cardiaque.....	2
<b>I-2 L'infarctus du myocarde : diagnostic et prise en charge.....</b>	<b>2</b>
I-2-1 Les pathologies coronariennes : un enjeu de santé publique .....	2
I-2-2 Le syndrome coronarien aigu .....	3
I-2-2-1 L'athérosclérose et le syndrome coronarien aigu .....	3
I-2-2-2 Les étiologies non athéromateuses du SCA.....	5
I-2-3 Le diagnostic clinique et les différentes classes du syndrome coronarien aigu pour une prise en charge adaptée.....	5
I-2-3-1 L'évaluation clinique .....	5
I-2-3-2 L'électrocardiogramme.....	5
I-2-3-3 Les biomarqueurs de l'infarctus du myocarde.....	7
I-2-3-4 L'échocardiographie au cours de la phase aiguë de l'IDM .....	8
I-2-4 La stratification du risque de mortalité à court terme suite à un infarctus du myocarde ST+ .....	14
I-2-5 La prise en charge de l'infarctus du myocarde avec un sus décalage du segment ST. ....	14
I-2-5-1 La prise en charge prophylactique initiale de l'IDM-ST+.....	15
I-2-5-2 La restauration de la circulation coronaire et la reperfusion du myocarde.....	15
I-2-5-3 Une thérapie adjuvante contre l'agrégation plaquettaire .....	16
I-2-5-4 La prise en charge prophylactique secondaire des patients IDM-ST+ .....	17
<b>I-3 Les modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde .....</b>	<b>18</b>
I-3-1 Les modèles d'infarctus du myocarde.....	18
I-3-2 Le modèle d'ischémie reperfusion (I/R) .....	19
I-3-3 Les modèles d'ischémie chronique .....	20

<b>I-4 Physiopathologie du remodelage ventriculaire gauche et complications associées à l'infarctus du myocarde.....</b>	<b>20</b>
I-4-1 Le remodelage de la zone de l'infarctus.....	20
I-4-1-1 La phase inflammatoire de l'IDM.....	21
I-4-1-2 La phase de prolifération de l'IDM .....	22
I-4-1-3 La phase de maturation de l'IDM .....	23
I-4-1-4 Les conséquences associées au remodelage de la cicatrice myocardique .....	23
I-4-2 Le remodelage globale du ventricule gauche suite à un infarctus du myocarde.....	25
I-4-2-1 L'évolution naturelle du remodelage ventriculaire gauche après un infarctus du myocarde.....	25
I-4-2-2 Les composantes tissulaires, cellulaires et moléculaires du remodelage cardiaque gauche en lien avec une augmentation de l'arythmogénicité du myocarde.....	28
I-4-2-3 Controverse sur les différences inter espèces du remodelage cardiaque au cours de la phase aiguë de l'IDM.....	32
I-4-3 L'insuffisance cardiaque gauche et ses complications.....	33
I-4-3-1 Définition, symptômes et classifications de l'insuffisance cardiaque .....	33
I-4-3-2 Les complications de l'insuffisance cardiaque gauche.....	34
<b>I-5 Les arythmies ventriculaires associées aux remodelages induits par l'infarctus du myocarde .....</b>	<b>36</b>
I-5-1- Les bases de l'électrophysiologie cardiaque au niveau ventriculaire .....	36
I-5-1-1 Le(s) potentiel(s) d'action ventriculaire(s) .....	36
I-5-1-2 La conduction cardiaque ventriculaire.....	39
I-5-2 Les arythmies ventriculaires : mécanismes et définitions.....	40
I-5-2-1 Les anomalies de génération de l'influx .....	40
I-5-2-2 Les anomalies de la conduction de l'influx : les réentrées .....	41
I-5-2-3 Les arythmies ventriculaires et les mécanismes associés à leur genèse .....	44
I-5-3- Les origines et les cinétiques d'apparition des arythmies ventriculaires suite à une ischémie du myocarde.....	47
I-5-3-1 Les arythmies ventriculaires de la phase 1 de l'IMA .....	48
I-5-3-2 Les arythmies ventriculaires de la phase 2 de l'IMA .....	55
I-5-3-3 Les arythmies ventriculaires de la phase 3 .....	58
I-5-4 La mort subite cardiaque : une complication dévastatrice de l'infarctus du myocarde.....	64
I-5-4-1 La mort subite cardiaque : définition, mécanismes et épidémiologie.....	64
I-5-4-2 Les traitements préventifs des troubles du rythme et de la mort subite après l'IDM aigu.....	65
I-5-4-3 La stratification du risque de mort subite après l'IDM aigu.....	66
<b>I-6 Le canal sodique voltage dépendant Nav1.5 : de la physiologie à la physiopathologie cardiovasculaire.....</b>	<b>69</b>

I-6-1 Le canal sodique Nav1.5 : structure et rôles .....	69
I-6-1-1 Structure du canal sodique Nav1.5 .....	69
I-6-1-2 Le fonctionnement et les rôles canoniques de Nav1.5.....	70
I-6-1-3 Les rôles non canoniques de Nav1.5.....	72
I-6-2 L'expression et les régulations du gène SCN5A, des ARN messagers Scn5a et de Nav1.5 au niveau cardiovasculaire.....	73
I-6-2-1 L'expression de Nav1.5 dans le cœur .....	74
I-6-2-2 La structure du gène SCN5A et ses régulations transcriptionnelle et post transcriptionnelle.....	74
I-6-2-3 Les modifications post traductionnelles de Nav1.5 .....	75
I-6-2-4 Nav1.5 et ses protéines partenaires .....	77
I-6-3 Nav1.5 et les cardiomyopathies héréditaires.....	77
I-6-4 Nav1.5 et les cardiomyopathies acquises d'origine ischémique : l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque .....	79
I-6-4-1 Les modifications de Nav1.5 au cours de la phase aigue de l'IDM .....	79
I-6-4-2 Les modifications de Nav1.5 au cours de l'insuffisance cardiaque.....	80
<b>II- Les objectifs généraux de la thèse .....</b>	<b>83</b>
<b>II-1 Présentation du travail de synthèse sur le contexte de mon sujet de thèse.....</b>	<b>83</b>
<b>II-2 Participation à la caractérisation du modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup> .....</b>	<b>83</b>
<b>II-3 Projet n°1 : Etude des implications du gène SCN5A dans la survenue des arythmies et des remodelages ventriculaires observés lors d'un infarctus du myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire .....</b>	<b>83</b>
<b>II-4 Projet n°2 : Caractérisation de la structure et de la fonction cardiaque d'un nouveau modèle murin exprimant la mutation humaine T220I responsable d'une perte de fonction modérée pour Nav1.5. ....</b>	<b>84</b>
<b>II-5 Projet n°3 : Caractérisation de l'expression et fonctionnelle pour Nav1.5 dans le poumon chez la souris .....</b>	<b>84</b>
<b>II-6 Projet n°4 : Caractérisation d'une cardiomyopathie dans un modèle murin d'inactivation pour le gène BSCL2.....</b>	<b>84</b>
<b>III- Présentation du travail de synthèse portant sur les différents impacts fonctionnels de variations génétiques associées à l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme et la mort subite cardiaque .....</b>	<b>85</b>
<b>III-1 Le contexte ayant défini le sujet de ce travail de synthèse .....</b>	<b>85</b>
<b>III-2 Les objectifs de ce travail de synthèse .....</b>	<b>85</b>
<b>IV- Le modèle murin d'inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A: antécédents et contributions personnelles .....</b>	<b>86</b>
<b>IV-1 Ce que l'on savait du modèle Scn5a<sup>+/-</sup> .....</b>	<b>86</b>
<b>IV-2 Mes contributions aux travaux de caractérisation sur le modèle Scn5a<sup>+/-</sup> .....</b>	<b>89</b>
IV-2-1- Caractérisations transcriptomiques .....	90

IV-2-1-1 Approches par PCR quantitative.....	90
IV-2-1-1 Approche par RNASeq .....	91
IV-2-2- Caractérisation échocardiographique.....	92
<b>V- Projet n°1 : Etude des implications du gène SCN5A dans la survenue des arythmies et des remodelages ventriculaires observées lors d'un infarctus du myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire .....</b>	<b>94</b>
Contexte.....	94
Objectifs de mon sujet de doctorat .....	94
Introduction .....	97
Matériels et méthodes .....	97
Résultats .....	101
Discussion .....	108
Conclusions et perspectives .....	126
<b>VI- Projet n°2 : Caractérisation de la structure et de la fonction cardiaque d'un nouveau modèle murin exprimant la mutation humaine T220I responsable d'une perte de fonction modérée pour Nav1.5. ....</b>	<b>128</b>
Contexte.....	128
Objectifs et contributions aux travaux.....	128
Introduction .....	129
Matériels et méthodes .....	131
Résultats .....	133
Discussion .....	138
<b>VII- Projet n°3 : Expression et fonction du canal Nav1.5 dans le poumon chez la souris. ....</b>	<b>141</b>
Contexte.....	141
Objectifs et contributions des collaborations au projet.....	141
Introduction .....	142
Matériel et méthodes .....	144
Résultats .....	145
Discussion .....	148
<b>VIII- Projet n°4 - Caractérisation d'une cardiomyopathie dans un modèle murin d'invalidation pour le gène Bsl2 : un modèle animal pour la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip.....</b>	<b>152</b>
Contexte.....	152
Objectifs et contributions .....	152
Introduction .....	154
Matériels et méthodes .....	154

<b>Résultats .....</b>	<b>155</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>162</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>164</b>
<b>IX- Discussion générale et conclusions .....</b>	<b>165</b>
<b>X- Annexe n°1: Publication de mon travail de synthèse portant sur les différents impacts fonctionnels de variations génétiques associées à l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme et la mort subite cardiaque. ....</b>	<b>169</b>
<b>XI- Annexe n°2: Papier caractérisation Scn5a<sup>+/-</sup> Derangeon et al.....</b>	<b>183</b>
<b>XII- Bibliographie .....</b>	<b>213</b>
<b>Résumés.....</b>	<b>.....</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1:</b> Réseau coronarien.....	1
<b>Figure 2:</b> Schéma récapitulatif de l'association entre l'évolution de l'athérosclérose et les différentes classes du syndrome coronarien aigu.....	4
<b>Figure 3:</b> Tracés caractéristiques d'un ECG normal, avec une dépression du segment ST, une onde T négative et une sus élévation du segment ST observables lors d'un enregistrement de l'ECG chez un patient présentant les symptômes d'un SCA.....	6
<b>Figure 4:</b> Représentation des cinétiques d'expression de différents biomarqueurs sériques après un infarctus du myocarde. ....	8
<b>Figure 5:</b> Représentation des différents plans et segments recommandés par l'AHA pour l'établissement du score de motilité du myocarde au cours de l'IDM aigu.....	9
<b>Figure 6:</b> Evaluation de la fonction diastolique.....	11
<b>Figure 7:</b> Illustrations de différentes complications de l'IDM aigu.....	12
<b>Figure 8:</b> Les phases du processus de cicatrisation du myocarde suite à un infarctus.....	22
<b>Figure 9:</b> La rupture de la paroi myocardique.....	24
<b>Figure 10 :</b> Le remodelage ventriculaire gauche suite à un infarctus du myocarde.....	26
<b>Figure 11:</b> Insuffisance cardiaque, et conséquences.....	34
<b>Figure 12:</b> Les potentiels d'action ventriculaires.....	37
<b>Figure 13:</b> Les trois composantes différentes conditionnant la conduction cardiaque ventriculaire...39	39
<b>Figure 14:</b> Les activités déclenchées.....	41
<b>Figure 15:</b> Les phénomènes de réentrée.....	43
<b>Figure 16:</b> Les extrasystoles ventriculaires.....	45
<b>Figure 17 :</b> Les tachycardies ventriculaires.....	46
<b>Figure 18:</b> La fibrillation ventriculaire.....	47
<b>Figure 19:</b> Les arythmies de la phase 1a suite à une ischémie du myocarde.....	49
<b>Figure 20:</b> Les arythmies de la phase 1b suite à une ischémie du myocarde.....	52
<b>Figure 21:</b> Les arythmies de la phase 2 suite à une ischémie du myocarde.....	56
<b>Figure 22:</b> Le mécanisme de la rentrée au niveau de la zone épicaudique bordant l'infarctus chez le chien.....	59
<b>Figure 23:</b> Diagramme de l'interaction entre les mécanismes des déclencheurs cellulaires et des substrats tissulaires impliqués dans l'arythmogénicité au cours de l'insuffisance cardiaque.....	63
<b>Figure 24:</b> Structure du canal sodique voltage dépendant Nav1.5.....	70
<b>Figure 25:</b> Le cycle de vie du gène SCN5A à la protéine Nav1.5 et ses multiples niveaux de régulation.....	73
<b>Figure 26:</b> Nav1.5 et cardiomyopathies héréditaires.....	78
<b>Figure 27:</b> Insuffisance haplotypique de Nav1.5 et maladie de Lenègre.....	86
<b>Figure 28:</b> Pénétrance et invalidation à l'état hétérozygote du gène SCN5A chez la souris.....	88
<b>Figure 29:</b> Evaluations transcriptomiques de la fibrose et conduction cardiaques dans le modèle murin Scn5a <sup>+/-</sup> au cours du vieillissement.....	90

<b>Figure 30:</b> Evaluations échocardiographiques des remodelages structuraux et fonctionnels du modèle murin <i>Scn5a</i> <sup>+/-</sup> au cours du vieillissement.....	92
<b>Figure 31:</b> Les hypothèses de la mon doctorat.....	95
<b>Figure 32 :</b> Incidences utilisées en échocardiographie pour réaliser l'index de troubles segmentaires ou « wall motion score index » en anglais.....	99
<b>Figure 33:</b> Remodelages cardiaques structural et fonctionnel à 48h post IDM.....	102
<b>Figure 34:</b> Arythmies ventriculaires et propriétés électrophysiologiques au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde.....	103
<b>Figure 35:</b> Expressions des cytokines pro-inflammatoires à 48h post IDM.....	105
<b>Figure 36:</b> Remodelage de la matrice extracellulaire à 48h post IDM.....	106
<b>Figure 37:</b> La rupture myocardique en phase aiguë et les remodelages post-IDM.....	107
<b>Figure 38:</b> Figure récapitulant les données majeures observées au cours de ces travaux de thèse...108	108
<b>Figure 39:</b> Durées du QRS et dérivation du modèle <i>Scn5a</i> <sup>+/-</sup> sur le fond C57Bl/6.....	121
<b>Figure 40:</b> Perspectives à la suite de mes travaux de thèse.....	126
<b>Figure 41:</b> Allèles et génotypage des animaux.....	131
<b>Figure 42:</b> Caractérisation électrophysiologique de la mutation T220I à partir de cardiomyocytes isolés d'animaux âgés de 6-7 semaines.....	133
<b>Figure 43:</b> Etude de la réserve de conduction des animaux à 12-15 semaines.....	135
<b>Figure 44:</b> Télémétrie ECG à 12-15 semaines.....	136
<b>Figure 45:</b> Etudes protéiques à 12-15 semaines.....	137
<b>Figure 46:</b> Caractérisation des expressions de <i>Scn5a</i> et <i>Nav1.5</i> dans la sphère pulmonaire chez la souris âgée de 35 à 40 semaines.....	146
<b>Figure 47:</b> <i>Nav1.5</i> et fonction respiratoire: modèle <i>Scn5a</i> <sup>+/-</sup> .....	147
<b>Figure 48:</b> <i>Nav1.5</i> et fonction respiratoire: modèle murin <i>SCN5A T220I</i> .....	147
<b>Figure 49:</b> <i>SCN5A</i> et remodelage pulmonaire.....	148
<b>Figure 50:</b> Caractérisations de la lipodystrophie et des troubles métaboliques associés chez des souris sauvages et KO <i>Bscl2</i> âgées de 3 mois.....	156
<b>Figure 51:</b> Caractérisations de la gravimétrie et du métabolisme lipidique cardiaques chez des souris âgées de 3 mois.....	157
<b>Figure 52:</b> Stress oxydant cardiaque et déficience en seipine.....	158
<b>Figure 53:</b> Niveaux d'expression de gènes cibles potentiellement impliqués dans un remodelage cardiaque et caractérisation électrocardiographique chez des souris non vigiles.....	159
<b>Figure 54:</b> Caractérisations échocardiographiques structurales et fonctionnelles chez des souris âgées de 3 mois.....	160
<b>Figure 55:</b> Evaluations des effets d'un traitement de 9 semaines aux thiazolidinediones (TZD) sur les phénotypes métabolique et cardiaque d'animaux KO <i>Bscl2</i> .....	161
<b>Figure 56:</b> Conclusions et perspectives générales de mon doctorat.....	165

## INDEX DES TABLES

<i>Table 1: Paramètres échocardiographiques du modèle T220I sur le fond C57Bl/6 et Sv129 à 12-15 semaines.....</i>	<i>134</i>
<i>Table 2: Paramètres ECG non vigiles du modèle T220I sur le fond C57Bl/6 et Sv129 à 12-15 semaines.....</i>	<i>135</i>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ACC** : American College of Cardiology

**AHA** : American Heart Association

**ANP** : Atrial Natriuretic Peptide

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ATP** : Adénosine TriPhosphate

**BNP** : Brain Natriuretic Peptide`

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium

**CaM** : Calmoduline

**CaMKII** : Kinase dépendant de la CaM de type II

**CK** : Créatine Kinase

**CTGF** : Connective Tissue Growth Factor

**Cx43** : Connexine 43

**DAD** : Delayed After Depolarization

**EAD** : Early After Depolarization

**ECG** : ElectroCardioGramme

**ESV** : ExtraSystole Ventriculaire

**FEVG** : Fraction d'Ejection du VG

**FV** : Fibrillation Ventriculaire

**HEK** : Human Embryonic Kidney

**HTP** : HyperTension Pulmonaire

**HRV** : Heart Rate Variability

**IC** : Insuffisance Cardiaque

**ICP** : Intervention Coronariennes Percutanée

**IDM** : Infarctus Du Myocarde

**IL** : InterLeukine

**IMA** : Infarctus du Myocarde Aigu

**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique

**KO** : Knock-out

**KOM** : Animal Scn5a<sup>+/-</sup> de phénotype mineur

**KOS** : Animal Scn5a<sup>+/-</sup> de phénotype sévère

**LOX** : Lysyl-Oxydase

**MCS** : Mort Subite Cardiaque

**MHC** : Myosin Heavy Chain

**MEC** : Matrice ExtraCellulaire

**MMP** : MétalloProtéinase Matricielle

**NGF** : Nerve Growth Factor

**NYHA** : New York Heart Association

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PA** : Potentiel d'Action

**PKA** : Protéine Kinase A

**PKC** : Protéine Kinase C

**PKP2** : Plakophiline 2

**PLN** : Phospholamban

**PRA** : Période Réfractaire Absolue

**PRR** : Période Réfractaire Relative

**PRE** : Période Réfractaire Effective

**RE** : Réticulum Endoplasmique

**RS** : Réticulum Sarcoplasmique

**RyR** : Récepteur à la Ryanodine

**SCA** : Syndrome Coronarien Aigu

**SERCA2a** : pompe ATPase Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarco-endoplasmique

**$\alpha$ -SMA** :  $\alpha$ - Smooth Muscle Actin

**SPARC** : Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine

**SPS** : Système nerveux ParaSympathique

**SS** : Système nerveux Sympathique

**TD** : Temps de Décélération de l'onde E

**TGF** : Transforming Growth Factor

**TIMPs** : Inhibiteurs des MMPs

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**TV** : Tachycardie Ventriculaire

**UTR** : UnTranslated Region

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VG** : Ventricule Gauche

**WMSI** : Wall Motion Score Index

**WT** : Sauvage

**ZI** : Zone Infarciée

**ZNI** : Zone Non Infarciée

## AVANT-PROPOS

L'Institut du thorax, Inserm UMR1087 et CNRS UMR6291, à Nantes, travaille historiquement sur l'identification de variations génétiques, mutations ou polymorphismes, associés au développement de cardiomyopathies congénitales présentant des répercussions arythmiques ou structurales.

L'existence d'une pénétrance incomplète pour de nombreuses mutations, notamment pour les canalopathies associées aux mutations pour le gène SCN5A, suggère une complexité dans l'expression du phénotype qui va au delà d'une simple transmission passive d'une mutation. Cette complexité laisse un vaste champ de recherche aux généticiens avec la prise en considération 1) des empreintes génétiques des patients dans leur globalité, 2) de l'environnement dans lequel ils évoluent, 3) de l'identification de facteurs modulateurs et cela afin d'expliquer la diversité d'expression phénotypique ou de sévérité pour une pathologie entre différents membres d'une même famille.

L'identification de ces facteurs modulateurs pourrait améliorer non seulement la stratification du risque pour des pathologies d'origine génétique, mais également pour des pathologies acquises. A terme, l'identification de ces facteurs pourrait permettre 1) de répondre plus rapidement, 2) de traiter plus efficacement, 3) de diminuer la mortalité des patients à haut risque, ainsi que 4) de réduire les coûts de santé pour la société civile.

Malgré les améliorations de la prise en charge et des traitements administrés par des structures de soins toujours plus spécialisées, ainsi que des campagnes de prévention toujours plus « agressives » nous sensibilisant pour les facteurs de risques cardiovasculaires, les cardiomyopathies acquises, comme l'infarctus du myocarde ou l'insuffisance cardiaque qui en découle, restent des causes majeures de mortalité dans les pays industrialisés notamment *via* la survenue de morts subites cardiaques.

Mon équipe d'accueil, intitulée « Cardiomyopathies et mort subite » et dirigée par le Dr Flavien Charpentier, travaille essentiellement sur les associations pouvant exister entre les mutations pour le gène SCN5A, codant pour le canal sodique Nav1.5, et des pathologies telles que le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long de type 3 et la maladie de Lenègre caractérisée par le développement progressif d'une fibrose cardiaque associée à des troubles de conduction au cours du vieillissement.

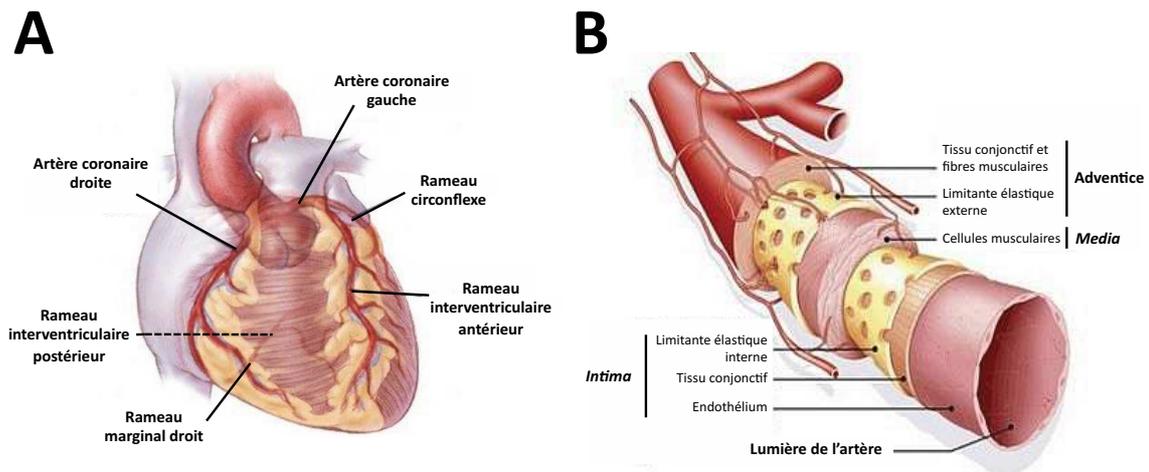
Dans ce contexte, mon doctorat s'intègre à la croisée des thématiques de recherche entre les cardiomyopathies de types congénitale et acquise. Il a consisté à étudier la prédisposition génétique des altérations de l'expression et/ou de l'activité de Nav1.5 dans la survenue de troubles du rythme ventriculaire ainsi que les remodelages cardiaques suite à un infarctus du myocarde. Pour répondre à ces objectifs, des modèles murins d'inactivation pour le gène SCN5A ou porteur de mutation dite « perte de fonction » ont ainsi pu être utilisés dans ces contextes physiopathologiques.

## I- Introduction

### I-1 Le réseau artériel coronarien et le métabolisme cardiaque : rappels généraux

#### I-1-1 Le réseau artériel coronarien

Le réseau coronarien débute par les artères coronaires gauche et droite qui prennent leur origine à la base de l'aorte. Ces deux artères vont donner un réseau de ramifications et de nombreuses anastomoses, aussi appelées collatérales. Elles pourront ainsi permettre une perfusion globale du myocarde afin d'assurer sa fonction (Figure 1A).



**Figure 1: Réseau coronarien.** A, Illustration du cœur avec une représentation non exhaustive de son réseau artériel coronarien (modifiée à partir Cardioparamed.com). B, Schéma de la structure de la paroi vasculaire représentative d'une artère coronaire (modifiée à partir Sanofis-aventis France).

Les artères coronaires, appartenant aux artères de résistance (Figure 1B), vont fournir un apport sanguin intermittent et rythmique intimement lié au cycle cardiaque : le sang va pouvoir circuler au cours de la diastole lorsque le myocarde se relaxe. En revanche, au cours de la systole, les artères coronaires comprimées par le myocarde contracté vont avoir leurs entrées partiellement obstruées par la valve aortique, le sang n'est alors plus en mesure de circuler dans le réseau artériel coronarien (Marieb, 6<sup>ème</sup> édition, 2005).

La constitution du réseau coronarien est très variable en fonction des individus : la prévalence de ces variations est de 1% où 9 cas sur 10 sont congénitaux, et 1 cas sur 10 sont des fistules coronariennes. Les anomalies les plus fréquentes sont la naissance séparée de l'artère interventriculaire antérieure et de l'artère circonflexe, puis celles associées à la naissance de l'artère coronaire droite ou de la circonflexe à partir des sinus coronaires, provoquant une ischémie myocardique (Yidiz et al., 2010). Dans certains cas, le trajet des artères peut être intramusculaire, on parle alors de trajet intramyocardique ou de pont myocardique. Cette anomalie peut se manifester par une douleur angineuse liée à un écrasement de l'artère au cours de la contraction cardiaque. Elle est

plutôt fréquente car identifiée chez près de 30% des scanners coronariens et plus particulièrement au niveau de l'artère interventriculaire antérieure (Konen et al., 2007).

### ***I-1-2 Métabolisme cardiaque : une respiration cellulaire aérobie, un mécanisme clé pour l'intégrité de la fonction cardiaque***

Les besoins en nutriments et apports gazeux, par le cœur, s'avèrent être les plus importantes de l'organisme (Weiss et al., 2004).

Le contenu en ATP dans le myocarde est bas avec un taux d'hydrolyse élevé dans des conditions normales. Ainsi, la concentration en ATP est complètement recyclée toutes les 10 secondes. La réserve en énergie du cœur a été évaluée comme étant équivalente à celle nécessaire pour assurer seulement 3 battements cardiaques. Dans des conditions normales, plus de 95% de l'ATP produit par le cœur proviennent de la phosphorylation oxydative liée à la respiration cellulaire aérobie au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans une moindre mesure, les 5% restants proviennent de la glycolyse et du cycle de Krebs (Doesnt et al., 2013).

En terme de substrats métaboliques utilisés pour synthétiser l'ATP, le cœur utilise prioritairement les acides gras (70-90%), le glucose (10-30%), puis en faibles quantités, les corps cétoniques et certains acides aminés. Cependant, le mode de sélection des substrats utilisés par le cœur, pour fournir l'énergie dont il a besoin, peut varier en fonction du régime alimentaire (Doesnt et al., 2013). Ceci montre des capacités d'adaptation et de flexibilité du myocarde en fonction du profil métabolique à disposition par l'utilisation des différentes voies métaboliques.

A la vue des éléments précédents, contrairement au muscle squelettique qui peut se contracter pendant de longues périodes en « présence réduite d'oxygène », le muscle cardiaque fonctionne exclusivement sur une respiration cellulaire aérobie. Ceci nécessite logiquement une forte consommation en oxygène pour assurer ses fonctions. Donc, le cœur s'avère être plus sensible à la perte d'oxygène que celles des nutriments. Cette caractéristique explique les altérations structurales et fonctionnelles faisant suite à une hypoxie ou une ischémie du myocarde.

## **I-2 L'infarctus du myocarde : diagnostic et prise en charge**

### ***I-2-1 Les pathologies coronariennes : un enjeu de santé publique***

Selon l'OMS en 2012, les maladies cardiovasculaires sont les causes majeures de décès dans les pays industrialisés et tendent à le devenir dans les pays émergents. Parmi elles, les pathologies coronariennes représentent les manifestations les plus courantes, associées à une forte morbi-mortalité. Leur prévalence est en constante augmentation et il est prédit que d'ici 2020, ces pathologies deviendront la cause majeure de décès dans le monde (Answaruddin et al., 2007). Le risque de développer une pathologie coronarienne après 40 ans est de 49% pour les hommes et de 32% pour les femmes. Toutes les 25 secondes, approximativement, une personne présente à une attaque coronarienne, et toutes les minutes, une personne en décède. Dans la première année qui suit l'attaque

coronarienne, 34% des personnes atteintes décèdent des complications engendrées par cette dernière (Roger et al., 2011).

Les manifestations cliniques des pathologies coronariennes se présentent sous 5 entités différentes : une ischémie silencieuse, l'angine de poitrine, un infarctus du myocarde (IDM), une insuffisance cardiaque ou la mort subite, dans son cas extrême (Hamm et al., 2011).

### ***I-2-2 Le syndrome coronarien aigu***

Parmi les pathologies coronariennes, le syndrome coronarien aigu (SCA) se réfère à tout patient présentant des symptômes cliniques compatibles avec une ischémie myocardique (Kumar et al., 2009).

Une ischémie du myocarde se définit comme une inadéquation entre les besoins et les apports en oxygène et nutriments fournis par le réseau coronaire (Thygesen et al., 2007).

Le SCA est divisé en trois classes de pathologies en fonction de leur diagnostic clinique et de leur sévérité: 1) l'angor instable, 2) l'infarctus du myocarde aigu sans *ST* décalage persistant du segment ST et 3) l'infarctus du myocarde aigu avec *ST* décalage persistant du segment ST.

Malgré leur distinction, ces trois entités présentent une étiologie commune : l'athérosclérose, à l'origine de 70 à 80% des cas de SCA (Falk et al., 1995). Néanmoins, il semble que celle-ci ne puisse causer à elle seule la cardiomyopathie ischémique induite (Marzilli et al., 2012).

#### ***I-2-2-1 L'athérosclérose et le syndrome coronarien aigu***

De nos jours, l'athérosclérose est définie comme une pathologie inflammatoire chronique conduisant au remodelage de la paroi des artères de moyen et gros calibres dans des territoires vasculaires définis où le flux laminaire du sang est perturbé, comme cela est le cas dans les embranchements (Weber et al., 2011).

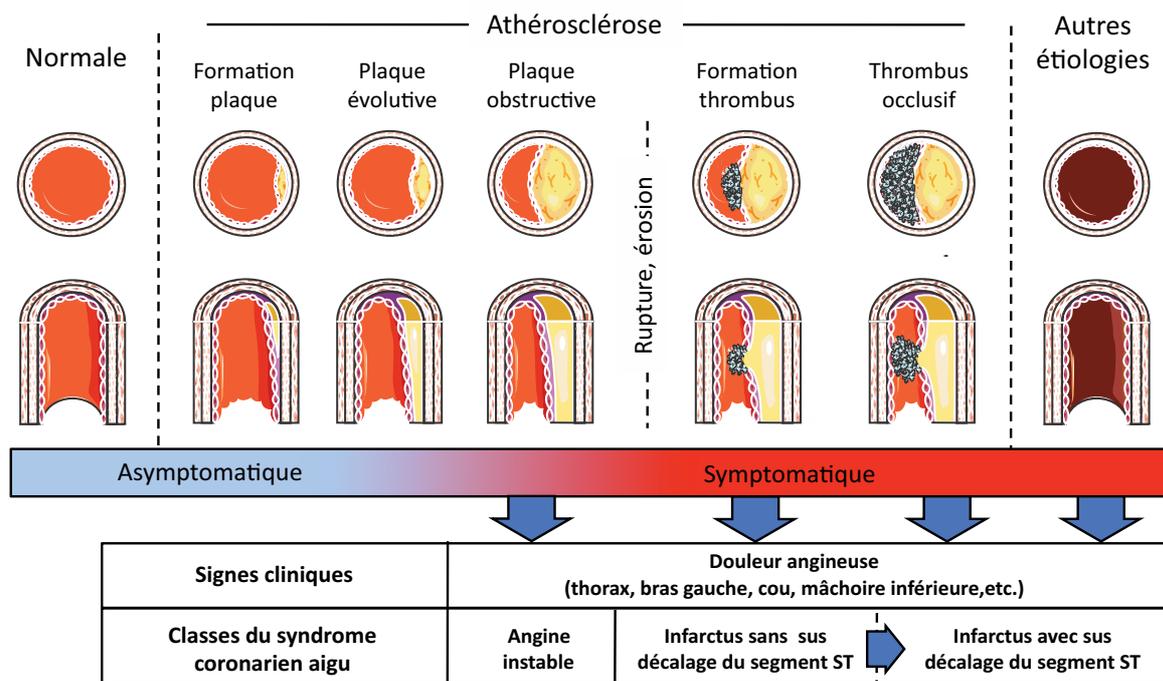
C'est une pathologie complexe dont l'élément causal est généralement une dysfonction endothéliale, à l'origine de stries lipidiques au niveau de l'*intima* des vaisseaux, structure impliquée à terme dans la formation de la plaque d'athérome. Cette intégration de lipide va engendrer à terme des réponses immunitaire et inflammatoire associées à un remodelage progressif de la paroi vasculaire impliquant de nombreux types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les cellules musculaires lisses entre autres.

L'athérosclérose, asymptomatique à ces premiers stades, va devenir progressivement symptomatique avec l'épaississement de la plaque d'athérome provoquant une sténose ou une obstruction partielle de l'artère. Ce phénomène peut être alors à l'origine de l'angine de poitrine stable lorsqu'il est concomitant avec un remodelage constrictif de l'artère, comme dans le cas de la pratique d'un exercice physique (Srikanth et al., 2012).

La phase symptomatique va progresser vers la formation d'une plaque d'athérome dite vulnérable qui va être le terrain de trois types de lésion responsables d'une activation de l'agrégation

plaquettaire et de la formation d'un thrombus : la rupture (55-65% des cas ou l'érosion de plaque d'athérome (30-35%), ou la formation de nodules calcifiées (2-7%) au niveau de celle-ci (Sakakura et al., 2013).

Avec une présentation réductionniste et une absence de nuance dans la complexité de ces événements, la formation d'un premier thrombus, plutôt instable et partiellement occlusif, va être à l'origine d'une réduction intermittente ou d'une embolie distale responsable du développement d'une angine de poitrine instable ou d'un infarctus sans sus décalage du segment ST à l'ECG. En revanche, en présence d'une synthèse de fibrine, une activation rapide du système de coagulation va permettre la formation d'un thrombus stable qui, à terme, va se développer et occlure l'artère provoquant une ischémie totale responsable d'un infarctus du myocarde avec, dans la majorité des cas, un sus décalage du segment ST (Srikanth et al., 2012) (Figure 2). Donc, en fonction de l'état de coagulation, un patient peut passer d'un IDM sans ou avec sus décalage du segment ST. Ces trois situations seront développées ici sur le plan du mécanisme physiopathologique. Elles ne seront réellement distinguables qu'après un diagnostic clinique complet.



**Figure 2: Schéma récapitulatif de l'association entre l'évolution de l'athérosclérose et les différentes classes du syndrome coronarien aigu.**

De manière intéressante, certaines études ont pu mettre en évidence que l'infarctus du myocarde, au cours de sa phase aiguë, pouvait accélérer le développement de l'athérosclérose. Des études précliniques et cliniques suggèrent que le contexte pro inflammatoire de cette phase précoce de l'infarctus du myocarde serait favorable à l'activation des leucocytes, responsables de l'accélération d'un élargissement la plaque d'athérome et de sa fissuration pouvant être à l'origine d'infarctus dits récurrents (Wang et al., 2013).

### ***I-2-2 Les étiologies non athéromateuses du SCA***

En dehors de l'athérosclérose, d'autres étiologies, plus rares, ont été identifiées et associées à des facteurs de risque environnementaux, iatrogènes et congénitaux.

Pour l'IDM avec un sus décalage permanent du segment ST, les étiologies non athéromateuses sont entre autres, le spasme coronaire prolongé, la cardiomyopathie de Tako-Tsubo, des artérites non athéromateuses, un traumatisme ou une anomalie congénitale des artères coronaires, et des causes hématologiques. La toxicomanie à la cocaïne est aussi une cause d'IDM aigu (McCord et al., 2008).

Dans le cas de l'angor instable et de l'IDM sans sus décalage du segment ST, les autres étiologies sont toutes des pathologies, conduisant à une inadéquation entre les apports et les besoins en oxygène, telle qu'une insuffisance ou un rétrécissement aortique, une cardiomyopathie hypertrophique obstructive, une tachycardie ou une hypotension prolongée, entre autres.

### ***I-2-3 Le diagnostic clinique et les différentes classes du syndrome coronarien aigu pour une prise en charge adaptée***

#### ***I-2-3-1 L'évaluation clinique***

Une douleur thoracique représente le second motif de visite aux services des urgences. Selon des cardiologistes, 50% des cas de douleurs thoraciques sont d'origine non cardiovasculaire. Bien que la douleur thoracique puisse être causée par de nombreuses pathologies cardiaques, la douleur associée aux maladies coronaires, appelée l'angine de poitrine, est la plus commune (Lenfant, 2010). Les symptômes connus lors d'une ischémie sont un malaise perçu au niveau de la cage thoracique épigastrique, des membres supérieurs ou de la mâchoire inférieure, à l'état de base ou sous effort. Généralement, ces symptômes sont accompagnés de dyspnée, de diaphorèse, de nausée ou d'une syncope. Dans 80% des cas de SCA, la douleur est prolongée, tandis que dans les 20% des cas restants, l'angine de poitrine apparaît ou s'accélère (van Domburg RT et al, 1998). Cependant, ces douleurs ne sont pas spécifiques d'une ischémie myocardique, mais peuvent être aussi attribuées à des atteintes gastro-intestinales, pulmonaires, neurologiques ou musculo-squelettiques. C'est pourquoi, dans cette situation, dans le cas d'infarctus associé à des symptômes atypiques ou l'absence de symptômes, l'examen du patient est complété par l'enregistrement et une évaluation de l'ECG, l'évaluation de biomarqueurs sanguins et une imagerie cardiaque (Thygesen et al., 2007).

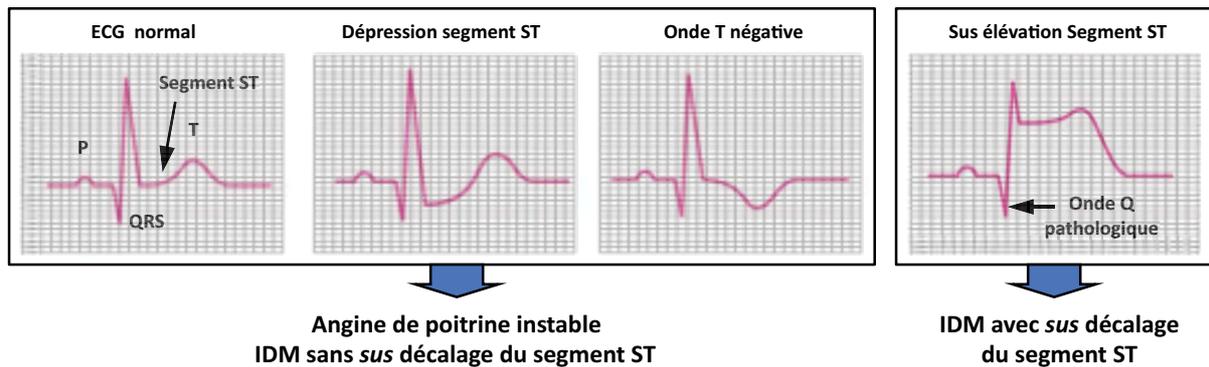
A ce jour, dans l'historique du patient, seule une histoire familiale de maladie coronarienne ou l'existence d'un antécédent d'événement coronaire sont investiguées pour orienter le diagnostic et la prise en charge du patient.

#### ***I-2-3-2 L'électrocardiogramme***

L'électrocardiogramme (ECG) à 12 dérivations reste l'outil clinique le plus utilisé pour diagnostiquer un infarctus (H. Yang et al, 2006). Les recommandations de l'ACC (American College

of Cardiology) et de l'AHA (American Heart Association) sont d'étudier, dans les 10 minutes suite à l'arrivée aux urgences, les résultats de l'ECG du patient présentant une douleur thoracique ou d'autres symptômes du syndrome coronarien aigu. La lecture de cet ECG va avoir un rôle clé dans le diagnostic et aider à la stratification du risque chez ces patients (Kumar et al., 2009).

Les anomalies de l'ECG liées à une ischémie myocardique peuvent se situer au niveau de l'intervalle PR, du complexe QRS, du segment ST ou de l'onde T. Les manifestations les plus précoces d'une ischémie myocardique vont être des modifications typiques de l'onde T et du segment ST (Thygesen et al, 2007). En ce sens, l'ECG va permettre au clinicien de distinguer l'angine instable d'IDM sans ou avec un *sus* décalage du segment ST (Figure 3).



**Figure 3: Tracés caractéristiques d'un ECG normal, avec une dépression du segment ST, une onde T négative et une *sus* élévation du segment ST observables lors d'un enregistrement de l'ECG chez un patient présentant les symptômes d'un SCA. Les 3 premiers tracés sont liés avec l'angine de poitrine instable ou un IDM sans *sus* décalage du segment ST. Le dernier tracé est caractéristique de ceux observés chez les patients présentant un IDM avec un *sus* décalage du segment ST (ECG: ElectroCardioGramme, IDM: Infarctus Du Myocarde, SCA: Syndrome Coronarien Aigu).**

Pour un IDM avec un *sus* décalage du segment ST, représentant 30% des cas d'infarctus, une élévation de l'amplitude de l'onde T peut être observée en phase hyper aiguë suivie par le *sus* décalage du segment ST. Ce dernier se définit comme une élévation de plus de 1mm du point J, point de jonction entre le QRS et l'onde T, sur au minimum deux dérivations consécutives.

En ce qui concerne l'angine de poitrine instable et l'IDM sans *sus* décalage du segment ST, soit 70% des cas d'IDM, les données de l'ECG peuvent être plus variables avec la présence d'une dépression du segment ST, des modifications de l'onde T comme une inversion, une élévation transitoire du segment ST, ou même un ECG normal. Néanmoins, seule l'évaluation des biomarqueurs de nécrose myocardique sera en mesure de permettre la distinction des deux pathologies.

La présence d'un bloc de branche gauche induit par l'infarctus peut être problématique pour l'identification de l'infarctus à l'aide d'un ECG.

Une augmentation de la profondeur et un élargissement de l'onde Q sont à la base d'une onde Q dite pathologique. Cette onde Q pathologique peut être le signe d'un infarctus transmural.

Cependant d'autres auteurs, plus prudents, considèrent ces modifications comme étant seulement le reflet d'un IDM de taille importante sans permettre pour autant de conclure sur sa transmuralité.

Une ischémie myocardique est un processus dynamique avec une évolution possible d'une occlusion partielle vers une occlusion totale de l'artère coronaire. L'ACC et l'AHA, préconisent ainsi un suivi ECG continu ou répété afin d'observer des évolutions éventuelles au cours du temps et ainsi apporter une prise en charge adaptée (Hamm et al, 2011).

Cependant, l'ECG 12 dériviations présente certaines limites. Tout d'abord, l'absence de modifications de l'ECG ne peut pas exclure la possibilité d'un syndrome coronarien dont les altérations ECG ne seront démasquées que plus tardivement. De plus, il n'est pas optimal pour l'étude des parois postérieure, apicale et latérale. En ce sens, la mise en place de l'utilisation d'un ECG à 24 dériviations pourrait augmenter la mise en évidence d'occlusion au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde notamment pour les obstructions des artères coronaires droite et circonflexe qui sont plus difficilement identifiables sur un ECG conventionnel (Pahlm et al, 2014).

### *I-2-3-3 Les biomarqueurs de l'infarctus du myocarde*

Un biomarqueur se définit comme une macromolécule libérée et détectable dans la circulation sanguine avec une fenêtre de temps compatible avec un diagnostic. Ces variations de quantité doivent permettre également d'évaluer le degré d'atteinte d'une pathologie ou l'effet d'un traitement sur une pathologie (Anderson et al., 2011).

Le dosage de biomarqueurs est une méthode employée depuis plus de 50 ans afin de diagnostiquer un IDM (Aldous, 2012). L'identification de nouveaux biomarqueurs, au fil des années, a permis de mettre en place une batterie de macromolécules augmentant la spécificité et la sensibilité du diagnostic, améliorant la prise en charge des patients avec des symptômes de syndrome coronaire aigu.

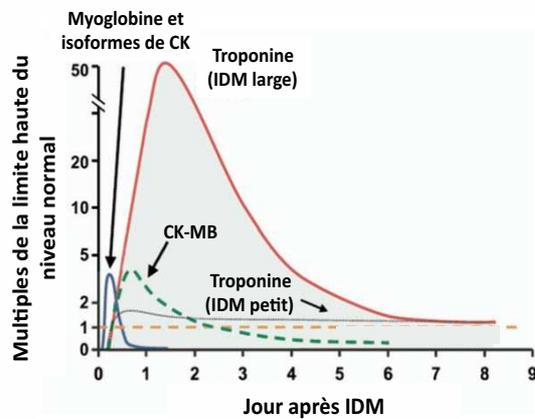
Les biomarqueurs de nécrose myocardique sont les plus classiquement utilisés en clinique. Leur cinétique d'apparition (Figure 4) et leur combinaison au cours du temps d'hospitalisation permettent d'établir un diagnostic fiable pour les cliniciens :

- La myoglobine, une protéine cytosolique de bas poids moléculaire, est le biomarqueur le plus précoce avec un pic maximum à une heure suite à l'infarctus. Malgré cette cinétique aiguë et une faible spécificité, il reste un marqueur participant au diagnostic et à la stratification du risque des patients dans les premières heures suivant l'IDM (Aldous, 2012).

- L'isoforme myocardique de la créatine kinase, ou CK-MB, a longtemps été le marqueur de référence pour le diagnostic de l'IDM. Cependant, elle est moins sensible et spécifique que les troponines cardiaques, car elle peut être aussi le reflet d'une atteinte du muscle squelettique. En revanche, du fait de sa demi-vie courte, un niveau de CK-MB élevé peut être un marqueur de l'extension de l'IDM lorsque les troponines sont élevées (Anderson et al., 2011).

- Les troponines cardiaques, TnI et TnT, donnent des résultats robustes et présentent de hautes sensibilité et spécificité pour la détection de nécrose myocardique avec une détection dans le sang

dans les 2 à 4 heures après l'apparition des symptômes de SCA jusqu'à 5 à 14 jours, voir 21 jours après l'événement coronarien (Anderson et al., 2011).



**Figure 4: Représentation des cinétiques d'expression de différents biomarqueurs sériques après un infarctus du myocarde.** L'évolution de chaque biomarqueur au cours du temps est représentée en multiples d'une valeur limite (Ligne pointillée jaune) définit comme étant les 99 centiles d'une population de référence ne présentant pas de nécrose myocardique. (CK: Créatine Kinase ; CK-MB: Isoforme myocardique de la CK; IDM: Infarctus du myocarde) (Figure modifiée d'après Jeffrey L. Anderson et al., *Circulation* 2011).

Dans un premier temps, l'augmentation de ces 3 biomarqueurs, en phase aiguë, va permettre de confirmer l'origine ischémique dans le cas d'un IDM avec un *sus* décalage du segment ST. Mais elle peut aussi permettre d'exclure le diagnostic d'une angine instable pour conclure à la présence d'un IDM sans *sus* décalage du segment ST, lorsqu'un patient présente une dépression de l'onde T ou une onde T négative.

Des évaluations sérielles de ces 3 marqueurs sont classiquement réalisées afin de distinguer un IDM en phase aiguë, d'un événement antérieur au cours de sa phase subaiguë ou chronique.

D'autres marqueurs associés aux SCA et de l'IMA sont en cours d'évaluation afin de permettre l'identification précoce d'un événement potentiel de SCA, le suivi de la physiopathologie, la mise en place d'une prise en charge personnalisée et l'évaluation des effets thérapeutiques d'un traitement. Ces marqueurs sont impliqués dans des mécanismes associés au SCA et l'IMA tels que, l'ischémie, l'inflammation (CRP, IL-6, TNF- $\alpha$  et autres), la coagulation ou encore la libération de biomarqueurs neuro-endocriniens (ANP et BNP) entre autres (Aldous, 2012 ; Anderson et al, 2011).

### I-2-3-4 L'échocardiographie au cours de la phase aiguë de l'IDM

Les techniques d'imagerie non invasives présentent plusieurs avantages pour des patients connus ou suspectés d'avoir un infarctus, notamment dans le diagnostic et la caractérisation de l'IDM.

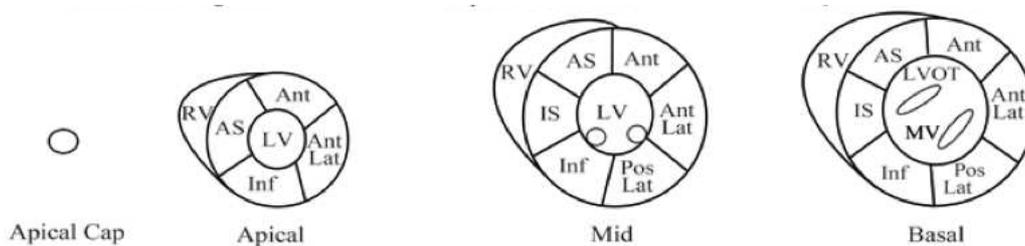
Les techniques les plus utilisées dans le cas des IDM aigu ou chronique sont l'échocardiographie, la radiographie cardiaque, la scintigraphie du myocarde par émission de photon et l'imagerie par résonnance magnétique. Ces techniques présentent des capacités analytiques proches, mais selon la méthode, vont accéder, avec plus ou moins de précision, à la viabilité, l'état de perfusion et la fonction du myocarde suite à un infarctus du myocarde (Thygesen et al., 2012).

En raison de l'utilisation de l'échocardiographie comme technique d'imagerie et d'exploration dans le cadre de mon projet de thèse, seule cette technique sera développée ici même si les autres méthodes présentent un rôle important dans l'évaluation de la fonction cardiaque suite à un IDM aigu.

La valeur potentielle de l'échocardiographie 2D comme outil de diagnostic de l'IDM aigu a été mise en évidence très tôt (Peels et al, 1990 ; Sabia et al., 1991). De nombreuses études reportent ses hautes sensibilités quantitative et qualitative (Esmailzadeh et al., 2012). A la vue des limitations imputables à l'ECG et au dosage des enzymes cardiaques, l'échocardiographie est devenue une technique d'imagerie incontournable dans la prise en charge des patients atteints de SCA. L'accession aux fonctions systolique et diastolique du ventricule gauche et à la perfusion du myocarde par les coronaires s'avèrent être des éléments déterminants pour le diagnostic et la stratification des patients souffrants de SCA et de dyspnée. L'échocardiographie est aussi utilisée afin d'éliminer d'autres étiologies de SCA comme la dissection aortique ou un épanchement péricardique.

### - L'évaluation de la fonction systolique du ventricule gauche et établissement du « Wall motion score index »

La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est communément utilisée lors de l'évaluation de la fonction cardiaque du VG. Cependant, sa valeur prédictive est remise en cause sur le plan pronostic. Une FEVG basse (<35%) peut être le résultat d'une fonction contractile réduite liée à l'extension des dommages myocardiques ou d'une ischémie persistante. D'un autre côté, elle peut résulter d'une dilatation du VG liée à une expansion de l'infarctus (Mollema et al, 2009).



**Figure 5: Représentation des différents plans et segments recommandés par l'AHA pour l'établissement du score de motilité du myocarde au cours de l'IDM aigu (d'après Esmailzadeh et al, 2013) (Ant: antérieur; AntLat: Antéro-Latéral; AS: Antéroseptal; Inf: Inférieure; IS: Inféro-Septal; LV: ventricule gauche; LVOT: chambre de chasse du ventricule gauche avec l'aorte; MV: Valve Mitrale; RV: ventricule droit).**

Dans la pratique clinique, l'échocardiographie 2D apporte une évaluation rapide de la fonction systolique. Plusieurs plans d'acquisition du myocarde, en parasternal avec une incidence dite « petit axe » (au niveau de l'apex, des muscles papillaires et de la base du cœur), sont réalisés. Chaque plan du VG est ensuite divisé en plusieurs segments et chacun de ses segments est annoté d'une valeur numérique représentant son degré de contraction. L'AHA a recommandé l'utilisation d'un modèle à 17 segments, suivant ainsi les territoires des différentes artères coronaires. La sévérité de la dysfonction contractile est notée visuellement pour chaque segment, soit 1 pour une contraction

normale ou une hyperkinésie, 2 pour hypokinésie, 3 pour akynésie, 4 pour une dyskinésie et 5 pour la présence d'un anévrisme. La note globale de motilité des segments est calculée et moyennée sur le nombre de segments afin de générer un index de motilité de la paroi myocardique, ou Wall Motion Score Index (WMSI) en anglais. Donc un WMSI de 1 est normal et tend à augmenter dans le cas d'anormalités de la contraction du VG (Esmaeilzadeh et al., 2012) (Figure 5).

Après un IDM, une atteinte pariétale peut être compensée par une hyperkinésie des segments se situant autour de la région présentant un défaut de contraction, ce qui peut rendre l'évaluation de la FEVG presque normale. C'est pourquoi, le WMSI semble mieux évaluer l'importance de l'atteinte segmentaire que la FEVG au cours de la phase aiguë de l'IDM (Moller et al., 2006). Néanmoins, cette évaluation qualitative de la motilité de la paroi est influencée directement par la qualité des images et l'orientation des plans qui vont être fortement dépendants de l'expérimentateur. C'est pourquoi, l'utilisation d'un produit de contraste au cours de l'échocardiographie permet d'identifier plus distinctement les tissus et notamment le bord de l'endocarde, permettant ainsi d'évaluer avec plus de facilité les anormalités de contraction réduisant ainsi les erreurs de mesures pour la FEVG (Mollema et al., 2009).

Afin d'améliorer ces quelques limites, l'échocardiographie 2D, avec l'utilisation du mode « Strain » a été récemment validée pour l'évaluation de la motilité myocardique en petit et grand axe. « Strain » signifie « déformation ». Dans ces conditions, ce mode d'analyse permet de suivre les déformations de la paroi myocardique au cours du cycle cardiaque et constitue un excellent paramètre de la motilité du myocarde, indépendamment de la rotation du cœur. L'observateur peut ainsi faire la différence entre des contractions normale et anormale (Esmaeilzadeh et al., 2012). Cette approche commence à être utilisée en recherche mais est plus ou moins limitée en terme de reproductibilité en fonction de l'échographe utilisé et l'espèce étudiée.

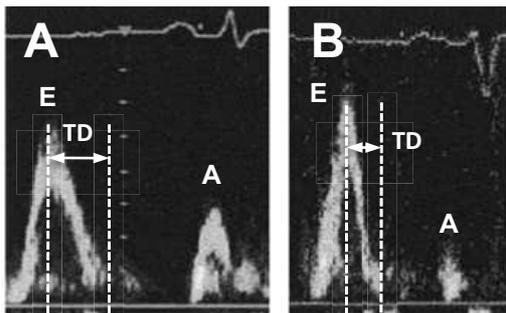
### *- L'évaluation de la fonction diastolique du ventricule gauche*

Avec la mise en place de l'échocardiographie Doppler, la mesure spectrale de la vitesse du sang passant des oreillettes vers les ventricules aux niveaux de la valve mitrale forme le flux mitral informant l'expérimentateur sur la fonction diastolique du cœur. 4 paramètres sont mesurés sur un flux mitral : 1) le temps de relaxation iso volumétrique donnant un information sur la capacité de relaxation du myocarde, 2) l'onde E représentant le remplissage passif du ventricule qui est rendue possible lorsque la pression dans la cavité du VG est inférieure à la pression dans l'oreillette gauche, 3) le temps de décélération de l'onde E, temps qui est intimement lié aux pressions de remplissages ventriculaires et 4) l'onde A qui représente la phase active de la diastole avec la contraction de l'oreillette permettant de finaliser le remplissage du ventricule.

Dans le cas d'une ischémie aiguë induite par l'exercice ou par un stress pharmacologique, la dysfonction diastolique survient avant la dysfonction systolique du VG. C'est pourquoi, il est souvent

rapporté que la dysfonction diastolique est plus sensible que la mesure de la dysfonction systolique lors du diagnostic des maladies coronariennes (Ohara et al., 2010).

Dans une méta analyse regroupant 3396 patients inclus en phase aiguë de l'IDM, 20% des patients présentaient un flux mitral dit « restrictif » et caractérisé soit par un rapport  $E/A \geq 2$ , soit par  $1 < E/A < 2$  avec une diminution drastique du temps de décélération de l'onde E (Figure 6) (MeRGE AMI Collaborators, 2008). Ce profil est en lien direct avec une augmentation des pressions intra ventriculaires gauches résultant de la présence de l'infarctus. Dans la suite de mes propos, il sera abordé la valeur pronostique de ce paramètre sur l'avenir des patients.



**Figure 6: Evaluation de la fonction diastolique. A et B,** illustrations d'un flux mitral normal et d'un flux restrictif (Modifiée d'après Mollema et al, 2009) (A: onde A du flux mitral; E: onde E du flux mitral; TD: temps de décélération de l'onde E).

Les difficultés pour diagnostiquer une dysfonction diastolique, *via* l'étude du flux mitral en échocardiographie Doppler, sont la dépendance de l'angle de mesure, l'interprétation de l'aspect diphasique durant le développement de la dysfonction et la dépendance des conditions de pré charge. En effet, ces dernières sont souvent variables au cours de la période de mise en place de l'IDM.

Une autre possibilité d'évaluer la fonction diastolique est d'avoir recours au mode « Strain » de l'échocardiographie 2D. Ce mode permet de refléter le niveau de relaxation au niveau de la totalité du myocarde sans être dépendant de l'angle de mesure (Ohara et al., 2010).

### - L'évaluation de la perfusion du myocarde

L'injection par intraveineuse d'un produit de contraste permet d'évaluer de manière non invasive la perfusion du myocarde par échocardiographie. Des études, chez le chien tout d'abord puis chez l'homme, ont montré que cette technique était en mesure de mettre en évidence un défaut de perfusion dans le cas de pathologies coronariennes suspectées ou déclarées (Mollema et al, 2009).

### - Evaluation de la localisation et de la taille de l'IDM

L'échocardiographie 2D est extrêmement précise pour localiser un infarctus. En règle générale, afin de distinguer le myocarde sain de l'infarctus, l'épaisseur de la paroi myocardique est préférée à l'évaluation de sa motilité. C'est pourquoi, les infarctus transmuraux sont plus facilement identifiables que les infarctus sous endocardiques représentant au maximum 20% de l'épaisseur de la paroi. Les cas entravant la localisation d'un infarctus en phase aiguë vont être l'atteinte de plusieurs coronaires, la présence d'un infarctus antérieur, ou l'existence d'un réseau de collatérales dans le territoire impliqué. Comme il y a une forte relation entre la taille de l'infarctus et la dysfonction

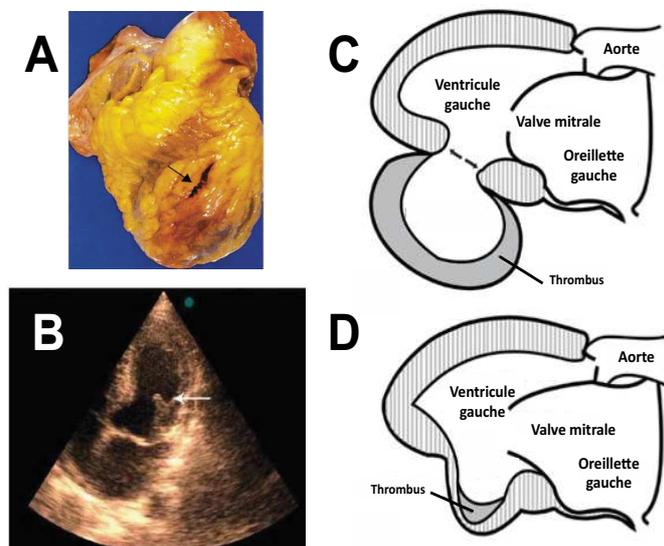
contractile, l'absence d'anormalités de motilité ou d'amincissement des parois permet d'exclure la présence d'un infarctus massif.

Le territoire de la dysfonction myocardique peut être un reflet de l'étendue de l'infarctus. Néanmoins, la circonférence de la dysfonction peut être plus importante que l'IDM en lui-même. Ceci est le cas lors de l'atteinte de plusieurs coronaires ou lors de la présence d'un IDM plus ancien. Généralement, l'étude de la motilité du myocarde, en comparaison de l'épaisseur de paroi, tend à surestimer la taille de l'infarctus. Néanmoins, les deux approches tendent à apporter une estimation de la taille de l'infarctus (Esmailzadeh et al., 2012).

### - Identification des complications mécaniques au cours de la phase aiguë de l'IDM

En dehors de ses rôles lors de la mise en évidence d'un IDM et l'évaluation de l'atteinte de ce dernier sur la fonction cardiaque, l'échocardiographie se présente comme un outil important pour le diagnostic et l'évaluation des complications faisant suite à un IDM. Cette technique présente en effet l'avantage de pouvoir être réalisée de manière répétée au lit du patient (Esmailzadeh et al., 2012).

Les complications majeures de l'IDM aigu sont les ruptures de la paroi libre du myocarde, de la paroi septale ou d'un muscle papillaire à l'origine d'une régurgitation mitrale sévère (Figure 7). Toutes ses complications vont pouvoir conduire à un choc cardiogénique.



**Figure 7: Illustrations de différentes complications de l'IDM aigu.** A, Photo d'un cœur présentant une rupture de la paroi antérieure (flèche) (d'après Abitol, 2005). B, Image d'une incidence 4 cavités par échocardiographie mettant en évidence la rupture d'un muscle papillaire (flèche) responsable d'une régurgitation mitrale, C et D, représentations schématisées d'un pseudo anévrysme et d'un anévrysme vrai respectivement. (Les figures B, C et D ont été modifiées à partir de Esmailzadeh et al, 2013).

La **rupture de la paroi libre du myocarde** est la complication la plus catastrophique de l'infarctus du myocarde avec un sus décalage du segment ST. Elle se définit comme un déchirement ou une rupture du tissu récemment infarcté. Cette rupture de la paroi libre du VG a lieu dans 1 à 4,5% des IDM aigus et représente 10 à 15% des causes de mortalité précoce suite à un IDM aigu. Elle peut apparaître à 3 intervalles de temps différents faisant intervenir 3 mécanismes pathologiques différents : 1) dans les premières 24 heures sur la totalité de l'épaisseur de paroi avec une incidence qui augmente

avec la prise d'agents fibrinolytiques, 2) entre le premier et le 3<sup>ème</sup> jour suite à l'IDM suite à une érosion au niveau du site de l'infarctus, 3) et au delà de 3 jours, cette dernière est souvent située au niveau de la zone entre l'infarctus et le myocarde viable, due à une augmentation de la tension secondaire à la dysfonction systolique du VG. La rupture se traduit souvent par un choc intense rapidement suivi d'une dissociation électromécanique liée à une tamponnade suite à l'infiltration de sang dans le péricarde (Esmailzadeh et al., 2012). Lorsque la rupture n'est pas complète, un pseudo anévrysme se forme correspondant à une région où un thrombus associé avec le péricarde recouvre la région lésée. Dans certains cas, un pseudo anévrysme peut grandir et atteindre la taille de la cavité du ventricule, voir communiquer avec ce dernier par le petit orifice ayant permis sa formation. Il est possible de le diagnostiquer par échocardiographie notamment *via* la présence modérée ou importante d'une effusion péricardique ou par la détection de signes de tamponnades.

La **rupture de la paroi septale** est une cause qui a fortement diminuée depuis l'introduction des traitements de fibrinolyse. Sa localisation va dépendre de celle de l'infarctus : plutôt apicale dans le cas d'un IDM antérieur, plutôt basale pour les IDM inférieurs les rendant plus délétères. Dans des cas extrêmes, elle peut être associée à une rupture de la paroi libre. On parle alors de ruptures ventriculaires doubles (Esmailzadeh et al, 2012 ; Sia et al, 2008).

La **régurgitation mitrale** suite à une rupture d'un muscle papillaire représente 5% des causes de mortalité de l'IDM aigu. Une rupture partielle ou totale d'un muscle papillaire est rare mais elle est une complication fatale d'un IDM transmural. Une rupture partielle est plus fréquente et peut ne pas être immédiatement létale pour le patient. A l'opposé de la rupture septale, une régurgitation mitrale se traduit dans la moitié des cas par la présence d'un IDM de petite taille. Elle est identifiable *via* une acquisition en Doppler pulsé couleur permettant de la distinguer de la rupture de la paroi septale (Esmailzadeh et al, 2012 ; Sia et al, 2008)

Au delà de ces 3 causes majeures, d'autres situations pathologiques peuvent être identifiables par échocardiographie :

- Une effusion péricardique peut être identifiée dans 30 à 40% des cas d'IDM-ST+. Cette effusion peut atteindre son maximum à 3 jours et peut perdurer jusqu'à 6 mois dans certains cas. Généralement, une inflammation de l'épicarde va être à l'origine d'une diffusion de liquide responsable de l'effusion péricardique.

- L'expansion de l'infarctus est un amincissement de la paroi ventriculaire provoquant une dilation qui va former un vrai anévrysme apparaissant dans les 24 à 72 heures suite à l'IDM. Cette expansion n'est jamais observée dans le cas d'infarctus non transmural. Elle est identifiable par échocardiographie avec la présence d'une protubérance du myocarde avec une paroi fine.

- L'identification de la présence d'un thrombus dans une zone où il va y avoir une stase et souvent identifiée au niveau de l'apex ou des anévrysmes.

### ***I-2-4 La stratification du risque de mortalité à court terme suite à un infarctus du myocarde ST+***

Au cours de la prise en charge avant et après l'entrée de l'hôpital, les arythmies ventriculaires, la fibrillation auriculaire, les pauses sinusales ou les blocs de conduction associés à l'IDM sont des causes imprévisibles nécessitant une correction immédiate. Ces dernières sont responsables de nombreux cas de mort subite cardiaque (van der Werf et al, 2008).

Au cours de la phase aiguë d'un IDM-ST+, la présence d'une insuffisance cardiaque est associée à un mauvais pronostic à court et long terme. Celle-ci est souvent liée à l'atteinte du myocarde mais peut aussi être la conséquence d'une arythmie ou d'une complication mécanique comme une régurgitation mitrale ou un défaut de la paroi septale. Le degré d'insuffisance cardiaque peut être catégorisé, *via* la classification internationale de Killip, en 4 stades allant de l'absence de râles crépitants à l'auscultation pulmonaire jusqu'au choc cardiogénique (van der Werf et al, 2008).

Pour la stratification du risque de mortalité à court terme, différents scores cliniques, comme le score TIMI (Thrombolysis In Myocardial Infarction, Morrow et al., 2000) ou GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events, Granger et al., 2003), sont basés sur une multitude de données recueillies au cours du diagnostic, comme le délai de prise en charge, l'âge, les antécédents personnels (diabète, hypertension, infarctus antérieur), l'ECG (fréquence cardiaque, aspect du segment ST), les dosages de biomarqueurs, l'étendue et la localisation de la nécrose, la valeur de la fraction d'éjection du ventricule gauche, la pression artérielle à l'admission et le stade de Killip. Les objectifs de ces scores sont de déterminer plus précisément le pronostic des patients afin de mettre en place une prise en charge adaptée et optimisée.

### ***I-2-5 La prise en charge de l'infarctus du myocarde avec un sus décalage du segment ST.***

L'ACC et l'AHA mettent à jour régulièrement leurs documents de référence pour la prise en charge des patients présentant les symptômes d'un syndrome coronarien aigu. Elles font clairement la distinction entre la prise en charge de l'angine instable, de l'IDM-ST- et celle de l'IDM-ST+. Dans la suite de cette partie, seule celle de l'IDM-ST+ sera décrite pour illustrer les possibilités de prise en charge et de traitements mis à la disposition des services de secours.

Les stratégies de prise en charge thérapeutique de l'IDM-ST+ peuvent être divisées en 4 catégories : une prise en charge prophylactique initiale du patient, l'approche de reperfusion du myocarde en ischémie, une thérapie antithrombotique additive et une prise en charge prophylactique secondaire initiée dans les unités de soins.

### ***I-2-5-1 La prise en charge prophylactique initiale de l'IDM-ST+***

La prise en charge prophylactique en phase aiguë de l'IDM va avoir pour but d'éviter la dégradation de la situation du patient et la survenue de complications létales. Pour cela, différentes stratégies sont réalisées :

- L'administration d'oxygène par voie nasale devrait être classiquement prescrite au cours des 24 à 72 heures et parfois pendant plusieurs jours après l'IDM. En effet la présence d'une légère hypoxémie n'est pas rare, même en absence de congestion pulmonaire apparente. De plus, un certain nombre de patients présente une dyspnée en lien avec les changements de compliance du VG conduisant secondairement à un œdème pulmonaire (Yang et al., 2006).

- La gestion de la douleur est prise en compte par un suivi analgésique *via* l'administration de morphine par bolus. La morphine doit être utilisée avec précaution chez des patients avec des contraintes hémodynamiques instables car elle présente des effets dépressifs sur la pré-charge cardiaque. Elle peut aussi être la cause de dépression pulmonaire, c'est pourquoi l'analgésie n'est pas constamment maintenue chez ce type de patient.

- Un traitement anti-thrombotique doit être prescrit le plus tôt possible avec l'administration de différents agents comme l'aspirine, le clopidogrel ou des agents anti-thrombine en fonction de l'historique des patients et notamment les cas d'allergie. Cette approche est à l'origine d'une réduction de la mortalité suite à un IDM.

- L'utilisation d'agents anti-ischémiques va permettre la réduction de la demande ou l'augmentation de l'apport en oxygène au niveau du myocarde (Hamm et al., 2011). Ces agents en vont être principalement les  $\beta$ -bloquants, les nitrates et les antagonistes des canaux calciques (Yang et al, 2006 ; Hamm et al, 2011 ; van der Werf et al, 2008).

### ***I-2-5-2 La restauration de la circulation coronaire et la reperfusion du myocarde***

Pour des patients présentant les signes cliniques d'un syndrome coronarien aigu avec un sus décalage permanent du segment ST et/ou un bloc de branche gauche, une reperfusion mécanique ou pharmacologique doit être rapidement envisagée. En fonction du temps de la prise en charge et des moyens disponibles, différentes stratégies de reperfusion sont à réaliser chez les patients.

#### ***- Les interventions coronariennes percutanées (ICP)***

Les ICPs au cours des premières heures de l'IDM-ST+ peuvent être divisées en 3 groupes :

- l'*ICP primaire*, une angioplastie ou l'implantation d'un stent avec ou sans une fibrinolyse concomitante, représente l'option thérapeutique la plus favorable lorsqu'elle est réalisée dans une structure et une équipe qualifiée. Elle est efficace pour le maintien de l'ouverture de la lumière du vaisseau et évite la plupart des risques de saignement liés au traitement fibrinolytique. 95% des patients traités avec une ICP primaire présentent une reperfusion complète (Yang et al, 2006). Le délai

de réalisation de l'ICP primaire est variable en fonction des études, de l'âge des patients, de la durée des symptômes et de la localisation de l'IDM (van der Werf et al, 2008).

- *l'ICP facilitée* consiste au recours à un traitement pharmacologique de reperfusion du myocarde, notamment des agents anticoagulants ou fibrinolytiques, avant la programmation d'une ICP primaire. Cela est déterminant dans le cas d'un délai conséquent nécessaire aux équipes de premiers secours pour adresser leur patient à un hôpital avec un service d'intervention en cardiologie (van der Werf et al, 2008).

- *l'ICP de sauvetage* a lieu lorsque le traitement par thrombolyse a échoué, c'est à dire lorsqu'une réduction du *ST* décalage du segment ST inférieur à 50% a été évaluée dans les 60 à 90 minutes suite à l'initiation de la fibrinolyse (van der Werf et al, 2008).

### ***- Le traitement par thrombolyse***

La thérapie par thrombolyse pour les IDM-ST+ a montré qu'elle était efficace dans de nombreuses études cliniques impliquant jusqu'à 100000 patients. Elle est facilement disponible, administrable et peu coûteuse. De plus, seulement et approximativement 50% des patients IDM-ST+ sont éligibles pour cette thérapie : 50 à 60% des patients traités avec des agents thrombolytiques ont une reperfusion complète, 10 à 20% présentent une nouvelle occlusion de l'artère coronaire impliquée et 1% présente des cas d'AVC due à une hémorragie intracraniale. Le traitement est plus efficace quand il est administré dans les 3 heures suite à l'apparition des symptômes d'angine de poitrine (Yang et al, 2006).

### ***- Le pontage coronarien***

Le nombre de patients éligibles pour un pontage coronarien dans la phase aiguë de l'IDM est limité. Ce dernier va être préconisé lorsque les techniques d'ICP échouent, que l'ICP n'est pas réalisable ou lors de la présence de symptômes réfractaires après l'ICP, en cas de choc cardiogénique ou en présence d'une complication de l'IDM comme la rupture ou la régurgitation mitrale (van der Werf et al, 2008).

### ***I-2-5-3 Une thérapie adjuvante contre l'agrégation plaquettaire***

Des études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, comme le clopidogrel ou les inhibiteurs des glycoprotéines IIb/IIIa, en parallèle de la reperfusion présentent des effets bénéfiques en fonction de la stratégie de reperfusion employée.

Le clopidogrel, un agent inhibant l'activation des plaquettes, est effectivement associé à une réduction de la mortalité, de l'induction d'un nouvel infarctus ou de l'occlusion de l'artère suite à une angiographie. Il n'est pas associé à une augmentation du taux de saignement et est principalement utilisé lors du traitement par thrombolyse. Il n'a pas été évalué dans le cas d'une ICP primaire (Yang et al., 2006).

Néanmoins, les inhibiteurs des glycoprotéines IIb/IIIa, bloquant la phase finale de l'agrégation plaquettaire, ne sont pas recommandés en complément d'une thrombolyse. En revanche, son utilisation en phase aiguë est recommandée par l'AHA et l'ACC lors du traitement d'IDM-ST+ (Yang et al., 2006).

### *I-2-5-4 La prise en charge prophylactique secondaire des patients IDM-ST+*

La maladie coronarienne est une pathologie chronique. Les patients ayant eu un IDM-ST+ sont une population à plus haut risque d'apparition d'un nouvel événement cardiaque ou de mort prématurée. 8 à 10% des patients IDM-ST+ ont une récurrence d'IDM dans la première année suite à leur sortie de l'hôpital et la mortalité reste supérieure à celle de la population générale (van der Werf et al, 2008).

La mise en place d'un certain nombre d'interventions, basées sur des évidences liées aux facteurs de risque, peut améliorer le pronostic vital. Même si un suivi sur le long terme des patients IDM-ST+ sera de la responsabilité du médecin généraliste, ces interventions ont plus de chance d'être intégrées par les patients lorsqu'elles sont initiées lors de la période d'hospitalisation suite à l'IDM. En parallèle des traitements, des changements dans leur style de vie sont expliqués et proposés aux patients avant leur sortie. En effet, les modes de vie sont difficilement modifiables et leur changement nécessite une longue période accompagnée d'un suivi par le médecin traitant (van der Werf et al, 2008). Toutes les interventions nécessaires et préconisées sont les suivantes :

- Un arrêt de la consommation de tabac ;
- La mise en place d'un régime alimentaire varié et équilibré afin que les patients puissent perdre ou apprendre à maintenir leur poids ;
- La pratique d'une activité physique régulière ;
- La régulation du diabète et de la consommation lipidique ;
- Le contrôle la pression artérielle ;
- La mise en place de traitement pour réguler les conséquences, comme les arythmies, l'insuffisance cardiaque et la dysfonction ventriculaire induite par l'IDM. Cela est notamment possible avec la prescription de  $\beta$ -bloquants, des anti arythmiques comme l'amiodarone entre autres, des nitrates, des bloqueurs des canaux calciques, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, d'inhibiteurs des récepteurs à l'angiotensine, d'antagonistes de l'aldostérone ou une thérapie de resynchronisation dans le cas de patients présentant de signe d'insuffisance cardiaque notamment une chute de la FEVG.
- L'implantation prophylactique d'un défibrillateur cardiaque pour réduire le risque de mort subite et mortalité totale.

### **I-3 Les modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde**

Afin d'augmenter notre compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'infarctus du myocarde (IDM) et afin de prévenir ses conséquences *via* la mise en place de nouvelles approches thérapeutiques ou prises en charge, il a été indispensable de disposer de modèles animaux mimant le développement de la pathologie avec ces caractéristiques structurales et fonctionnelles. En ce sens, un des éléments le plus important d'un modèle animal est d'obtenir ces caractéristiques à partir de la même étiologie observée chez l'homme. Comme développé auparavant, l'athérosclérose, avec le rétrécissement chronique de la lumière *via* une plaque d'athérome ou l'occlusion totale de l'artère coronaire *via* un thrombus, est la cause majeure des pathologies coronariennes dont l'IDM. C'est pourquoi, de nombreuses stratégies et méthodes ont été développées sur différentes espèces animales de laboratoire afin d'induire un rétrécissement ou une occlusion d'une artère coronaire.

Les modèles expérimentaux ou génétiques d'athérosclérose se sont montrés, par une variabilité de mise en place et un manque de prédiction sur la survenue et la localisation de l'infarctus, des modèles inadaptés pour répondre aux projets scientifiques visant à caractériser l'infarctus du myocarde ou évaluer l'effet de traitement.

C'est pourquoi, de nombreuses stratégies et méthodes ont été développées sur différentes espèces animales de laboratoire pour induire un rétrécissement ou une occlusion d'une artère coronaire. Ces modèles chirurgicaux d'induction d'une ischémie, n'étant pas en respect avec l'étiologie humaine, présentent les avantages de contrôler l'induction, le temps, la localisation et donc la sévérité de l'ischémie permettant d'obtenir des résultats plus reproductibles. Donc, ils se sont avérés être en adéquation et indispensables pour répondre aux exigences d'un projet en recherche cardiovasculaire (Klocke et al, 2007).

Dans ces conditions, la suite de cette partie abordera seulement les modèles chirurgicaux. En fonction de la durée et du degré de l'occlusion, ces modèles ont été répartis en 3 groupes : les modèles d'infarctus du myocarde permanent, les modèles d'ischémie/reperfusion (I/R) et les modèles d'ischémie chronique.

#### *I-3-1 Les modèles d'infarctus du myocarde*

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées afin d'induire un IDM ou une ischémie consistant à l'occlusion d'une artère coronaire. Ici, seules 3 méthodes seront abordées, les plus utilisées.

1) **L'implantation de dispositifs occlusifs**, réalisée chez les gros animaux comme le porc, permet de réaliser une occlusion complète ou partielle selon le choix de l'expérimentateur au niveau de l'artère coronaire choisie ou de l'une de ses branches. Le degré d'occlusion peut être contrôlé au

cours de la procédure en mesurant à distance le flux sanguin à l'aide d'une sonde ultrasonique (Klocke et al, 2007).

2) **Les embolisations intra coronariennes**, effectuées aussi chez les gros animaux comme le chien, sont basées sur l'administration percutanée de microsphères, de billes d'agarose ou de polystyrènes, ou de thrombine et de sang autogène enrichi en fibrinogène. Ce modèle présente des similitudes avec la situation clinique humaine du syndrome coronarien aigu notamment avec les embolies liées aux débris de la plaque d'athérome ou du thrombus. Une des limites de cette technique réside dans le manque de contrôle sur la location et la hauteur d'occlusion dans le réseau coronarien (Klocke et al, 2007).

3) **L'occlusion permanente de l'artère coronaire antérieure gauche descendante** est une méthode classiquement utilisée en recherche pour induire un infarctus du myocarde. Elle est pratiquée sur différentes espèces, comme le chien, le porc, le rat et la souris. Les mortalités de la procédure d'induction de l'IDM sont, respectivement pour chacune des espèces citées auparavant, de 50, 20, 16 à 36, et 37 à 50%. Ces mortalités sont majoritairement dues aux tachycardies ou fibrillations ventriculaires au cours de la phase aiguë de l'infarctus. Les variabilités observées chez le rat et la souris, sont liées aux différences de souches utilisées en fonction des études, choix qui ont un impact certain sur les incidences d'arythmies (Klocke et al, 2007).

### ***I-3-2 Le modèle d'ischémie reperfusion (I/R)***

Comme abordés auparavant, la thrombolyse ou l'angiographie percutanée de l'artère coronaires sont deux traitements utilisés au cours de la phase aiguë de l'IDM pour en réduire les conséquences à plus ou moins long terme. Cependant les lésions et la dysfonction cardiaque induites par la reperfusion du tissu sont des problèmes cruciaux à résoudre.

Le modèle d'ischémie reperfusion a été mis en place pour mimer la prise en charge clinique humaine, comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'IDM et mettre en place des stratégies thérapeutiques optimales. Le modèle est réalisable soit sur l'animal, soit *ex vivo* au niveau de cœurs isolés et perfusés. De nombreuses études ont montrés que la durée d'occlusion avait un rôle majeur sur les conséquences physiopathologiques. Notamment plus la durée est importante plus le risque d'infarctus est élevé et s'approche des conséquences d'une ligature permanente (Klocke et al, 2007).

Le modèle d'I/R régional sur un animal anesthésié reste le plus standard. Comme les modèles d'infarctus du myocarde par ligature, l'artère coronaire est ligaturée mais un tube plastique est placé entre le vaisseau et le nœud afin de permettre un retrait plus facile et sécurisant de l'occlusion. L'ischémie peut être mise en évidence par un blanchissement de la zone et des altérations de l'ECG. La reperfusion est, quant à elle, vérifiée par une hyper anémie au niveau de la zone blanchie. En comparaison du modèle de ligature permanente, le modèle d'infarctus reperfusé se caractérise par une infiltration en cellules inflammatoires plus élevée, un remodelage fibrotique atténué et une augmentation de la néo vascularisation de la zone infarctée.

La réalisation du modèle d'I/R en *ex vivo*, par montage du cœur sur un appareillage de Langendorff, est généralement utilisée pour analyser les conséquences physiopathologiques et électrophysiologiques observées *in vivo* (Klocke et al, 2007).

### ***I-3-3 Les modèles d'ischémie chronique***

Chez le rat et la souris, un modèle proche de celui de la ligature coronaire a été établi consistant à placer un tube avec un diamètre choisi en fonction de l'espèce au niveau de l'artère coronaire. Le tube et l'artère sont ligaturés ensemble avant que le premier soit retiré pour obtenir un rétrécissement de la lumière de l'artère de 42% en moyenne. Des approches similaires de réduction de la lumière de l'artère sont possibles pour les gros animaux avec les dispositifs occlusifs présentés précédemment pour l'induction d'un infarctus du myocarde (Klocke et al, 2007).

## **I-4 Physiopathologie du remodelage ventriculaire gauche et complications associées à l'infarctus du myocarde**

Le terme de remodelage ventriculaire gauche est employé pour décrire tous les changements structuraux et fonctionnels du ventricule en réponse à des altérations chroniques dans des conditions physiopathologiques et plus particulièrement l'infarctus (Opie et al., 2006)

Au cours de la physiopathologie de l'infarctus, de manière arbitraire, on va pouvoir distinguer le remodelage de la zone infarctée avec son expansion et sa maturation en une cicatrice myocardique et un remodelage progressif impliquant les effets de l'infarctus aux niveaux structural et fonctionnel sur la totalité du ventricule gauche (Sutton et al., 2000).

Le modèle de ligature permanente de l'artère coronaire gauche descendante étant le seul modèle opérationnel à l'institut du thorax au cours de ma thèse, les lésions associées à la reperfusion et les différences de sévérité du remodelage du modèle d'I/R ne seront pas développées pour présenter que seulement les lésions et le remodelage d'une ischémie maintenue dans le temps.

### ***I-4-1 Le remodelage de la zone de l'infarctus***

Le cœur est un organe dont les capacités régénératives suite à des dommages sont négligeables. C'est pourquoi, la zone de l'infarctus du myocarde est le résultat du remplacement des cardiomyocytes morts suite à l'ischémie par une cicatrice principalement formée de collagène. Au cours de la mise en place de l'IDM, les événements cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus de réparation peuvent être séparés en 3 phases qui se chevauchent : la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de maturation de la cicatrice myocardique (Dobaczewski et al., 2010).

Les mécanismes déclenchés, au cours de ces 3 phases pour maintenir l'intégrité du cœur, vont avoir des conséquences sur : 1) le remodelage de la zone de cicatrisation elle-même, avec dans

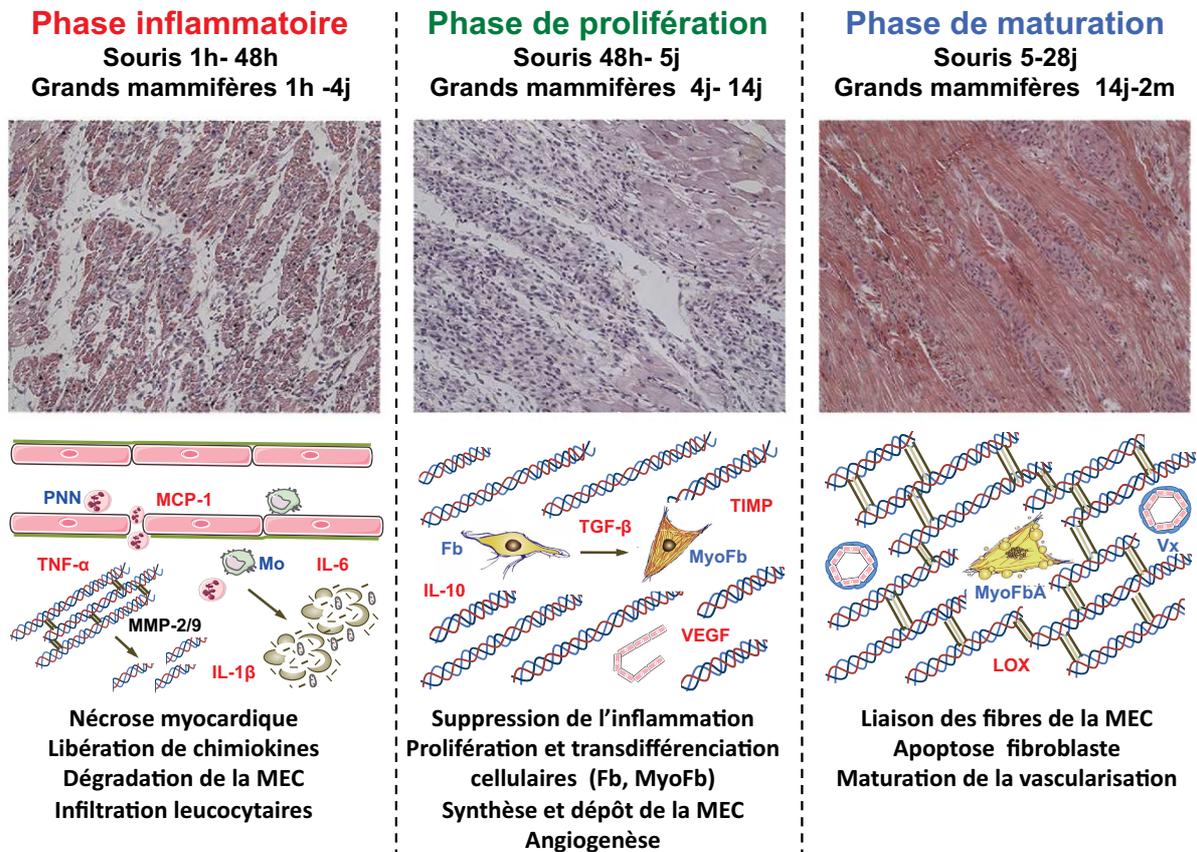
certains cas extrêmes, la survenue d'une rupture cardiaque conduisant au décès de l'individu, 2) le remodelage des zones viables du myocarde et 3) la fonction cardiaque globale.

### ***I-4-1-1 La phase inflammatoire de l'IDM***

Un apport constant d'oxygène est indispensable pour la synthèse d'énergie maintenant les processus cellulaires nécessaires à la viabilité et la fonction du cœur. En conséquence, l'ischémie va provoquer la cessation du métabolisme aérobie, causant une déplétion en ATP et une accumulation de produits issus du métabolisme anaérobie comme l'acide lactique, dans les secondes qui suivent l'occlusion de l'artère coronaire. Avec le maintien d'une ischémie sévère, les dommages irréversibles induits vont conduire à la mort des cellules. Les principaux mécanismes de mort de cardiomyocytes vont être la nécrose et l'apoptose dont les contributions dans ce processus ne sont pas clairement établies avec deux principales écoles de pensée (Frangogiannis et al., 2008 ; Abbate et al., 2006). La mort des cellules du myocarde va progresser de l'endocarde vers l'épicarde (Reimer et al., 1977). La quantité de fibres myocardiques viables va progressivement diminuée. Dans les 14 heures faisant suite à l'induction de l'ischémie, seuls quelques groupes de fibres myocardiques, dispersés et ayant résistés aux dommages de l'ischémie, vont perdurer. Dans l'endocarde, seules les fibres du réseau de Purkinje vont persister majoritairement grâce à une résistance plus élevée à l'ischémie et par l'apport passif modéré de gaz et de nutriments depuis la cavité ventriculaire (Janse et al., 1989).

Les composants du contenu intracellulaire libérés par les cellules nécrosées vont être reconnus comme autant de signaux de danger par l'organisme et être à l'origine d'une réponse inflammatoire forte et transitoire de l'immunité innée, notamment *via* l'activation de la voie des récepteurs TLR (Toll Like Receptor), la voie du complément et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces voies vont induire l'activation de la voie de signalisation du facteur NFκB dans les cellules résidentes du cœur provoquant la synthèse de chimiokines (MCP-1 par exemple) et de cytokines (TNF-α, IL-6 et l'IL-1β en autres). Celles-ci vont conduire à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la présentation de molécules d'adhésion sur l'endothélium et la dégradation de la matrice extracellulaire par l'expression et la sécrétion de métalloprotéinases, comme la MMP-2 ou la MMP-9, afin de permettre le recrutement de leucocytes, comme les neutrophiles et les macrophages, sur le site de l'infarctus. Les leucocytes, activés par les cytokines libérées, vont permettre d'éliminer les débris cellulaires et les fragments de matrice. Les macrophages, avec un aspect de granulation caractéristique, vont libérer des cytokines et des facteurs de croissance. Lorsque la zone de l'infarctus est nettoyée des débris cellulaires, les neutrophiles deviennent apoptotiques et sont phagocytés par les macrophages, pour être remplacés par le recrutement de monocytes réparateurs. Ces lymphocytes et macrophages vont produire des médiateurs, comme l'IL-10 ou le TGF-β, supprimant les signaux pro-inflammatoires. Au cours de cette phase et de la suivante, la zone, initialement et exclusivement occupée par des cardiomyocytes, est appelée zone de granulation (Frangogiannis et al., 2008 ; Chen et

al., 2013). Cette phase débute, dans tous les cas, une heure suite à l'occlusion et perdura jusqu' à 48 heures chez la souris et 4 jours chez les grands mammifères (Dobaczewski et al., 2010) (Figure 8).



**Figure 8: Les phases du processus de cicatrisation du myocarde suite à un infarctus.** Chaque partie comprend une coupe histologique caractéristique et les mécanismes cellulaires et moléculaires associés pour chaque phase. (Figure en partie inspirée de Dobaczewski et al. 2010)(IL: Interleukine; LOX: Lysyl-oxydase; MEC: Matrice extracellulaire; MCP-1: Monocyte Chemotractant Protein 1; MMP Métalloprotéinase de la matrice; Mo: Monocytes; MyoFb :Myofibroblastes; MyoFbA: Myofibroblastes Apoptotiques; PNN: Polynucléaires Neutrophiles.; TIMP: inhibiteurs tissulaires des MMPs; TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ; Vx: Vaisseaux).

#### I-4-1-2 La phase de prolifération de l'IDM

La suppression de la réaction inflammatoire par les macrophages va aussi permettre l'infiltration secondaire de fibroblastes et de cellules endothéliales indiquant la transition vers la phase dite de prolifération. Durant cette phase, le microenvironnement de l'infarctus riche en facteurs de croissance fibrogéniques, comme l'angiotensine II ou le TGF- $\beta$  entre autres, ainsi que le stress mécanique augmenté au niveau de la zone infarctée vont permettre la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes et ainsi augmenter les activités prolifératives et les capacités de synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) de ces derniers.

Cette transdifférenciation est une caractéristique primordiale de la phase de prolifération. En effet, les myofibroblastes, exprimant spécifiquement l' $\alpha$ -SMA (Smooth Muscle Actin) et d'autres

protéines myocontractiles, vont permettre la contraction « relative » de la zone infarctée et le maintien de l'intégrité structurale du cœur par 1) leurs propriétés contractiles, 2) la synthèse et la régulation de MMPs et de leurs régulateurs les TIMPs, et 3) la synthèse d'éléments de la MEC, les collagènes de type I et III en majorité. En parallèle de la prolifération et de l'activation de fibroblastes, l'ischémie va aussi induire la mise en place d'une angiogenèse *via* l'induction de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) permettant d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires pour la cicatrisation de la zone infarctée (Frangogiannis et al., 2008 ; Chen et al., 2013). La phase de prolifération a lieu de 48 heures à 5 jours chez la souris et de 4 à 14 jours chez les grands mammifères (Dobaczewski et al., 2010) (Figure 8).

### *I-4-1-3 La phase de maturation de l'IDM*

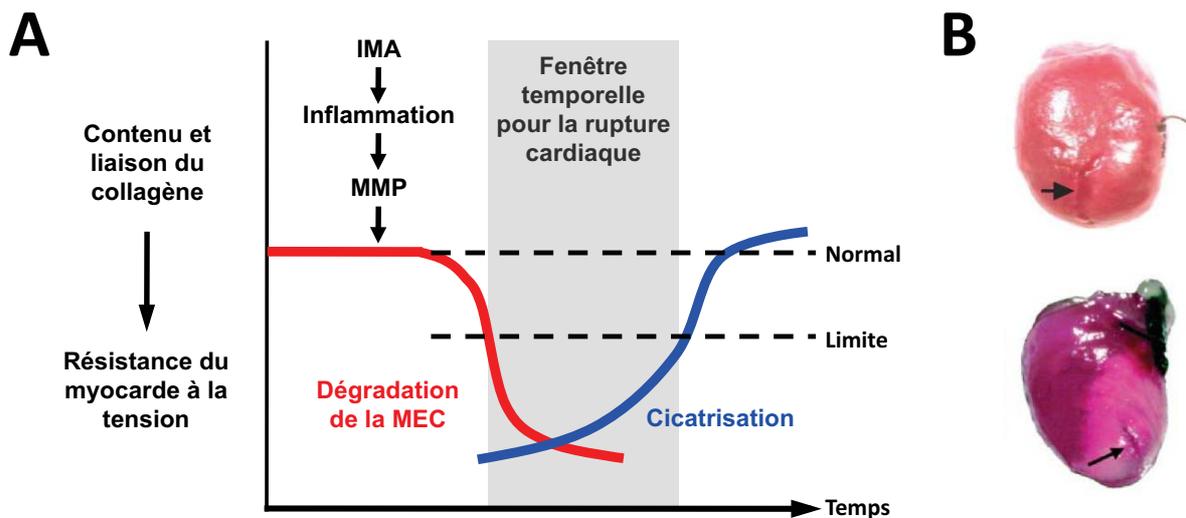
Durant la phase de maturation, la zone dite de granulation est entièrement remplacée par une cicatrice riche en collagène synthétisé par les myofibroblastes associée à une maturation des vaisseaux initiée au cours de la phase proliférative. La maturation de la cicatrice myocardique est rendue possible par l'expression d'enzymes, comme la lysyl-oxydase (LOX), permettant le croisement des chaînes de collagène afin de former des fibres matures et résistantes. La formation d'une cicatrice mature, comprenant des fibres de collagène denses et organisées, augmente la rigidité de la zone se traduisant par une réduction de la compliance de la paroi ventriculaire qui va contribuer à la dysfonction diastolique associée à l'IDM. En parallèle, les leucocytes, les cellules vasculaires et les fibroblastes vont progressivement être éliminés au cours de la maturation, par des processus de type apoptotiques, laissant place à une cicatrice myocardique avec une activité métabolique très réduite (Frangogiannis et al., 2008 ; Chen et al., 2013). La phase de maturation va avoir lieu de 5 à 28 jours chez la souris, et de 14 jours à 2 mois chez les grands mammifères (Dobaczewski et al., 2010) (Figure 8).

### *I-4-1-4 Les conséquences associées au remodelage de la cicatrice myocardique*

Principalement dans le cas d'une atteinte transmurale et étendue, les contraintes hémodynamiques pariétales engendrées par l'IDM avec une dégradation de la matrice vont conduire à un amincissement et une dilatation de la zone infarctée, *via* des mouvements de glissements des cardiomyocytes. On parle alors d'expansion de l'infarctus. Elle va pouvoir avoir lieu pendant les premières semaines chez l'homme, le temps de la mise en place et de l'organisation de la cicatrice myocardique (Gajarsa et al., 2011 ; Gao et al., 2012). La présence d'une expansion de la zone avec les perturbations hémodynamiques associées va favoriser la formation de thrombus au niveau de la zone infarctée et être à l'origine d'un anévrisme ou d'une rupture de la paroi ventriculaire. En effet, la rupture de la paroi ventriculaire est une complication catastrophique au cours de la phase aiguë de l'IDM. Malgré une réduction du nombre de cas avec l'amélioration de la prise en charge des patients,

l'incidence de rupture cardiaque serait de 1 à 3% des patients présentant un IDM, mais celle-ci serait sous évaluée. Cette rupture va pouvoir être initiée soit par la présence d'une fente ou d'une érosion de l'endocarde la paroi ventriculaire associée à la présence d'un thrombus, soit par le résultat de l'amincissement progressif et de l'expansion de la zone nécrosée. La localisation la plus fréquente pour ce type de complication est au niveau de la paroi libre du ventricule gauche et plus particulièrement au niveau de la zone bordant l'infarctus (Gao et al., 2012).

Des études ont pu montrer que l'infiltration de leukocytes et la présence d'une hémorragie étaient des signes histopathologies caractéristiques. De plus, la présence d'une inflammation plus sévère, qui se traduit par la présence de cellules inflammatoires et l'expression de la MMP de type 9, est retrouvée dans les cœurs présentant une rupture cardiaque. D'autres études décrivent des défauts de la mise en place du processus de cicatrisation, dépendants ou non de l'inflammation, comme une cause de rupture cardiaque. Donc il semble à ce jour que l'inflammation, la dégradation de la matrice de collagène qui en découle et des défauts de maturation de la cicatrice myocardique soient les mécanismes fondamentaux dans la physiopathologie de la rupture de la paroi ventriculaire (Gao et al., 2012) (Figure 9).



**Figure 9: La rupture de la paroi myocardique.** A, Représentation schématique illustrant la relation temporelle entre l'inflammation, la dégradation de la matrice et le processus de cicatrisation dans l'apparition d'une rupture cardiaque potentielle (modifiée d'après Gao et al., 2012). B, Illustrations de rupture cardiaques au niveau de la zone bordante et à l'intérieur de la zone de l'infarctus chez la souris (*Illustrations issues de Gao et al. 2005 et Fang et al. 2007*) (IMA: *Infarctus du Myocarde Aigu*; MEC: *Matrice ExtraCellulaire*; MMP *Métalloprotéinase de la matrice*).

En ce qui concerne les conséquences touchant le remodelage de la zone viable et la fonction cardiaque globale liées au remodelage cicatriciel, elles seront développées dans une partie dédiée.

### *I-4-2 Le remodelage globale du ventricule gauche suite à un infarctus du myocarde*

Comme décrit précédemment, l'infarctus du myocarde va être un tissu vivant qui va évoluer au cours du temps. De nombreux types cellulaires vont être impliqués pour aboutir à une cicatrice dont la structure va permettre de maintenir l'intégrité du cœur en luttant contre les pressions exercées par le sang dans la cavité du ventricule gauche. La présence et l'évolution de la zone infarctée vont avoir un impact sur la géométrie globale du cœur et ainsi conduire à l'activation de nombreux mécanismes compensateurs. Cette évolution va être aussi responsable de la mise en place de remodelages au niveau des zones bordant l'infarctus et non infarctée.

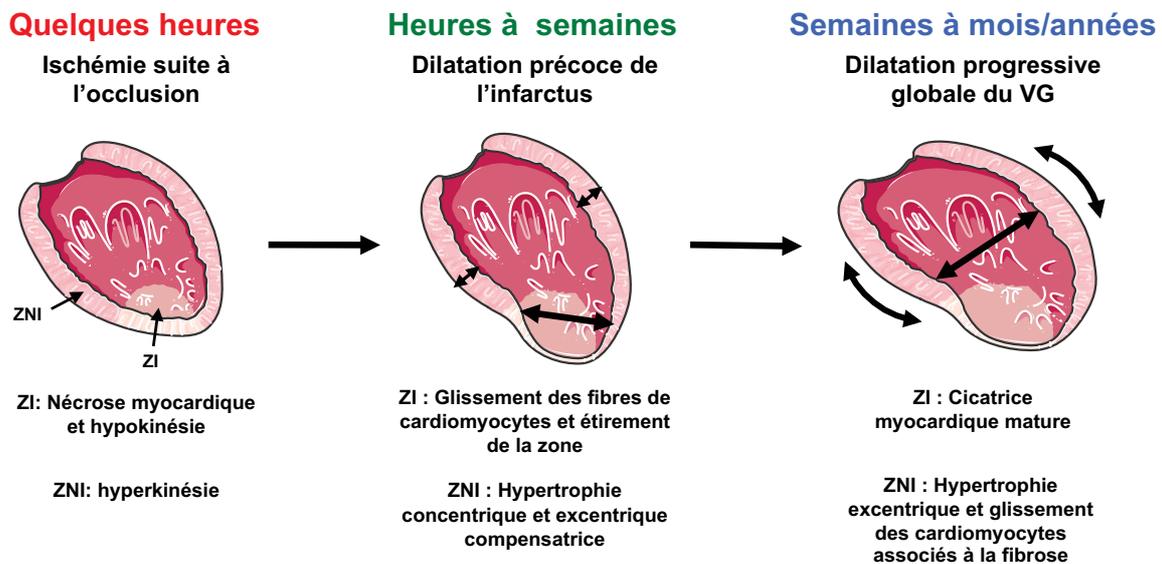
Dans cette partie, l'évolution naturelle du remodelage global du ventricule gauche, en réponse à la présence d'un infarctus, va être développée de manière intégrée jusqu'à son stade terminale qui est l'insuffisance cardiaque. En raison de la complexité des interactions entre les différents mécanismes cellulaires et moléculaires présents dans les remodelages structuraux et fonctionnels du ventricule gauche après un IDM, seules les composantes majeures du remodelage en lien avec une augmentation de l'arythmogénicité du myocarde seront abordées, étant la nature même de mon travail de thèse.

#### *I-4-2-1 L'évolution naturelle du remodelage ventriculaire gauche après un infarctus du myocarde*

Contrairement à une sténose aortique et une régurgitation mitrale conduisant respectivement à des conditions de surcharge de pression et de volume, l'infarctus du myocarde va être caractérisé par une série d'événements bien plus complexes incluant l'hypoactivité, l'expansion potentielle de l'infarctus, les modifications de charge volumique induites par cette expansion et en conséquence de pressions. Donc, l'IDM est une condition physiopathologique présentant des conditions de surcharges de pression et de volume associées, provoquant le remodelage du ventricule gauche dont les proportions vont directement dépendre de la taille de l'IDM (Opie et al., 2006).

Dans les premières heures suite à l'IDM, l'expansion de l'infarctus conduit à une dilatation du ventricule gauche provoquant l'augmentation du volume de la cavité responsable d'une élévation des pressions pariétales systoliques et diastoliques. Dans ces conditions, des réponses adaptatives afin de préserver le débit cardiaque sont mises en place. Dans un premier temps, par l'action du mécanisme dit de « Frank/Sterling », la contractilité va tendre à restaurer les pressions de remplissage ventriculaire en réponse à la dilatation liée à l'expansion de l'IDM. Puis, les perturbations hémodynamiques induites déclenchent le système nerveux sympathique provoquant la stimulation et la libération de catécholamines par les glandes surrénales et les terminaisons nerveuses sympathiques. A leur tour, les catécholamines vont activer le système rénine/angiotensine/aldostérone et stimuler la production de peptides natriurétiques comme l'ANP ou le BNP, en réponse à l'étirement des fibres myocardiques (Sutton et al., 2000). La stimulation sympathique va participer **au maintien du débit cardiaque** par des augmentations de la fréquence cardiaque et de la force de contraction responsables

de l'hyperkinésie du myocarde non infarcté, **ainsi que de la pression sanguine** en augmentant la vasoconstriction systémique et le tonus veineux (Floréa et al., 2014). Les peptides natriurétiques, quant à eux par leurs actions sur les fonctions rénale et vasculaire, vont tendre à normaliser les paramètres de remplissage du ventricule et donc améliorer la fonction « pompe » du cœur (Sutton et al., 2000). C'est pourquoi, de manière générale, la dilatation précoce du ventricule peut être considérée comme un processus adaptatif bénéfique associé avec une augmentation du volume systolique et un maintien du débit cardiaque. Cette dilatation de la zone infarctée va avoir un impact sur la géométrie du ventricule gauche engendrant une forte augmentation des pressions pariétales au niveau de l'apex du ventricule et jusqu'au milieu du ventricule (Figure 10).



**Figure 10 : Le remodelage ventriculaire gauche suite à un infarctus du myocarde.** Cette figure reprend les grandes étapes du remodelage après l'induction d'un infarctus du myocarde (*Illustrations issues de Servier Medical Art*) (ZI : Zone Infarctée ; ZNI : Zone Non Infarctée).

Dans les premières heures à semaines après l'IDM, l'étirement des cellules, induit par les conditions de surcharge en volume et en pression ainsi que l'activation des systèmes neurohormonaux, va également induire des réponses cellulaires comme l'hypertrophie des segments du ventricule gauche non atteints par l'infarctus pour permettre une normalisation du stress pariétal induit par la dilatation du ventricule suite à l'expansion progressive de l'infarctus. Plus spécifiquement, les conditions de surcharge en pression et en volume vont être responsables respectivement d'une hypertrophie concentrique, résultant d'une augmentation de l'épaisseur des cardiomyocytes par un ajout de sarcomères en parallèle, puis d'une hypertrophie excentrique associée à une réplication en série de sarcomères et un allongement des cardiomyocytes. Selon la loi de Laplace, l'hypertrophie concentrique va être responsable de la réduction du stress pariétal nécessaire pour normaliser la fonction ventriculaire gauche. Cependant, dans la plupart des publications relatant le remodelage cardiaque ventriculaire post IDM, l'augmentation des pressions de remplissage diastolique, liée à la

dilatation du ventricule suite à l'expansion de l'infarctus, va être majoritairement responsable du développement d'une hypertrophie excentrique. Initialement, la mise en place d'une hypertrophie au niveau du myocarde non atteint va être bénéfique en compensant la perte de fonction de la zone infarctée (Gajarsa et al., 2011). On parle alors d'insuffisance cardiaque compensée (Figure 10).

Cependant, au fil du temps, le remodelage va devenir délétère pour la fonction du ventricule gauche. En effet, le développement de l'hypertrophie excentrique en réponse à la dilatation va conduire à un allongement du myocarde, agrandir le rayon du ventricule et, en accord avec la loi de Laplace, augmenter le stress pariétal. Le volume du ventricule gauche augmentant plus rapidement que l'hypertrophie compensatrice, un cercle vicieux va pouvoir se mettre en place provoquant à terme la dilatation progressive de la cavité afin de maintenir la fonction ventriculaire gauche (Figure 10).

Au cours du temps, le cœur va passer d'une forme elliptique à une forme sphérique qui est caractéristique d'une remodelage ventriculaire gauche pour un infarctus transmural de taille importante. En parallèle de l'hypertrophie excentrique au cours du remodelage du ventricule gauche, les augmentations de l'activité des métalloprotéinases et de la synthèse de nouvelles fibres font parties du processus de fibrose. Elles vont être responsables du glissement des cardiomyocytes et participer à la dilatation de la cavité du ventricule par un allongement et amincissement de la paroi du myocarde non infarctée. Ce phénomène de glissement des cardiomyocytes reste controversé chez l'homme car il n'a pas été aussi rigoureusement décrit en comparaison de ce qui est publié pour les modèles animaux (Opie et al., 2006). Ce remodelage progressif va conduire à la mise en place de la dysfonction du ventricule gauche. Cependant, malgré la simplicité de la description ci-dessus, il faut rappeler que le remodelage ventriculaire après un IDM ne peut être considéré comme un processus homogène et reproductible. Plusieurs facteurs vont interférer sur la prévalence, l'intensité et la sévérité du remodelage, notamment la taille, la localisation et la transmuralité de l'infarctus, sa cicatrisation, les conditions de stress myocardique, et des modulateurs hormonaux, comme l'angiotensine II, l'endothéline 1, les catécholamines ou encore des cytokines pro-inflammatoires entre autres (Zornoff et al., 2008)

De nombreux processus tissulaires, cellulaires et moléculaires vont avoir lieu en concomitance et être directement ou non liés aux remodelages structuraux et fonctionnels décrits précédemment. Parmi eux, au niveau des cardiomyocytes, l'altération de l'homéostasie calcique et de la réponse des myofilaments qui en résulte, deux processus subcellulaires qui sont en lien avec l'hypertrophie seront développés dans la prochaine partie. Ils vont participer à la détérioration de la fonction systolique du ventricule gauche sur le long terme qui se traduit par une baisse de la fraction d'éjection (Zornoff et al., 2008). Dans ce cas, les patients vont développer une insuffisance cardiaque gauche dite décompensée.

### *I-4-2-2 Les composantes tissulaires, cellulaires et moléculaires du remodelage cardiaque gauche en lien avec une augmentation de l'arythmogénicité du myocarde*

De nombreux processus cellulaires et moléculaires sont induits et recrutés au cours de la mise en place du remodelage cardiaque ventriculaire suite à l'IDM. Ils vont avoir des répercussions multiples sur la structure et la fonction du cœur. Parmi eux, il va y avoir les systèmes neurohormonaux, l'hypertrophie, la fibrose, l'inflammation, la mort cellulaire, le stress oxydant et des modifications du métabolisme énergétique cardiaque en autres. Cependant dans cette partie, seuls les principaux processus ayant un impact sur les propriétés électriques et l'induction d'arythmie au cours du remodelage cardiaque post IDM seront abordés de façon non exhaustive.

#### *- L'hypertrophie cardiomyocytaire*

L'hypertrophie cardiomyocytaire est un processus complexe mis en place en réponse à une surcharge mécanique. Ce dernier est considéré comme un mécanisme adaptatif afin d'améliorer la fonction « pompe » du cœur en augmentant le nombre d'unité contractile et en réduisant les contraintes pariétales. Il se caractérise par une augmentation de la taille des cardiomyocytes, *via* le nombre de sarcomères et une réorganisation des composants intracellulaires dépendante de la régulation de synthèse protéique intracellulaire. L'étirement cardiomyocytaire, l'activation du système  $\beta$  adrénergique, l'angiotensine II, l'endothéline 1, des cytokines ou encore le stress oxydant font partie des nombreux stimuli pro hypertrophiques qui vont activer des récepteurs membranaires mobilisant de nombreuses voies de signalisation intracellulaires qui à terme vont induire la transcription des gènes responsables de la mise en place de l'hypertrophie (Mill et al., 2014). On va pouvoir distinguer 3 types d'hypertrophie : 1) **l'hypertrophie physiologique du sportif**, 2) **l'hypertrophie concentrique** associée à une surcharge de pression et caractérisée par une augmentation du diamètre des cardiomyocytes liée à l'ajout en parallèle d'unités sarcomériques et 3) **l'hypertrophie excentrique** associée à une surcharge volumique et caractérisée par un allongement des cardiomyocytes liée à une accumulation en série d'unités sarcomériques. Parmi les voies impliquées dans l'hypertrophie, les facteurs neurohormonaux vont induire un programme de réexpression de gènes fœtaux au niveau des cardiomyocytes lors d'une hypertrophie pathologique. Ce dernier va induire l'expression d'un certain nombre de protéines dont l'isoforme  $\beta$  de la chaîne lourde de la myosine ou  $\beta$ -MHC (Myosin Heavy Chain), l'ANP (Atrial Peptide Natriuretic), l' $\alpha$ -actinine ou l'actine cardiaque en autres. Ce programme n'étant pas activé dans le cas d'une hypertrophie physiologique, l'induction de l'expression de ses marqueurs est utilisée afin de mettre en évidence l'existence d'une hypertrophie pathologique par diagnostic moléculaire (Barry et al., 2008).

Plus précisément pour les isoformes de la MHC, deux éléments doivent être évoqués: 1) l'isoforme majoritaire exprimée dans des conditions normales va différer entre l'homme et la souris avec une expression de l'isoforme  $\beta$  chez l'homme et de l'isoforme  $\alpha$  chez la souris en adéquation avec la physiologie de l'espèce, 2) l'activité ATPase et la vitesse de raccourcissement des sarcomères

de la  $\beta$ -MHC sont plus faibles comparées à celles de  $\alpha$ -MHC. Ainsi une élévation de l'expression de l'isoforme  $\beta$  va pouvoir participer à la mise en place de la dysfonction systolique associée à l'insuffisance cardiaque post ischémique.

Sur le plan électrophysiologique, les processus d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques vont être associés à un remodelage moléculaire augmentant l'hétérogénéité de repolarisation dans le myocarde et, en conséquence, le risque de survenue d'arythmies.

### ***- La fibrose cardiaque***

La matrice extracellulaire est un complexe multifonctionnel de protéines et de protéoglycanes assemblés et hautement organisés contribuant aux intégrités structurale et fonctionnelle du cœur (Vanhoutte et al., 2006). De nombreuses pathologies cardiaques sont associées au développement d'une fibrose cardiaque. La fibrose se définit comme un processus de cicatrisation caractérisé par l'accumulation de fibroblastes associée à un excès de dépôt de protéines de la matrice extracellulaire conduisant à des altérations de la structure et de la fonction de l'organe. La fibrose peut se manifester sous deux formes : 1) **une fibrose interstitielle réactive** qui va être une réponse adaptative, en absence de mort cellulaire, pour préserver la capacité du cœur à générer une pression. Il est à noter que cette fibrose peut évoluer vers une fibrose de remplacement caractérisé par une hypertrophie et une nécrose cardiomyocytaire, 2) **une fibrose de remplacement** qui va avoir lieu exclusivement après la mort de cardiomyocytes comme dans la zone de l'infarctus (Krenning et al., 2010).

Les fibroblastes et les myofibroblastes associés, sont les principaux producteurs de la matrice extracellulaire (MEC) et vont contribuer significativement à la fibrose cardiaque. La composition cellulaire du cœur varie en fonction des espèces avec notamment environ 27% de fibroblastes chez l'homme et 67% chez le rat. Les origines des fibroblastes et des myofibroblastes ne sont pas encore totalement connues et font l'objet d'une recherche active. A ce jour, il est reconnu qu'ils existent plusieurs phénotypes de fibroblaste au sein d'un même tissu dans des conditions normales comme pathologiques. En ce qui concerne le cœur, les fibroblastes vont provenir des fibroblastes résidents, des cellules endothéliales, des cellules périvasculaires, des progéniteurs circulants de la moëlle osseuse, des fibrocytes et des monocytes. Les fibroblastes vont avoir des fonctions pléiotropiques comme :

1) **L'organisation de la MEC** par la synthèse de collagène de type I et III, des constituants majeures de la matrice cardiaque, en réponse à des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , PDGF), des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) ou une stimulation mécanique (étirement), et la dégradation de la MEC en modulant l'expression de métalloprotéinases (MMPs) et de leurs inhibiteurs naturelles, les TIMPs.

2) **La synthèse et la sécrétion de molécules** comme des facteurs de croissance ou des cytokines en autres qui vont avoir des actions autocrines et paracrines pour induire des effets tels que la prolifération cellulaire, l'hypertrophie ou l'apoptose en autres.

3) **Une implication dans l'électrophysiologie cardiaque**, de manière passive, avec la synthèse de couches de collagène qui isolent physiquement les fibres de cardiomyocytes et forment un rempart à la diffusion de l'influx électrique. Elle va pouvoir aussi agir « activement » sur l'électrophysiologie du cœur *via* ces propriétés de conduction membranaires du signal électrique et de son couplage avec les cardiomyocytes, mais aussi par son rôle de transducteur mécanique électrique avec l'expression de nombreux canaux sensibles à l'étirement au niveau de sa membrane (Krenning et al., 2010).

La fibrose du tissu myocardique va avoir des conséquences significatives sur la fonction cardiaque. Son développement, en réponse à un stress myocardique, va être responsable d'une augmentation de la rigidité du myocarde provoquant à terme la mise en place d'une dysfonction diastolique. Comme il sera développé dans la partie traitant des arythmies, cette fibrose va avoir des conséquences sur les propriétés électriques du cœur et faire partie intégrante des mécanismes impliqués dans la genèse des arythmies ventriculaires.

### *- Le système nerveux autonome*

Le système nerveux autonome cardiaque comprend un **système sympathique** (SS) et un **système parasympathique** (SPS) qui vont réguler finement l'activité du cœur. L'adrénaline et la noradrénaline, nommées catécholamines, sont les médiateurs du SS. Elles vont être libérées au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques ou des glandes médullosurrénales. Elles vont pouvoir, *via* l'activation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques, l'activité pacemaker du nœud sinusal, augmenter la conduction au niveau de nœud atrio-ventriculaire et la contractilité du myocarde. En revanche, l'acétylcholine, le médiateur du SPS va réduire les paramètres précédemment cités. Comme vu auparavant, l'activation du SS au cours de la phase aiguë de l'IDM va avoir un effet bénéfique en maintenant le débit cardiaque et donc la pression sanguine systémique (Florea et al., 2014). Cependant, la stimulation du myocarde, *via* l'activation chronique du SS, va participer aux inductions de l'hypertrophie des cardiomyocytes et de la fibrose interstitielle, remodelages responsables de l'arythmogénicité et de la dilatation ventriculaire gauche. De plus, la stimulation chronique du SS va également avoir des répercussions délétères et participer à la mise en place de l'insuffisance cardiaque par 1) **la désensibilisation des récepteurs  $\beta_1/\beta_2$  adrénergiques** ainsi qu'une baisse de l'expression membranaire des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques, et 2) **des effets toxiques** sur les cardiomyocytes en induisant une surcharge calcique avec un impact sur la viabilité de ces derniers et responsables d'une dénervation sympathique. L'activité du SNS va pouvoir être évaluée en mesurant de manière non invasive la variabilité de la fréquence cardiaque ou HRV en anglais (Heart Rate Variability) (Florea et al., 2014). Comme nous le verrons plus tard, des variations de ce paramètre au cours de l'IDM, comme de l'insuffisance cardiaque, vont pouvoir servir de marqueurs prédictifs pour le risque d'arythmies et de mort subite chez les patients post-ischémiques.

Hormis son activation, il a été décrit, chez l'homme (Cao et al., 2000), la souris (Oh et al., 2006), le rat (Hasan et al., 2006) et le chien (Zhou et al., 2004), un remodelage du système nerveux sympathique dans le cadre de l'infarctus du myocarde. Dans les quelques minutes à heures qui suivent l'ischémie, une dénervation a lieu au niveau du myocarde sans caractères nécrotiques. Par la suite, l'expression de facteurs neurotrophiques, plus particulièrement du NGF (Nerve Growth factor), au niveau de la zone bordant l'infarctus et de la zone non infarctée, va permettre la régénération des terminaisons nerveuses sympathiques et conduire paradoxalement à une hyper innervation du myocarde. Il semblerait que les fibroblastes cardiaques, exprimant du NGF, soient responsables de la régulation du processus de régénération et de la stabilité des synapses mises en place (Mias et al., 2013) Cette hyper innervation post-IDM va, en maintenant la contractilité du myocarde, s'avérer être bénéfique. Cependant, inversement, cette innervation va augmenter le risque de survenue d'arythmies suite à l'IDM.

Dans un contexte d'insuffisance cardiaque terminale, cette innervation sympathique fait même l'objet de contradictions. D'un premier côté, l'activation sympathique participe à la progression vers un stade d'insuffisance cardiaque. D'un autre côté, il a été décrit, chez des patients avec une insuffisance cardiaque, des diminutions de la densité des innervations sympathiques et de l'expression du facteur NGF. Ces diminutions seraient potentiellement liées aux catécholamines, elles-mêmes (D'Elia et al., 2014). Comme cela sera développé plus tard, cette hyper innervation va être une source arythmogène au cours de l'IDM, comme de l'insuffisance cardiaque.

### *- Perturbations du couplage excitation-contraction et dysfonction du réticulum sarcoplasmique.*

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) joue un rôle primordial dans le couplage entre l'excitation et la contraction chez les cardiomyocytes. Brièvement, suite à la dépolarisation membranaire induite par l'ouverture des canaux sodiques, l'activation des canaux calciques de type L induit une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule qui va déclencher à son tour la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du réticulum sarcoplasmique *via* l'activation des récepteurs intracellulaires à la ryanodine (RyR2). On parle du processus de «  $\text{Ca}^{2+}$  induit  $\text{Ca}^{2+}$  release ». Le  $\text{Ca}^{2+}$  issu du réticulum va alors diffuser puis aller se fixer sur la troponine C et permettre la contraction des cardiomyocytes. L'amplitude de ce processus va être gouvernée *via* un certain nombre de facteurs : 1) **le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum**, 2) **la fonction des canaux RyR2** régulée par des phosphorylations ajoutées par la PKA et la kinase II dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline (CaMKII), ou des déphosphorylations par de nombreuses phosphatases. Le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique va lui dépendre de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule, l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  par pompe à  $\text{Ca}^{2+}$  et l'échangeur  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  NCX, et la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum par la pompe ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  SERCA2a (Nattel et al., 2007 ; Luo et al., 2013).

L'insuffisance cardiaque est associée à des altérations des protéines de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . Il a ainsi été observé des augmentations transcriptionnelle et protéique de l'échangeur NCX. En ce qui

concerne la pompe SERCA2a, les données sont plutôt controversées. En effet, malgré qu'une baisse de l'activité de la pompe soit observée et corrélée avec une baisse du niveau d'expression de son ARNm en fonction des études, le niveau d'expression protéique peut être décrit comme baissé ou inchangé (Tomasselli et al., 2004 ; Nattel et al., 2007). De plus, l'activité de la pompe SERCA2a est régulée par le phospholamban (PLN) et de son état de phosphorylation, état inhibé lorsque ce dernier est déphosphorylé. L'expression du PLN n'est pas modifiée au cours de l'IC, en revanche il a été décrit des baisses de phosphorylation pour la PKA et la CaMKII qui, malgré l'augmentation de l'activité de ces kinases au cours de l'IC, seraient liées à une augmentation des activités des phosphatases PP1 et PP2A respectivement (Luo et al., 2013). En dehors de son activation par le courant  $I_{Ca,L}$ , l'activité de RyR2 est aussi régulée par de nombreux facteurs au niveau cytoplasmique : la PKA, la CaMKII, la PP1 et PPP2A, la calmoduline et la FKBP12.6. Dans l'IC chez l'homme et les modèles animaux, il a été souvent décrit une hyperphosphorylation de RyR2 *via* la PKA associée à une dissociation de RyR2 avec FKBP12.6. La probabilité d'ouverture de RyR2 est alors augmentée, ce qui est responsable de la fuite de  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique participant ainsi à une augmentation de la concentration intracellulaire pour cet ion. Cependant d'autres études reportent des résultats controversés sur les phosphorylations de la PKA de RyR2 et la dysfonction induite notamment après un IDM, indiquant l'existence de mécanismes alternatifs pouvant être important dans la régulation de RyR2 dans l'IC. Des phosphorylations de la CaMKII, activées soit par le stress oxydant, soit par la stimulation  $\beta$  adrénergique, ont aussi été décrites comme conduisant à une augmentation de la libération de  $Ca^{2+}$  durant la diastole (Luo et al., 2013).

Les modulations d'expression et de la régulation de ces acteurs de l'homéostasie calcique vont donc conduire à des altérations de la gestion du  $Ca^{2+}$ . Ces dérégulations peuvent alors être les sources d'induction d'événements arythmiques spontanés ou d'une perturbation chronique de la repolarisation des cardiomyocytes.

### *I-4-2-3 Controverse sur les différences inter espèces du remodelage cardiaque au cours de la phase aiguë de l'IDM*

A partir de l'étude clinique VALIANT (Valsartan in Acute myocardial Infarction Trial) réalisée chez des patients inclus au cours de la phase aiguë de l'IDM, Verma et ses collaborateurs ont identifié 4 configurations de remodelage cardiaque possibles à partir des données échocardiographiques : 1) **une géométrie normale**, 2) **un remodelage concentrique** caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de paroi sans augmentation de la masse du cœur, 3) une **hypertrophie concentrique** ou 4) une **hypertrophie excentrique**. Ces différents types de remodelages ont été associés aux incidences de complications cliniques cardiovasculaires conduisant au décès des patients. Il a été notamment décrit l'association d'une hypertrophie concentrique avec une élévation des décès d'origines cardiovasculaires chez ces sujets (Konstam et al., 2011). Cependant, dans une volonté d'étude comparative avec un modèle d'infarctus du myocarde par

ligature coronaire chez le rat investigué dans une phase aiguë de 3 premiers mois, Minicucci et ses collaborateurs n'ont identifié que 2 types de remodelage : une géométrie normale ou une hypertrophie excentrique, non associés à une différence de taille de l'IDM ou de dysfonction ventriculaire gauche. Ils n'ont décrit aucune association entre ces remodelages et le devenir des animaux. Les auteurs ont justifiés ces différences par 1) un biais par la sélection des animaux ayant survécus seulement au cours des 3 mois, et 2) l'utilisation d'une population homogène en âge, sexe, fond génétique et une absence de co-morbidités comme le diabète ou l'hypertension, ce qui n'est pas le reflet de la situation humaine (Minicucci et al., 2010). En effet, une analyse des données collectées chez les patients de l'étude VALIANT a montré que la prévalence de l'hypertension chez les patients suivait le profil des incidences de décès cardiovasculaires en lien avec les différents remodelages. Ainsi, le profil d'hypertrophie concentrique était particulièrement lié à l'hypertension (Konstam et al., 2008).

Ces différences inter espèces montrent la difficulté et la limite de l'utilisation des modèles animaux à reproduire les profils de remodelage observés chez l'homme. Elles mettent surtout en avant l'importance de la prise en compte d'autres facteurs tels que la composante génétique ou l'existence de co-morbidité chez les patients comme des facteurs pouvant influencer le remodelage cardiaque et le devenir des patients présentant un IDM aigu.

### *I-4-3 L'insuffisance cardiaque gauche et ses complications*

#### *I-4-3-1 Définition, symptômes et classifications de l'insuffisance cardiaque*

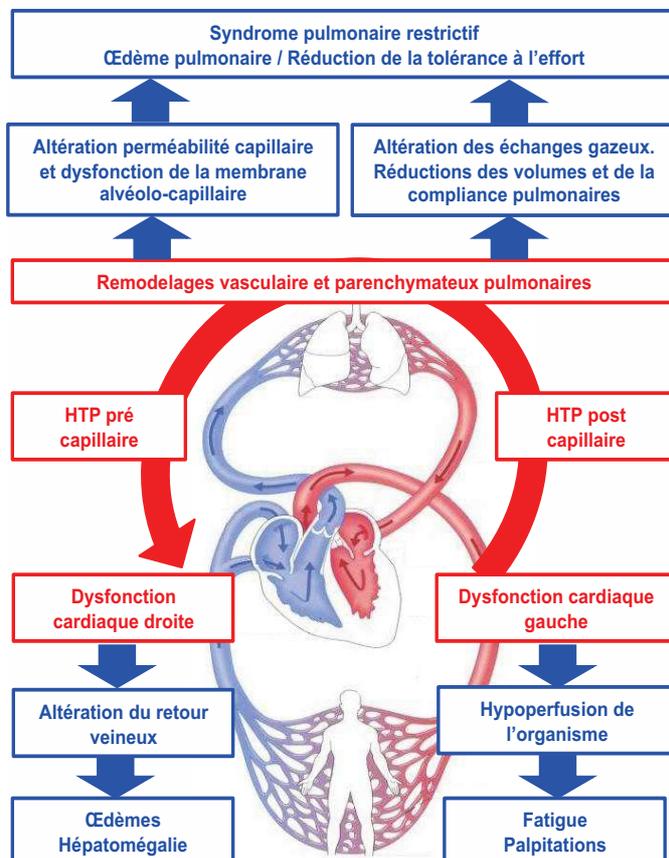
L'insuffisance cardiaque (IC) est décrite comme un syndrome clinique complexe où le cœur n'est plus en mesure d'assurer le débit sanguin nécessaire aux besoins gazeux et métaboliques de l'organisme et de gérer le retour veineux. Cette dernière est causée majoritairement par des maladies cardiaques ischémiques, l'hypertension et le diabète, puis par des cardiomyopathies, des infections, des toxines, des atteintes valvulaires ou des arythmies prolongées (Kemp et al., 2012). L'infarctus du myocarde, par la mise en place des mécanismes précédemment décrits comme compensateurs avant de devenir délétères, va être à l'origine d'une dysfonction systolique du ventricule gauche conduisant à différents symptômes associés à l'IC.

Ces symptômes vont être multiples : 1) **des dyspnées, une toux ou des essoufflements** qui vont être le résultat de l'augmentation de la pression au niveau des lits capillaires pulmonaires suite au défaut d'éjection du ventricule gauche, 2) **un œdème des membres inférieurs** ayant lieu lorsque le ventricule droit n'est plus en mesure d'assurer le retour veineux, 3) **une fatigue** liée à la dysfonction cardiaque ne permettant pas de répondre aux besoins métaboliques et de conserver un flux sanguin suffisant vers le cœur et le cerveau, 4) **des nausées et une perte d'appétit** lorsque le sang est limité dans le tractus gastro-intestinal au profit des organes vitaux, 5) **des palpitations** lorsque l'organisme tente de compenser la dysfonction du VG par une augmentation de la fréquence cardiaque (Kemp et al., 2012).

L'insuffisance cardiaque est communément classifiée par la NYHA (New York Heart Association), laquelle sépare les patients en 4 grandes classes basées à partir des atteintes provoquées par l'insuffisance cardiaque sur le bien-être et l'activité physique des patients. L'attribution d'une classe est non seulement un moyen de déterminer le statut fonctionnel du cœur mais aussi un critère dans les études cliniques pour orienter les traitements et les dispositifs médicaux à mettre en place. Depuis, l'ACC (American College of Cardiology) et l'AHA (American Heart Association) ont développé un nouveau système reposant sur l'évolution et la progression de la pathologie tout en intégrant la présence de facteurs de risques et l'existence de pré requis structuraux pour le développement de l'IC (Hunt et al., 2005 ; Kemp et al., 2012). Quelques soient les classifications, elles s'étendent de l'absence de symptôme apparent à une dysfonction cardiaque majeure limitant l'activité physique des patients.

*I-4-3-2 Les complications de l'insuffisance cardiaque gauche*

La dysfonction du ventricule gauche, en plus de l'hypoperfusion de l'organisme, augmente le volume de sang dans la cavité ventriculaire en fin de systole et de diastole, se traduisant par une augmentation de la pression intra ventriculaire gauche en fin de diastole. Ceci provoque une élévation des pressions auriculaires gauches qui vont à leur tour augmenter passivement la pression dans les veines et les lits capillaires des poumons (Kemp et al., 2012), on parle aussi d'hypertension pulmonaire post capillaire (Seferian et al., 2014) (Figure 11).



**Figure 11: Insuffisance cardiaque, et conséquences.** Diagramme schématique des différents processus faisant suite à une dysfonction du VG faisant suite à un IDM et conduisant à des remodelages vasculaires et parenchymateux au niveau des poumons. Ces remodelages sont responsables d'un syndrome pulmonaire restrictif associée à une réduction de la tolérance à l'effort comme décrites chez les patients. De plus, en fonction de la sévérité et de l'avancée de la pathologie, ces remodelages vont pouvoir avoir un retentissement sur le cœur droit avec la mise en place d'une dysfonction altérant le retour veineux. Cet altération est responsable de l'apparition d'œdèmes dans les membres inférieurs et d'une hépatomégalie (HTP: *HyperTension Pulmonaire*; IDM: *Infarctus Du Myocarde*; VG: *Ventricule gauche*).

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une complication commune des pathologies cardiaques gauches comme l'insuffisance cardiaque. Les conséquences de l'hypertension pulmonaire sont souvent considérées comme des symptômes de ces pathologies et associées à un mauvais pronostic et une prédiction de mortalité plus élevée (Vachiéry et al., 2013 ; Azarbar et al., 2014). Depuis les 10 dernières années, l'hypertension pulmonaire induite par les pathologies cardiaques gauches est discutée comme étant un problème concernant sa définition et son diagnostic, mais aussi à propos de son influence sur les complications et les traitements de l'IC (Vachiéry et al., 2013). En effet, les poumons ont été souvent négligés en tant que cible thérapeutique potentielle pour la prise en charge des patients avec une pathologie chronique du cœur gauche. Ceci explique les faibles options thérapeutiques disponibles à ce jour en dehors des traitements symptomatiques de l'œdème pulmonaire. Cependant, des évidences précliniques et cliniques montrent que le remodelage structural pulmonaire devrait être pris en compte avec plus d'attention comme un élément pouvant contribuer à l'état des patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique (Azarbar et al., 2014).

Malgré sa prévalence, la physiopathologie de l'altération pulmonaire associée à une dysfonction cardiaque gauche n'est pas complètement comprise aux niveaux cellulaires et microstructuraux. Dans un premier temps, en réponse aux élévations de pressions dans les veines et les capillaires, les remodelages vasculaire, alvéolaire et parenchymateux pulmonaire seraient adaptatifs et protecteurs en limitant le développement de l'œdème induit par l'altération de la perméabilité capillaire et une dysfonction de la barrière alvéolo-capillaire. Puis, comme lors de l'insuffisance cardiaque, ces remodelages deviendraient inadaptés en ayant un impact sur le pronostic des patients et sur le développement d'une hypertension pulmonaire (Azarbar et al., 2014). En effet, il est généralement accepté que les pathologies cardiaques gauches conduisent à des remodelages du système vasculaire pulmonaire, comme des anomalies dans les fibres élastiques, une fibrose de l'*intima* et une hypertrophie de la *média* (Delgado et al., 2007). De plus, chez des modèles de rats insuffisants cardiaques après un infarctus, comme chez l'homme, lorsque la barrière alvéolo-capillaire est soumise à des cycles répétés de lésion/réparation, un remodelage du parenchyme est observé et associé avec une prolifération de myofibroblastes, au développement de fibrose et au dépôt d'éléments matriciels augmentant l'épaisseur du septum inter alvéolaire. Ce remodelage répétitif du parenchyme, associé au remodelage vasculaire, va causer un syndrome pulmonaire restrictif caractérisé par un défaut d'échange des gaz au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, une réduction des volumes pulmonaires et une baisse de la compliance des poumons. Ces modifications sont fortement reliées aux limitations d'exercice secondaires chez les patients. Cependant à ce jour, les voies moléculaires impliquées n'ont pas encore été spécifiquement étudiées. Enfin, aucune prédisposition génétique dans les processus de lésion et réparation des poumons n'est décrite pour contribuer aux remodelages pulmonaires associés avec une dysfonction cardiaque gauche (Azarbar et al., 2014).

Dans le cas d'une sévérité importante ou d'une progression de l'insuffisance cardiaque, le remodelage pulmonaire induit va augmenter les pressions au niveau des poumons provoquant le développement d'une HTP dite pré capillaire, combinée à l'HTP post capillaire. La HTP pré capillaire va augmenter les conditions de post charge du ventricule droit au niveau de l'artère pulmonaire. La dysfonction ventriculaire droite ainsi induite va conduire à une augmentation du volume de sang dans la cavité suivi d'élévations des pressions dans l'oreillette droite et le système veineux provoquant un défaut du retour du sang niveau du cœur. Ce défaut va augmenter les pressions veineuses et la rétention d'eau, responsables de l'apparition de symptômes observés chez les patients comme une turgescence de la jugulaire, une hépatomégalie et la présence d'œdèmes périphériques (Kemp et al., 2012).

### **I-5 Les arythmies ventriculaires associées aux remodelages induits par l'infarctus du myocarde**

#### ***I-5-1- Les bases de l'électrophysiologie cardiaque au niveau ventriculaire***

L'activité normale de contraction des ventricules va dépendre d'une activité électrique appropriée et initiée par une activation séquentielle des cellules pacemakers, et une propagation de cette activité au travers des ventricules.

##### ***I-5-1-1 Le(s) potentiel(s) d'action ventriculaire(s)***

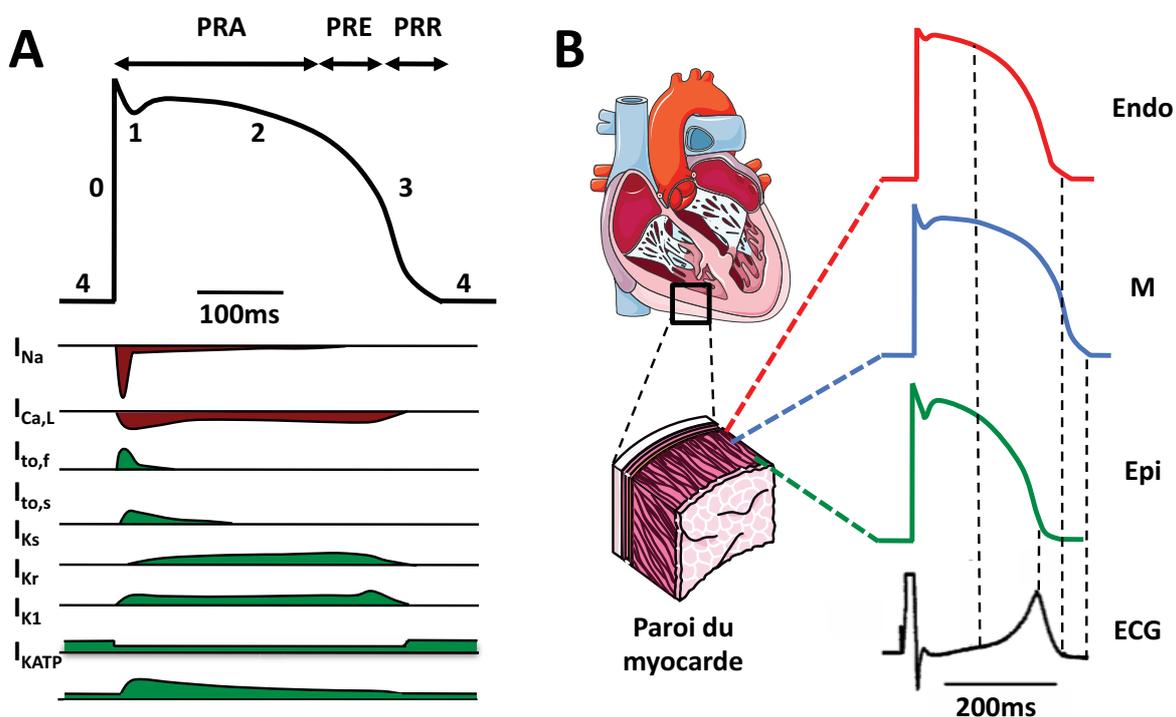
Comme décrit depuis de nombreuses années, l'activité électrique du myocarde est initiée dans les cellules dites « pacemakers » du nœud sino-atrial, puis propagée dans les oreillettes, le nœud auriculo ventriculaire, les fibres de His, le réseau des fibres de Purkinje avant d'aller exciter les ventricules. Une hétérogénéité de formes pour ces PA, entre ces différentes structures, existe et reflète des différences de régulation de l'expression et de la modulation des propriétés des canaux ioniques et transporteurs au niveau de la membrane de ces cardiomyocytes. Ces modifications vont avoir des effets notables sur la durée du PA, la réfraction et la rythmicité du cœur (Nerbonne et al., 2005). Seuls les fondements ioniques et les hétérogénéités du PA ventriculaire seront développés au cours du paragraphe à suivre.

La génération d'un **PA ventriculaire** reflète l'activation et l'inactivation séquentielle de canaux ioniques qui conduisent à des courants dépolarisants et repolarisants. Le PA est divisé en différentes phases désignées et annotées de 0 à 4 (Figure 12A).

La **phase 0** est la phase dépolarisation rapide du PA dont la vitesse est déterminée et corrélée à la proportion de canaux sodiques voltage-dépendant disponibles et dépolarisés, à l'origine du courant entrant  $I_{Na}$ . Cette phase reflète l'état d'excitation des cellules suite à une stimulation par l'onde excitatrice générée par le nœud sino atrial.

La **phase 1** est la phase de repolarisation rapide du PA. Elle est associée à l'inactivation des canaux sodiques et l'activation d'un courant potassique sortant, voltage dépendant, rapide et transitoire, appelé  $I_{to}$ . Ce courant repolarisant comprend des composantes rapide ( $I_{to,f}$ ) et lente ( $I_{to,s}$ ), et va avoir un rôle sur la hauteur et la durée du plateau, ainsi que sur la forme du PA, notamment l'aspect pic et dôme des PA ventriculaires.

La **phase 2** correspond à la phase de plateau du PA. La dépolarisation de la cellule active aussi les canaux calciques voltage dépendants de type L à l'origine du courant  $I_{Ca-L}$ . Cet influx de calcium est le principal déclencheur du « couplage excitation-contraction » au niveau des ventricules. Cette phase de plateau est le résultat de la balance entre le courant entrant calcique  $I_{Ca-L}$  et les courants sortants potassiques,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ .



**Figure 12: Les potentiels d'action ventriculaires.** A, Représentation d'un potentiel d'action ventriculaire associé aux courants ioniques impliqués dans les différentes phases du PA. Les courants dépolarisants sont représentés en rouge et les courants repolarisants en vert. B, Représentation de l'hétérogénéité des PA en lien avec une dispersion de la repolarisation au travers de la paroi myocardique ventriculaire (ECG: ElectroCardioGramme; Endo: Endocarde; Epi; Epicarde; M: Cellules M de paroi myocardique; PRA: Période Réfractaire Absolue; PRE: Période Réfractaire Effective; PRR: Période Réfractaire Relative).

La **phase 3** est la phase de repolarisation du PA. Elle est rendue possible par l'inactivation des canaux calciques de type L et un maintien des courants potassiques sortants permettant une repolarisation de la membrane vers le potentiel de repos. De nombreux canaux ioniques potassiques, voltages dépendants ou non, participent à cette étape de repolarisation, notamment les canaux ioniques responsables des courants  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ .

La **phase 4** est le maintien du potentiel de membrane de repos. Le potentiel de repos des ventricules est déterminé majoritairement par la conductance des ions potassiques, c'est à dire la facilité avec laquelle ces ions peuvent traverser la membrane plasmique. A l'état basal, cette conductance est élevée à cause de la forte perméabilité du courant potassique à rectification entrante,  $I_{K1}$  (Nattel et al., 2007 ; Nerbonne et al, 2005).

Le potentiel d'action ventriculaire, comme ceux des autres régions, peut être découpé en trois périodes qui vont conditionner la capacité de la cellule à générer un nouveau potentiel suite à une première excitation : 1) La **période réfractaire absolue (PRA)** correspondant à la période pendant laquelle aucun stimulus ne pourra déclencher un nouveau PA. Les canaux sodiques voltage-dépendant étant dans leur état d'inactivation, ils ne peuvent pas être recrutés pour générer un nouveau PA. La PRA comprend la phase 1 et 2 du PA, 2) La **période réfractaire effective (PRE)** est la période pendant laquelle un second stimulus pourra générer une dépolarisation de la membrane dont l'amplitude restera faible. Cette dernière ne pourra pas être propagée aux cellules voisines. Cette période comprend une petite partie de la phase 3 du PA en plus de la PRA, et 3) La **période réfractaire relative (PRR)** est la période pendant laquelle un second stimulus va pouvoir générer un potentiel d'action qui pourra être propagée aux cellules voisines en fonction de leur potentiel électrotonique. Plus le temps du second stimulus sera éloigné plus l'amplitude du signal généré sera élevée. En effet, au cours du temps, le potentiel de membrane retourne vers le potentiel de repos et la proportion de canaux sodiques sortant de leur état d'inactivation est plus importante permettant la génération et la propagation du PA. La PRR prend suite à PRE pour se terminer au cours de la phase 4 lorsque le potentiel de membrane atteint le potentiel de repos des ventricules (Figure 12A).

De plus, le myocarde ventriculaire n'est pas une structure homogène dans sa composition cellulaire. En effet, à partir d'études électrophysiologiques et pharmacologiques, il a pu être mis en évidence trois types de cellules myocardiques distinctes : les cellules épicrodiques, les cellules M et les cellules endocardiques. Ces différences de caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques de ces cellules semblent être conservées entre les espèces comme la souris, le rat, le chien, le cochon d'Inde, le lapin et l'homme. Les différences principales sont 1) un PA plus long au niveau des cellules M avec une capacité d'élargissement plus importante en réponse à des fréquences basses en comparaison des cellules épicrodiques et endocardiques, 2) la présence d'une forme caractéristique en pic et dôme de la phase 1 des PA pour les cellules épicrodiques et des cellules M. Ces différences électrophysiologiques sont le résultat de nombreuses variations d'expression et changements des propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques dans ces différentes cellules. La prolongation du PA des cellules M et les différences de formes des PA entre les 3 zones conduisent à une dispersion transmurale de la repolarisation ventriculaire (Antzelevitch et al., 2001) (Figure 12B).

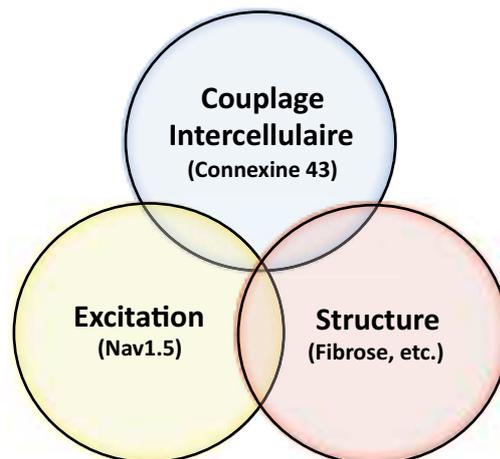
Comme pour le PA, il existe physiologiquement une hétérogénéité des périodes réfractaires ventriculaires qui est maximale pendant un court moment du cycle cardiaque correspondant

approximativement au sommet de l'onde T sur l'ECG aussi appelé période vulnérable comme il le sera développer dans la partie portant sur la définition des mécanismes associés aux survenues d'arythmies ventriculaires (Leenhardt et al., 2012).

Des modifications de l'environnement cellulaire vont avoir des répercussions sur l'expression et les propriétés électrophysiologiques des canaux modifiants ainsi la forme, la durée du PA ainsi que ses périodes réfractaires. En effet, la dispersion des durées de PA et de ses périodes réfractaires, natives ou modifiées par une condition pathologique comme l'ischémie, se présentent comme un mécanisme fondamental dans de nombreux cas de réentrées arythmiques à l'origine de l'apparition et du maintien de troubles du rythme ventriculaire (Burton et al., 2001 ; Coronel et al., 2012).

### I-5-1-2 La conduction cardiaque ventriculaire

La conduction de l'influx électrique au travers des différentes cavités du cœur, et notamment les ventricules, est régie par trois facteurs : 1) **l'excitabilité** des cardiomyocytes, 2) **le couplage électrique** entre les cardiomyocytes et 3) **les propriétés structurales du tissu myocardique** (Jansen et al., 2010) (Figure 13).



**Figure 13: Les trois composantes différentes conditionnant la conduction cardiaque ventriculaire.**

L'excitabilité unitaire des cardiomyocytes est déterminée par la quantité de courant sodique liée aux canaux sodiques voltage dépendants. Le courant dépolarisant  $I_{Na}$  génère non seulement une dépolarisation locale, mais aussi une activation des cellules adjacentes par la transmission de ce courant au travers des jonctions intercellulaires.

Le couplage électrique entre les cardiomyocytes, permettant la conduction de l'influx, est rendu possible par la formation des jonctions communicantes ou jonctions GAP entre deux cardiomyocytes adjacents. Ce type de jonction se situe préférentiellement au niveau des disques intercalaires. Dans les ventricules, ces jonctions sont formées à partir deux connexons majoritairement constitués de connexine 43. La formation et l'ouverture des jonctions gap vont être dépendantes de

l'expression, de la distribution et de la régulation des connexines 43 par de nombreux paramètres, comme le  $\text{Ca}^{2+}$  et le pH en autres (Beardslee et al. 2000).

Les propriétés structurales ou l'anisotropie structurale des ventricules vont être dépendantes d'un certain nombre de paramètres : la forme des cellules, les distributions des canaux ioniques ainsi que des jonctions GAP, le couplage entre des cardiomyocytes et des cellules non-myocytaires (Kléber et al., 2004), la composition de la matrice extracellulaire cardiaque et la fibrose

### ***I-5-2 Les arythmies ventriculaires : mécanismes et définitions***

La connaissance de la physiopathologie des troubles du rythme est importante sur le plan pratique car elle permet aux chercheurs d'identifier des voies thérapeutiques, médicamenteuses ou non. Elle permettra de mieux adapter les traitements pour les patients. Les arythmies ventriculaires sont principalement dues à des anomalies isolées ou associées à la génération ou la conduction des impulsions électriques cardiaques.

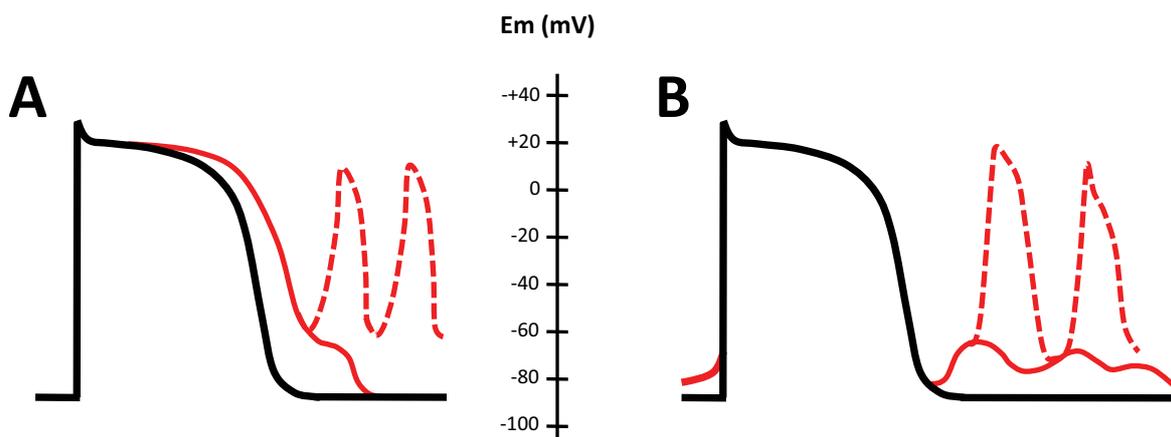
#### ***I-5-2-1 Les anomalies de génération de l'influx***

Les anomalies de génération de l'influx électrique ont pour origine des foyers d'activation anormaux, aussi appelées foyers ectopiques. Ces foyers ectopiques sont associés soit à un automatisme anormal, soit à des activités déclenchées.

Les automatismes anormaux comprennent : 1) **Les pacemakers subsidiaires du système de His-Purkinje** qui sont des foyers initiateurs d'influx étant physiologiquement latents à cause d'une inhibition par le rythme imposé par le nœud sinusal. Dans le cas de ralentissement de la fréquence sinusale ou de bloc auriculo-ventriculaire, ils sont responsables d'influx électriques appelés « échappements jonctionnels ou ventriculaires » en fonction de la localisation du foyer dans le système His-Purkinje. 2) **Les automatismes en relation avec une dépolarisation partielle du potentiel membranaire de repos**. Elles sont le résultat de l'atteinte de fibres du système de His-Purkinje ou ventriculaires, suite à une ischémie ou des prises médicamenteuses conduisant à une dépolarisation diastolique spontanée suite à un déséquilibre des courants ioniques en faveur des courants dépolarisants sodiques et calciques. On parle alors de foyers parasystoliques dont le rythme est indépendant de celui du nœud sinusal. Leur extériorisation est dépendante uniquement de la fréquence intrinsèque du foyer et de l'état des périodes réfractaires du myocarde créé par les impulsions d'origine sinusale. Ceci peut conduire soit à un couplage entre les complexes sinusaux et ectopiques, soit des intervalles inter-extrasystoliques fixes ou multiples.

Contrairement aux automatismes anormaux, les activités déclenchées par des post dépolarisations sont toujours dépendantes d'un PA préalable, qu'il soit spontané ou stimulé. Leur mécanisme repose sur la survenue d'un ou plusieurs oscillations du potentiel membranaire lors d'une post dépolarisation. En fonction du temps d'apparition de cette post dépolarisation, on peut distinguer deux groupes : 1) **Les post dépolarisations précoces ou « early after depolarization » (EAD) en**

**anglais.** Elles surviennent au cours de la phase 2 et 3 du PA et sont favorisées par un ralentissement de la repolarisation. Dans le cas d'une amplitude suffisante pour atteindre le potentiel seuil d'activation des canaux sodiques, elles entraînent la génération d'un nouveau PA dont les réponses éventuelles vont se perpétuer ou s'arrêter spontanément. Expérimentalement, elles peuvent être générées à partir de cellules de Purkinje ou ventriculaire par un milieu pauvre en  $K^+$  ou  $Mg^{2+}$ , une acidose, les catécholamines entre autres. Un ralentissement de la fréquence cardiaque favorise l'incidence des EADs (Figure 14A). **2) Les post dépolarisations tardives ou « delayed after depolarization » (DAD).** Elles apparaissent à la fin de la repolarisation sous forme d'oscillations du potentiel membranaire dont l'amplitude, en atteignant le potentiel seuil des canaux sodiques, déclenche un nouveau PA. Ces dépolarisations peuvent être répétitives et donc à l'origine d'une activité arythmique plus ou moins soutenue. Elles sont associées à des conditions augmentant la concentration du  $Ca^{2+}$  intracellulaire comme avec des milieux extracellulaires pauvres en  $Na^+$  ou riches en  $Ca^+$ , l'action des catécholamines sur les fibres cardiaques, les digitaliques ou une ischémie entre autres. Ces DADs sont aussi dépendantes de la fréquence cardiaque avec une augmentation provoquant une probabilité plus grande d'atteindre le potentiel seuil et de déclencher un PA avec un couplage plus élevé. Les salves de DADs ont spontanément tendance à ralentir, voir à s'arrêter (Figure 14B).



**Figure 14: Les activités déclenchées. A,** Une post dépolarisation précoce ou EAD. **B,** Une post dépolarisation tardive ou DAD. Pour chaque figure, le PA normal est en noir et le PA, en trait plein rouge, associé aux activités déclenchées en pointillés rouges (*Figures revues à partir de L'essentiel de la rythmologie par A.Leenhardt et al. Edition 2012*) (DAD: Delayed After Depolarization; EAD: Early After Depolarization; Em: potentiel de membrane; PA: Potentiel d'action).

#### *I-5-2-2 Les anomalies de la conduction de l'influx : les réentrées*

Les anomalies de la conduction vont constituer le substrat pour des phénomènes de réentrées arythmiques. Le concept de réentrée va impliquer qu'un influx électrique, d'origine sinusale ou ectopique, ne disparaît pas mais perdure après l'activation complète du cœur. Ces réentrées sont principalement dues à un ralentissement de la conduction dans les fibres ou le tissu myocardique. Lorsqu'elles émergent, la zone du cœur peut avoir retrouvée son excitabilité avec des cardiomyocytes

en période réfractaire relative et donc à nouveau excitable pour induire un battement cardiaque non initié par le rythme sinusal.

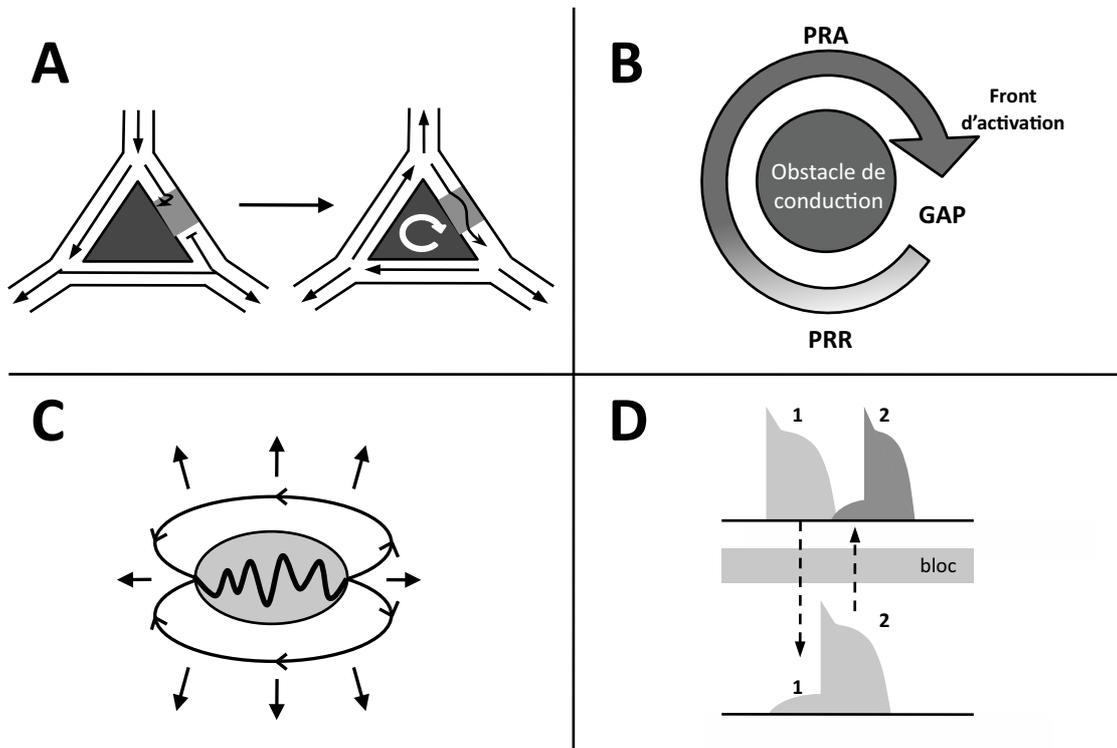
Plusieurs conditions sont nécessaires pour déclencher un phénomène de réentrée, notamment la réunion d'un substrat et d'un élément déclenchant.

Le substrat pour une réentrée peut être multifactoriel : 1) **l'existence d'un bloc unidirectionnel**, c'est à dire une conduction de l'influx électrique ne pouvant avoir lieu que dans un sens. Ce caractère unidirectionnel peut être d'origine fonctionnelle ou structurale (Figure 15A), 2) **une vitesse de conduction** suffisamment longue et des **périodes réfractaires** suffisamment courtes pour permettre au front d'activation de poursuivre sa propagation, 3) **la longueur d'onde de la réentrée**, correspondant au produit de la vitesse de conduction par la durée de la période réfractaire, soit inférieure à la longueur du circuit de la réentrée, et 4) **l'existence d'une période dite de gap** permettant à une stimulation électrique extérieure de maintenir et d'entretenir le phénomène de réentrée conduisant à une tachycardie cardiaque, ou au contraire d'interrompre le phénomène (Figure 15B). La conduction lente et le bloc unidirectionnel apparaissent dans des tissus partiellement dépolarisés où le PA va être soit une réponse lente dépendant du courant  $I_{Ca-L}$ , soit une réponse rapide mais déprimée dépendant du courant  $I_{Na}$ . En effet, les canaux sodiques sont partiellement inactivés suite à la dépolarisation. Le raccourcissement des périodes réfractaires peut être lié quant à lui à une diminution de la durée de la diastole *via* une stimulation sympathique ventriculaire. Les réentrées vont être favorisées par des hétérogénéités spatiale et temporelle des périodes réfractaires au sein de ce même tissu, ce qui peut être observable dans des conditions pathologiques comme l'infarctus du myocarde ou l'insuffisance cardiaque.

L'élément primordial pour le déclenchement des réentrées va être la genèse d'une extrasystole ventriculaire. Dans cette condition, l'influx se propage dans un tissu où les périodes réfractaires sont inégales avec des fibres encore en période réfractaire absolue ou de nouveau excitables car en période réfractaire relative. Il s'en suit alors une asymétrie de la conduction avec un influx bloqué au niveau du premier groupe de fibres et propagé dans le second, les premières fibres pouvant être de nouveau activables au cours du temps par l'influx. Ceci peut expliquer la différence de forme et l'augmentation de largeur du complexe QRS de l'extrasystole enregistrée.

Une réentrée ne prend pas forcément une forme, mais diverses formes qui vont dépendre de la taille et du chemin du circuit de la réentrée associés aux propriétés du myocarde engagé dans la genèse de cette réentrée. En effet, une réentrée peut se traduire soit par une extrasystole ventriculaire isolée, soit un salve d'extrasystoles, ou soit une tachycardie ventriculaire soutenue ou non. Selon la taille du circuit, on va parler de macro-réentrées ou mouvements circulaires, et de micro-réentrées. Elles peuvent prendre des formes dites en « 8 » (Figure 15C), en spirale ou des formes particulières telles que : 1) **La réentrée de phase 2** qui résulte de l'hétérogénéité des périodes réfractaires et d'une dispersion de la durée du PA dans l'épaisseur du myocarde avec la mise en place d'un gradient

électrique transmural. Ce gradient va être à l'origine d'une stimulation électrotonique, c'est à dire d'une conduction passive depuis les zones dépolarisées en phase 2 du PA vers des zones déjà revenues au potentiel de repos. 2) **La réentrée par réflexion** qui est le résultat de l'interaction électrotonique entre deux groupes de cellules séparés par une zone de bloc (Figure 15D).



**Figure 15: Les phénomènes de réentrée.** **A,** Théorie de la dualité nodale avec une zone d'hétérogénéité de conduction (zone gris clair) suite à un stimulus sinusal (partie haute) réalisant un substrat pour le développement d'une réentrée. **B,** Théorie du cercle dominant où la réentrée présente un front d'activation suivi par une période réfractaire absolue puis relative, et une période de GAP succédant la PRR et précédant le front d'activation permettant la manipulation de la réentrée (Maintien ou arrêt). **C,** Exemple de réentrée en forme de 8 avec une zone de conduction lente, comme pouvant l'être dans une cicatrice d'IDM par exemple. **D,** Le phénomène de réflexion qui consiste à la transmission électrotonique (flèches en pointillés) de l'influx électrique de part et d'autre d'une barrière de conduction (*Figures revues à partir de L'essentiel de la rythmologie par A.Leenhardt et al. Edition 2012*) (GAP: zone de nouveau excitable; IDM: Infarctus Du Myocarde; PRA: Période Réfractaire Absolue; PRR: Période Réfractaire Relative).

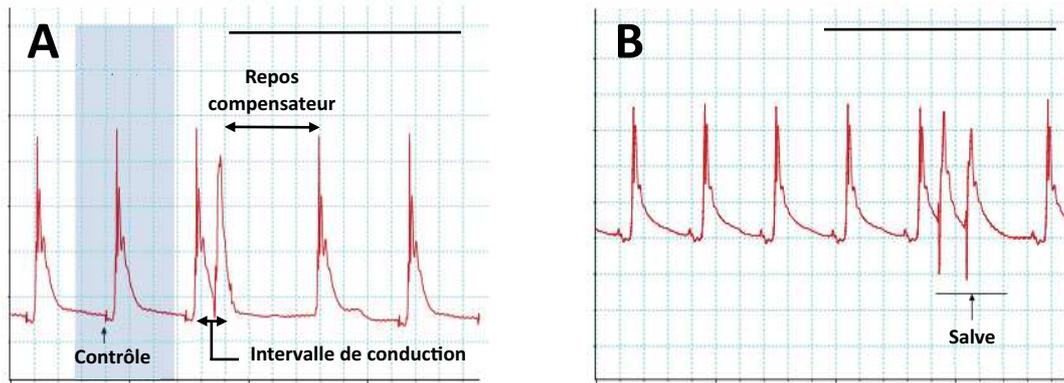
Le maintien d'une réentrée va dépendre de l'évolution au cours du temps des propriétés électrophysiologiques du myocarde, notamment les durées du PA associées aux périodes réfractaires, mais aussi d'autres facteurs, comme le système nerveux autonome, la prise de médicaments, les facteurs environnementaux (kaliémie, calcémie) ou génétiques.

### *I-5-2-3 Les arythmies ventriculaires et les mécanismes associés à leur genèse*

Une **extrasystole ventriculaire ou ESV** (Figure 16A) se définit comme un complexe ventriculaire dont la forme va être différente en terme de voltage/hauteur ou de durée/largeur par rapport au complexe précédent d'origine sinusale. Une ESV est le plus souvent précoce par rapport au rythme sinusal. Si elle est tardive, elle peut être précédée par une onde P sinusale (Curtis et al., 2013).

Une ESV présente généralement un QRS large caractéristique d'une conduction lente du myocarde ventriculaire. Une conduction rétrograde est néanmoins possible jusqu'aux oreillettes à l'origine de l'apparition d'une onde P' dite rétrograde qui apparaît suite à l'ESV. Les ESVs vont être le résultat de différents mécanismes arythmogènes, soit issus de parasystoles vraies (activités ectopiques indépendantes du rythme sinusal intervenant à intervalles réguliers) reflétant un automatisme anormal protégé des influences du rythme sinusal, soit issus des réentrées, d'activités déclenchées (EAD ou DAD) ou d'automatisme anormal par interaction électrotonique conduisant à des ESVs couplées plus ou moins aux complexes ventriculaires d'origines sinusaux (Leenhardt et al., 2005). Plusieurs types d'ESV, ayant plus ou moins de répercussions sur le rythme sinusal, sont décrites. On parle : 1) d'**ESV avec un repos compensateur**, lorsqu'une ESV, du fait de sa prématurité, peut bloquer la conduction d'un complexe ventriculaire d'origine sinusale et donc conduire à une diastole plus longue que la normale, 2) d'**ESV décalante**, lorsqu'une ESV présente un intervalle de temps avec le complexe suivant proche de l'intervalle sinusal normal et peut donc légèrement modifier le rythme cardiaque, et 3) d'**ESV interpolée**, plus rare et survenant pour des fréquences sinusales relativement lentes, c'est à dire qu'une ESV s'intercale entre deux complexes d'origine sinusale s'en modifier leur position et donc s'ajoute au rythme sinusal préexistant (Leenhardt et al., 2012).

Une ESV (Figure 16A) peut aussi être caractérisée par d'autres paramètres comme : 1) **Sa morphologie** qui dépend du point de départ de l'ESV et dont le caractère monomorphe (une seule forme) ou polymorphes (plus de deux formes différentes) apporte une valeur pronostic favorable dans le cas d'ESV monomorphes ; 2) **Son intervalle de couplage**, c'est à dire la distance de l'ESV par rapport au complexe sinusal précédent, dont la dangerosité est plus grande lorsque cet intervalle est plus court. Quand l'ESV apparaît au sommet de l'onde T du complexe précédent, on parle de phénomène R/T. Cet intervalle peut être soit fixe, pouvant être l'indicateur d'une réentrée ou d'une activité déclenchée à l'origine de l'ESVs, soit variable déclenchant un phénomène de parasystole avec un intervalle inter-extrasystolique fixe ou multiple d'un intervalle fixe ; 3) **Son incidence et ses circonstances d'apparition** observables par un suivi Holter permettant le compte des ESVs sur de longues périodes ; 4) **Sa rythmicité** dont le bigénisme, le trigénisme ou le quadrigénisme étant l'apparition d'une ESV tous les 1, 2 ou 3 complexes sinusaux respectivement ; 5) **Sa répétitivité** où l'on parle de salve à partir de 2 ou 3 ESV consécutives (Figure 17B) (Curtis et al., 2013 ; Leenhardt et al., 2012).



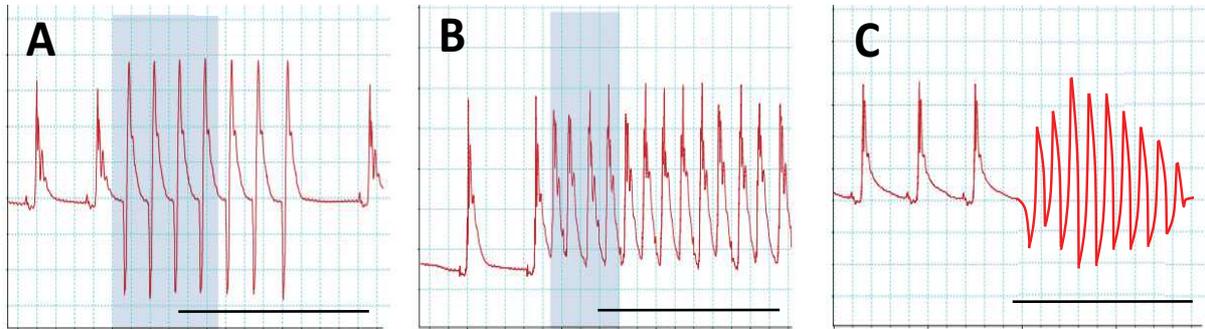
**Figure 16: Les extrasystoles ventriculaires.** **A**, Une extrasystole ventriculaire (ESV) avec un intervalle de conduction court et la période de repos compensateur. **B**, Une salve d'ESV. Les arythmies ventriculaires présentées ont été induites chez le rat par une ischémie régionale par ligature de coronaire d'un cœur isolé et perfusé *via* un système Langendorff. La barre noire en haute à droite de chaque figure représente une unité de temps de 1 seconde (*Figures modifiées à partir de M.J Curtis et al. 2014*).

Selon les conventions de Lambeth revues en 2013, une **tachycardie ventriculaire ou TV** est une séquence minimale de 4 complexes ventriculaires successifs (Curtis et al., 2013). Plus précisément, les TV sont classées selon trois critères : 1) **Leur stabilité**. On parle de TV stable ou soutenue lorsqu'elle dure au moins 30 secondes. Dans le cas contraire, la TV est définie comme instable ou non soutenue ; 2) **Leur morphologie**, soit, avec un aspect unique, la TV monomorphe, soit dimorphe et alternante ou polymorphe, la TV polymorphe ; 3) **Leur mode de survenue** qui peut être aigu, comme dans le cas de la phase aiguë de l'IDM ou une intoxication médicamenteuse, soit chronique comme dans le cas de cardiomyopathies chroniques (Leenhardt et al., 2012).

Les **TV monomorphes** (Figure 17A), la forme la plus représentée et la moins compliquée, sont le plus souvent régulières. Elles sont formées d'une succession de complexes ventriculaires déformés et élargis par rapport aux complexes d'origine sinusale. L'intervalle de conduction, l'amplitude et la forme des complexes des TV sont constants (Curtis et al., 2013 ; Leenhardt et al., 2005).

Selon les conventions de Lambeth, les **TV polymorphes** (Figure 17B), plus complexes, présentent une modification progressive d'au moins un paramètre parmi l'intervalle de conduction, l'amplitude et la formes des complexes formant la TV (Curtis et al., 2013). Il existe différentes formes de TV polymorphes: 1) **Les Torsades de Pointes (TdP) vraies** (Figure 17C) qui se caractérisent par un intervalle de couplage long du premier complexe par rapport aux complexes sinusaux qui ont la caractéristique, pour ce type de TV, de présenter d'importants troubles de la repolarisation avec un allongement de l'intervalle QT. Leur survenue est souvent annoncée par des ESV isolées, bigémées ou non. Elles sont, dans la plupart des cas, non stables et récidivantes avec une évolution possible vers la fibrillation ventriculaire. La morphologie et l'amplitude des complexes QRS varient progressivement pour décrire des sortes de torsions autour de la ligne isoélectrique qui inversent

périodiquement le sens des pointes de l'ECG. 2) Les **autres formes de TV polymorphes** débutent, elles, par un couplage court avec le dernier complexe sinusal présentant un intervalle QT normal. Leur morphologie est variable pouvant revêtir un aspect TdP. Elles sont moins régulières que les TV monomorphes, non soutenues mais peuvent se transformer en fibrillations ventriculaires (Leenhardt et al., 2012).

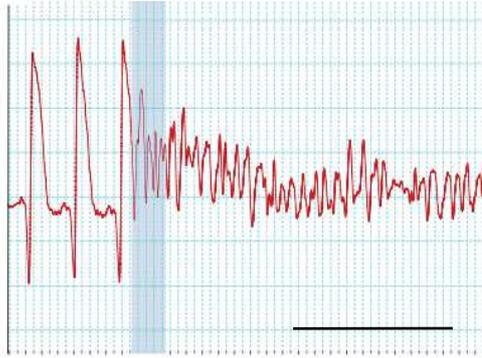


**Figure 17 : Les tachycardies ventriculaires.** A, Tachycardie ventriculaire monomorphe. B, Tachycardie ventriculaire polymorphe. C, Torsade de pointes. Les arythmies ventriculaires présentées ont été induites chez le rat par une ischémie régionale par ligature de coronaire d'un cœur isolé et perfusé *via* un système Langendorff. La barre noire en bas à droite de chaque figure représente une unité de temps de 1 seconde (*Figures modifiées à partir de M.J Curtis et al. 2014*).

La survenue de TV repose aussi essentiellement sur deux composantes, la présence d'un substrat et de facteurs déclenchants. **Le substrat** correspond à la présence d'une zone plus ou moins étendue du myocarde dont les propriétés électrophysiologiques, notamment la conduction et les périodes réfractaires, sont modifiées par des situations pathologiques comme l'ischémie, la fibrose, l'hypertrophie, la dysplasie ou le simple étirement du myocarde. A ce substrat anatomique pouvant être latent à l'état basal, **des facteurs déclenchants** s'ajoutent et sont à l'origine du caractère spontanée des TV. Parmi eux, les ESV, le facteur le plus fréquent, peuvent intervenir 1) directement par la création un bloc unidirectionnel dans un circuit potentiel de réentrée ou la potentialisation de post dépolarisations tardives par surcharge calcique, ou 2) indirectement avec le délai post ESV par la modification des périodes réfractaires au niveau du substrat pouvant créer une séquence de cycle long-cycle court présentant un pouvoir arythmogène important. D'autres facteurs existent comme le système nerveux autonome, la déplétion en  $K^+$  et en  $Mg^{2+}$  ou certains médicaments. Dans le cas des TdP, leur initiation est en lien avec des post dépolarisations précoces dont la survenue peut être d'origine génétique ou acquise (Leenhardt et al., 2012).

La **fibrillation ventriculaire ou FV** (Figure 18) est, selon les conventions de Lambeth, une séquence minimale de 4 complexes ventriculaires successifs avec un intervalle de conduction, une amplitude et une forme variant au cours du temps. Ces différents traits la différencient très clairement des TV (Curtis et al., 2013). La FV se caractérise sur le plan électrocardiographique par une activité électrique désorganisée conduisant à une totale inefficacité hémodynamique du cœur. Elle est

pratiquement toujours irréversible sous sa forme spontanée expliquant qu'elle soit la principale cause de mort subite de type rythmique (Leenhardt et al., 2012).



**Figure 18: La fibrillation ventriculaire.** Cette arythmie été induite par une ischémie régionale par ligature de coronaire d'un cœur de rat isolé et perfusé *via* un système Langendorff. La barre noire, en bas à droite de la figure, représente une unité de temps de 1 seconde (*Figure modifiée à partir de M.J Curtis et al. 2014*).

Une FV nécessite l'atteinte d'un seuil correspondant à l'intensité de courant nécessaire pour déclencher une FV lorsque le stimulus est appliqué dans un intervalle de temps spécifique appelé la période vulnérable. Cette période correspond au moment du cycle cardiaque où l'hétérogénéité des périodes réfractaires est maximale, soit le somme de l'onde T. Ce seuil est d'autant plus bas et la vulnérabilité du myocarde d'autant plus grande que cette hétérogénéité est importante. Son maintien va dépendre de la masse fibrillante et des périodes réfractaires. Il sera plus probable lorsque la première sera grande et les secondes seront courtes (Leenhardt et al., 2012).

Comme pour les TV, le développement d'une FV repose sur la présence d'un substrat et d'un facteur déclenchant. Le substrat d'une FV est le développement de multiples circuits de micro-réentrées qui se développent, se modifient et disparaissent dans une certaine portion du myocarde *via* des modifications des périodes réfractaires des fibres faisant suite à de nombreux mécanismes comme la régulation des connexines impactant la conduction, l'étirement ou encore une surcharge en catécholamines. Les facteurs déclenchants peuvent être 1) **la survenue d'une ESV** au court de la période vulnérable du myocarde ou *via* une séquence de cycle long-cycle court comme dans le cas des TV, ou 2) **une salve d'ESV**, une TV monomorphes ou polymorphes ou encore une TdP (Leenhardt et al., 2012).

### *I-5-3- Les origines et les cinétiques d'apparition des arythmies ventriculaires suite à une ischémie du myocarde*

Les arythmies ventriculaires sont des complications reconnues d'un IDM en phase aiguë. Les changements électrochimiques engendrés par l'ischémie vont conduire au développement d'arythmies ventriculaires qui affectent 2 à 20% des patients présentant un IDM aigu (Piccini et al., 2008). Les arythmies ventriculaires létales, telles que la tachycardie ventriculaire (TV) soutenue ou la fibrillation ventriculaire (FV), sont des causes immédiates de mort subite cardiaque (Di Diego et al., 2011).

Une phase précoce d'arythmies, se manifestant par des TV polymorphiques et des FV, est observée dans 10% des cas hors de l'hôpital., Les patients sont généralement des hommes jeunes, fumeurs, avec aucun antécédent d'angine de poitrine, et admis pour un IDM-ST+ (Kolettis et al.,

2013). Comme la conversion spontanée du FV vers un rythme cardiaque non létal est rare, le développement d'une FV, dans 95% des victimes hors de l'hôpital, aboutie dans les minutes qui suivent à la mort du patient (M. Di Diego et al, 2011).

A partir de modèles animaux de mort subite cardiaque par une ischémie régionale, les informations étant difficilement disponibles chez l'homme, il a été clairement mis en évidence l'existence de différentes phases cliniques d'arythmies ventriculaires identifiables et distinguables dans le temps. Ces différentes phases sont initiées par des mécanismes différents qui vont être liés à l'évolution des propriétés du myocarde au cours du temps, à la sévérité de l'ischémie et à la prise en charge du patient.

**La phase 1** va correspondre à des arythmies associées aux effets réversibles de l'ischémie. **La phase 2** va correspondre à une période où les arythmies vont être associées à l'évolution de l'infarctus suite aux dommages irréversibles causés par une ischémie prolongée ou aux mécanismes déclenchés suite à la reperfusion des zones ischémisées (Clements-Jewery et al., 2005 ; Di Diego et al., 2011). Enfin, une dernière phase, **la phase 3**, va comprendre toutes les arythmies associées à la mise en place et à la maturation de la cicatrice myocardique suite à un infarctus récent et toutes les arythmies associées à la présence de la cicatrice d'un infarctus plus ancien (Luqman et al., 2007).

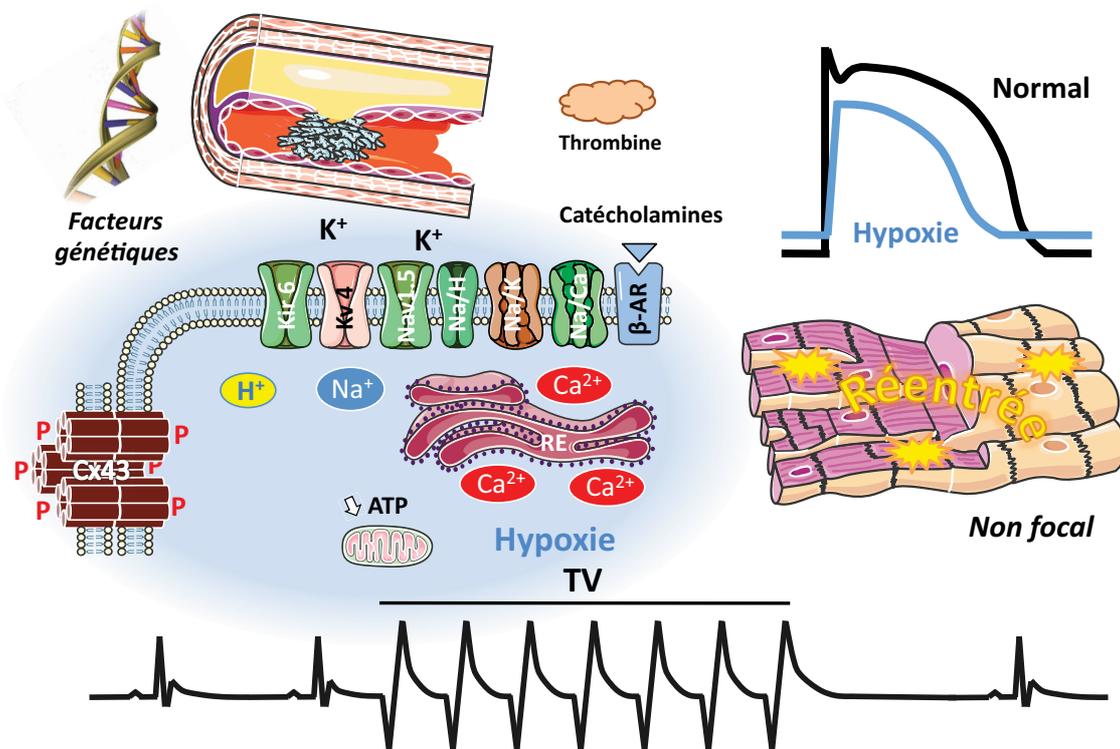
### *I-5-3-1 Les arythmies ventriculaires de la phase 1 de l'IMA*

La phase 1 a lieu durant les 2 à 30 premières minutes suite à l'ischémie induite par une occlusion partielle ou totale de l'artère coronaire. Elle peut être divisée en 2 sous phases appelées, phase 1a (2-10 minutes) et 1b (15-30 minutes) se différenciant par les mécanismes à l'origine des arythmies ventriculaires observées dans chacune d'elles (Di Diego et al., 2011). La bi modalité de la phase 1 n'est pas conservée entre les espèces. Pour l'instant, à partir de nombreuses expérimentations d'ischémie réalisées chez des animaux conscients ou anesthésiés, ou à partir de cœurs isolés perfusés, 2 pics précoces d'arythmies ventriculaires ont été observés chez le chien et le porc, et seulement 1 pic entre 15 et 20 minutes a été mis en évidence chez le rat et le lapin (Curtis et al., 1998 ; de Groot et al, 2004). Il est estimé qu'approximativement 50% des morts subites cardiaques enregistrées chez l'homme ont lieu durant la phase 1 de l'IMA (Di Diego et al., 2011).

#### *- Les arythmies de la phase 1a : origines, mécanisme et type*

Dans les 2 minutes suite à une ischémie, la perte d'oxygène conduit à une baisse de la synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale et à une acidification du milieu intracellulaire par une accumulation de produits de la glycolyse anaérobie dont l'acide lactique. Ceci a pour conséquences **une levée d'inhibition des canaux potassiques sensibles à l'ATP**, nombreux dans la membrane plasmique, et **une inhibition de la pompe Na/K ATPase** provoquant une redistribution progressive des ions potassiques du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Comme il est reconnu, le potentiel de membrane de repos  $V_m$ , est déterminé, de la

manière simple, par le rapport de concentration extracellulaire et intracellulaire en ions  $K^+$ . Dans ces conditions, une hyperkaliémie induite par l'ischémie va conduire à un déplacement du  $V_m$  vers des valeurs plus dépolarisées (Akar et al., 2007) (Figure 19).



**Figure 19: Les arythmies de la phase 1a suite à une ischémie du myocarde.** Cette figure reprend les grandes résultantes métaboliques et ioniques au niveau cellulaire ainsi que les modifications électrophysiologiques mises en évidence par une variation caractéristique du potentiel d'action qui vont expliquer des baisses d'excitabilité et de conduction de l'influx électrique au niveau du myocarde sous ischémie suite à des phénomènes de réentrées non focalisés générant des phénomènes de tachycardie ventriculaire (TV). (*ATP* : Adénosine Tri Phosphate;  $Ca^{2+}$  : ion calcium; *Cx43* : Connexine 43;  $K^+$  : ion potassium; *RE* : Réticulum Endoplasmique; *TV* : Tachycardie Ventriculaire).

La **dépolarisation du potentiel de membrane de repos** induite par l'ischémie va conduire à une inactivation partielle des canaux sodiques voltage-dépendant Nav1.5 provoquant une réduction de l'excitabilité des cardiomyocytes dans la zone sous ischémie. Ces perturbations se traduisent par des diminutions de la vitesse, de l'amplitude et de la conduction du PA dans le myocarde. Ces deux phénomènes vont être le substrat pour la formation de bloc de conduction, un pré-requis pour l'induction de réentrées arythmiques (Akar et al., 2007). De plus, il a été récemment décrit une augmentation de courant sodique tardif  $I_{Na,Late}$  au cours de la phase 1, à l'origine de la prolongation initiale du PA suite à une ischémie (Di Diego et al., 2011). A son tour, la baisse de l'amplitude du PA par la modulation des canaux sodiques va impacter différents courants membranaires voltage-dépendant activés au cours des phases 1 et 2 du PA, comme  $I_{to}$  ou  $I_{Ca}$ . L'ischémie peut moduler le courant  $I_{to}$  par différents mécanismes : 1) **Par la réduction de l'amplitude du PA**, en effet, les canaux

responsables d' $I_{to}$  vont être activés dans une gamme de potentiels moins dépolarisés que la normale conduisant à une baisse du recrutement des canaux  $K_v$  en lien avec leur courbe I/V ; 2) **Par les changements d'environnement cellulaire** liés aux désordres métaboliques induit par l'ischémie, notamment l'hypoxie et l'acidose, qui vont réduire directement le courant  $I_{to}$  en terme d'activité et d'expression ; 3) **Par une réduction plus rapide de  $I_{to}$  dans les cellules de l'épicarde** par comparaison à l'endocarde provoquant une dispersion transmurale de la repolarisation. Cette dernière modulation serait le substrat de réentrée dite de phase 2 et d'un circuit de réentrée transmural qui pourraient être impliqués dans les arythmies de la phase 1a (Akar et al., 2007) (Figure 19).

L'**acidification du pH intracellulaire**, résultant de l'accumulation de métabolites issus de la glycolyse anaérobie faisant suite à l'ischémie, stimule la pompe  $Na^+/H^+$ . L'extrusion des protons par cette pompe va provoquer progressivement une surcharge sodique intracellulaire. Puis, une surcharge calcique va avoir lieu secondairement *via* la réversion de l'activité de la pompe NCX pour restaurer et prévenir cette augmentation des niveaux intracellulaires en  $Na^+$  (Akar et al 2007). Cette surcharge calcique va permettre une élévation de la probabilité d'événements spontanés de libération de  $Ca^{2+}$  au niveau du réticulum endoplasmique (RE) qui vont augmenter à leur tour la probabilité de génération de DADs suite à ces vagues calciques (Akar et al 2007). Cette situation « entre l'acidification du milieu intracellulaire et la régulation du calcium », comme mécanisme à l'origine des arythmies au cours de l'ischémie, reste à être clarifiée car elle n'a été étudiée principalement que dans des conditions de normoxie. Cependant, en règle générale, les changements de l'homéostasie calcique sont décrits pour former des éléments déclencheurs d'arythmies, au niveau cellulaire. En revanche, dans des conditions appropriées, ces changements peuvent conduire au maintien d'une arythmie au niveau de l'organe (Akar et al.,2007) (Figure 19).

Par ailleurs, il a été décrit que les occlusions d'origine thrombotique étaient associées à une incidence plus élevée de TV et FV au cours de la phase 1a. En effet, la thrombine a été associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en sodium, générant des activités déclenchées, comme les EAD ou DAD, par 1) **son activation de la phospholipase A2** provoquant l'accumulation de lysophosphatidylcholines dans la membrane des cardiomyocytes qui augmenterait la concentration intracellulaire de sodium par un ralentissement de l'inactivation des canaux  $Nav1.5$ , et 2) **une activation de l'échangeur  $Na/H$**  (Luqman et al., 2007) (Figure 19).

Une des premières réponses à la lésion myocardique et aux altérations de charge du cœur est l'**activation du système nerveux autonome sympathique** (Florea et al., 2014). En réponse à l'ischémie aiguë, la libération excessive de catécholamines va augmenter la survenue d'arythmies au cours de la phase 1a en participant à la formation de TV (Luqman et al., 2007) (Figure 19).

A partir de ces conditions métaboliques, ioniques et électrophysiologiques initiées par l'ischémie, la **baisse de l'excitabilité et de la conduction**, et l'**hétérogénéité spatiale et temporelle des durées des PA et des périodes réfractaires**, formant un bloc fonctionnel, vont être les substrats à

l'origine de circuits de réentrées. En présence de ces substrats et de la genèse d'un élément déclencheur comme une ESV, les arythmies de la phase 1a, dans la grande majorité des cas, se manifestent par des bouffées de TV qui évoluent rarement vers une FV et dont l'origine est non focalisée. Ces observations ont été mises en évidence par des études *in vivo* de cartographie de l'activation du myocarde montrant initialement des électrogrammes continus et localement fragmentés suggérant des rentrées qui ne semblent pas avoir d'origine focalisée (Di Diego et al., 2011).

Les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels ne sont pas en mesure d'identifier les patients ischémiés avec un risque de développer une FV. Une composante héréditaire dans la détermination du risque à développer des FVs ou de mort subite cardiaque durant un IDM est bien établie (Dekker et al., 2006). Néanmoins, le progrès sur la compréhension des déterminants génétiques et moléculaires des FV induites par l'ischémie reste limité. C'est pourquoi la prédiction et la prévention de mort subite cardiaque, comme la compréhension des mécanismes moléculaires des arythmies, restent un enjeu majeur et crucial pour lequel de nouvelles stratégies sont nécessaires (Marsman et al., 2014). Des études d'association génétique réalisées à partir de populations pathologiques définies, appelée GWAS, commencent à être de plus en plus réalisées afin d'identifier des gènes de susceptibilité directe ou indirecte pour la survenue d'arythmie. Pour exemple, Bezzina et ses collaborateurs ont identifiés, à partir d'une population de patients en phase aiguë de l'IDM un variant commun pour un récepteur viral impliqué dans la myocardite et la cardiomyopathie dilatée. Cette susceptibilité a été validée à partir d'animaux transgéniques (Bezzina et al., 2010 ; Marsman et al., 2014).

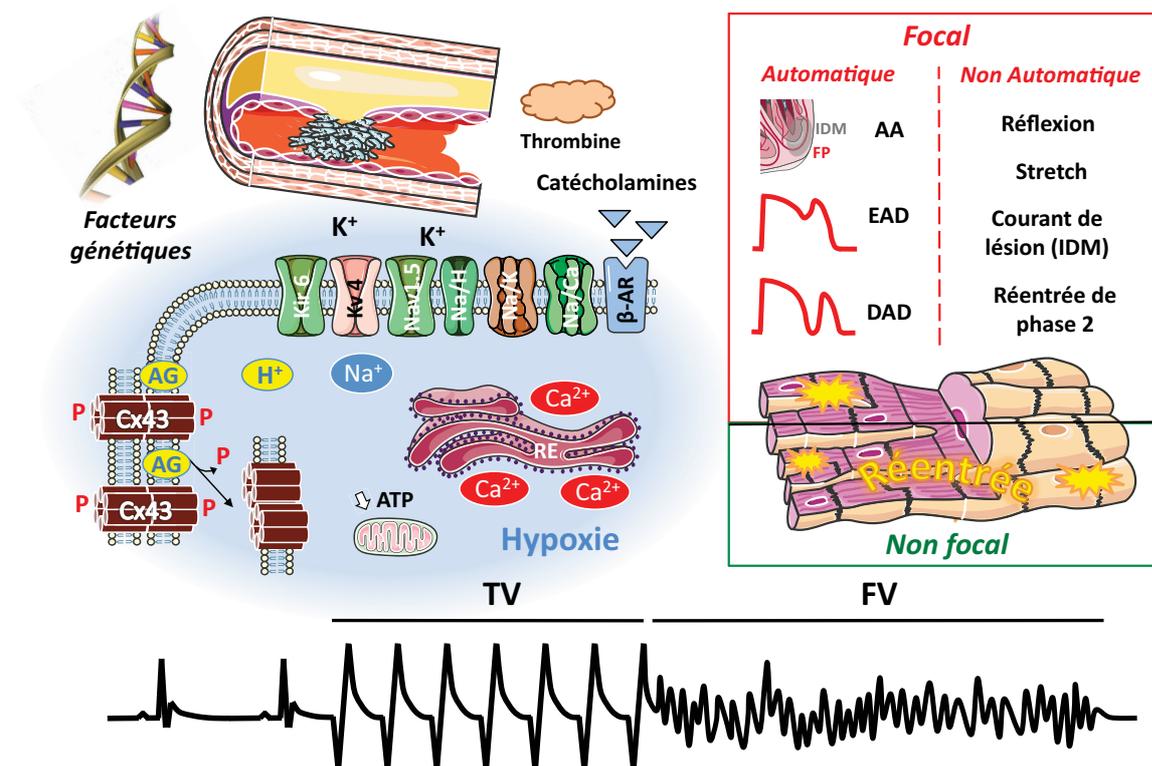
### *- Les arythmies de la phase 1b : origines, mécanismes et différents types*

Comme mentionné auparavant, la distinction entre les deux parties de la phase 1 se fait selon un critère de temps, mais aussi suivant la différence de mécanisme à l'origine des arythmies. La phase 1b va comprendre les mêmes conditions métaboliques, ioniques et électrophysiologiques initiées au cours de la phase 1a, notamment l'augmentation de la concentration extracellulaire en  $K^+$ , les surcharges sodique et calcique, l'acidose et les régulations de canaux ioniques. Ces dernières, avec leur évolution, et l'apparition de nouveaux facteurs vont être à l'origine des arythmies associées à cette phase (Figure 20). Cependant les mécanismes expliquant les arythmies de la phase 1b ne sont pas encore bien établis.

Les différences électrophysiologiques induites dans les cellules touchées lors de l'ischémie, notamment la dépolarisation du potentiel membranaire de repos et les différences de repolarisation avec les cellules normales, vont être l'origine d'un **courant dit de lésion** identifiables à l'ECG par des modifications des segments T-Q et S-T respectivement en diastole et systole. En effet, les cellules ischémiques, présentant une activité électrique ralentie, vont être à l'origine de la diffusion d'un courant, par une transmission électronique au travers de cellules dépolarisées non excitables, qui va

atteindre des cellules normales repolarisées ou au cours de la repolarisation. Ce courant de lésion va jouer un rôle dans l'induction d'arythmies ventriculaires au niveau de la zone bordant l'ischémie soit par **la génération d'activités déclenchées**, soit par **une nouvelle excitation** indépendante du rythme sinusal (Janse et al., 1989).

Comme vu au cours de la phase 1a, l'ischémie myocardique est associée à de fortes accumulations de noradrénaline et d'adrénaline dans le tissu dont le dosage a notamment été étudié chez le porc. Des augmentations d'un facteur 30 à 10 minutes et de 500 à 60 minutes suite à l'ischémie ont ainsi été observées (Lameris et al., 2000). Au cours de la phase 1b, cette accumulation de noradrénaline, par un mécanisme de réversion de la recapture neuronal, va être un élément majeur dans la survenue des arythmies ventriculaires. Notamment après 20 à 30 minutes d'ischémie, une élévation des taux de noradrénaline va conduire à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, facilitant l'apparition d'EAD et DAD (Luqman et al., 2007). De plus, la stimulation sympathique au cours de l'ischémie va également avoir pour effet d'augmenter la lipolyse tissulaire (Kolettis et al., 2013) qui va avoir des conséquences notamment sur le couplage cellulaire (Figure 20).



**Figure 20: Les arythmies de la phase 1b suite à une ischémie du myocarde.** Cette figure reprend les grandes variations métaboliques, ioniques et électrophysiologiques au niveau cellulaire. Les différentes origines focalisées et non focalisées des arythmies, comme la TV ou la FV, sont aussi indiquées. (AA: Automaticité Anormale; AG: métabolites des Acides Gras; ATP: Adénosine Tri Phosphate;  $Ca^{2+}$ : ion calcium; Cx43: Connexine 43; DAD: Post dépolarisation tardive; EAD: Post dépolarisation précoce; FP: Fibres de Purkinje; FV: Fibrillation Ventriculaire; IDM: Infarctus Du Myocarde;  $K^+$ : ion potassium; RE: Réticulum Endoplasmique; TV: Tachycardie Ventriculaire).

Au cours de l'ischémie, le **découplage cellulaire** semble être une cause importante. En effet, l'incidence pour la survenue d'arythmies la plus élevée est enregistrée lors du processus de découplage cellulaire mis en évidence par une augmentation de la résistance tissulaire d'environ 50% mettant en cause indirectement un découplage des jonctions GAP (Cascio et al., 2005 ; de Groot et al., 2004). Bien que de nombreux facteurs changent simultanément au cours de la phase aiguë d'une ischémie, un certain nombre de facteurs ont été identifiés comme étant capables de découpler les jonctions GAP. Ces jonctions GAP peuvent être régulées par de nombreux métabolites accumulés comme les ions H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, l'acide arachidonique, les acyl-carnitines à longue chaîne, les lysophosphoglycérides ou l'ATP (Cascio et al., 2005). L'augmentation de la concentration diastolique en Ca<sup>2+</sup>, induite par la surcharge calcique, a été associée au découplage des jonctions GAP car elle précède ce dernier, et conduit à une baisse de la conduction et à la formation de bloc de conduction. L'acidification intracellulaire induite par l'ischémie génère une baisse de la conductance des jonctions GAP et à une augmentation de leur sensibilité à l'élévation de la concentration calcique diastolique. L'augmentation du métabolisme des lipides, induite par les catécholamines, conduit quant à lui à l'accumulation de plusieurs métabolites, comme les lysophosphoglycérides et l'acide arachidonique, au niveau des disques intercalaires, après quelques minutes d'ischémie provoquant la baisse de la conductance des jonctions GAP. Enfin, une déphosphorylation progressive des Cx43 conduit à une internalisation de ces dernières dans un pool intracellulaire sous la membrane (Beardslee et al., 2000) (Figure 20).. Ces observations montrent que la privation en énergie, conduisant aux modifications de pH, de concentrations en Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et en métabolismes, est en lien direct avec le découplage des jonctions GAP (de Groot et al., 2004).

L'association entre l'augmentation de l'incidence des arythmies et la résistance tissulaire suggère que le découplage électrique intercellulaire induirait une hétérogénéité électrophysiologique. Ce découplage serait un déterminant critique pour la formation d'un substrat à l'origine de l'initiation et du maintien de FV (Cascio et al., 2005). Cependant les mécanismes, par lesquels le découplage des jonctions GAP conduisait à un ralentissement de la conduction et la génération des arythmies dans une région du cœur sous ischémie, ne sont pas encore complètement élucidés. En effet, le découplage va avoir des conséquences à la fois fonctionnelles et structurales. Dans le premier cas, il va être à l'origine de la mise en place d'une hétérogénéité de conduction du myocarde, notamment *via* un ralentissement des zones viables sous épocardiques et endocardiques. Ceci a lieu *via* une transmission électrotonique à partir des zones dépolarisées et mourantes, ou par l'occurrence de micro-réentrées liées à de petits ralentissements de la conduction. Sur le plan structural, la perte d'expression au niveau des disques intercalaires de la Cx43 va modifier les conductions transversales et longitudinales pouvant avoir des répercussions différentes sur la survenue d'arythmie (de Groot et al., 2004).

Le rôle des récepteurs sensibles à l'étirement, ou « stretch » en anglais, dans la facilitation des arythmies commence à être bien documenté. En effet, en 2002, Coronel et ses collaborateurs ont

montré, à partir d'un modèle de cœur de porc isolé et perfusé, que l'étirement mécanique exercé par la zone viable du myocarde sur la zone ischémisée pouvait induire des ESV préférentiellement au niveau de la zone bordant l'infarctus, à l'origine des FV durant la phase 1b (de Groot et al., 2004 ; Luqman et al., 2007). En effet, un étirement aigu et soutenu peut dépolariser, au cours de la diastole, les potentiels de membrane de repos des fibres de Purkinje et du myocarde, bordant la zone sous ischémie, induisant ainsi la génération d'un courant entrant à l'origine d'activités déclenchées de type DAD responsables de l'apparition d'ESV (Janse et al., 1989 ; Janse et al., 2003). En revanche au cours de la systole, le même étirement aigu peut raccourcir les durées du PA et des périodes réfractaires, par des régulations de l'activation du courant  $I_{KATP}$  et de la composante lente de  $I_{KS}$ , et les courants sortants des canaux sensibles à l'étirement. En conséquence, cette zone va pouvoir de nouveau être excitée plus rapidement (Janse et al., 2003). Donc, en résumé, l'étirement peut augmenter l'automatisme anormal et la génération d'activités déclenchées, deux éléments fortement initiateurs d'arythmies (Luqman et al., 2007) (Figure 20).

La régulation anormale de l'**homéostasie calcique**, initiée au cours de la phase 1a et liée à l'élévation de la concentration calcique intracellulaire associée aux modifications électrophysiologiques et à la libération massive de catécholamines, va être impliquée, avec les altérations de la conduction, dans la genèse de réentrées arythmiques provoquée par des alternances et/ou des vagues en spirale de la durée des PA pouvant conduire le cas échéant à la transformation d'une TV vers une FV (Akar et al., 2007) (Figure 20).

En conséquence, les arythmies de la phase 1b semblent émerger à la fois de sources focalisées ou non focalisées (Figure 20). Les **sources focalisées** vont avoir 1) des origines automatiques, telles que les EAD, les DAD ou une automaticité anormale liée à la libération de catécholamines, ou 2) non automatiques comme l'étirement, les courants de lésion liés à la zone ischémisée, les réentrées de phase 2 du PA et les phénomènes de réflexion liée aux hétérogénéités de repolarisation, pouvant tous provoquer la génération d'ESV niveau de la zone bordant l'infarctus. Les **sources non focalisées** sont généralement des phénomènes de réentrées secondaires au découplage électrique intercellulaire provoquant une conduction retardée.

Comparées à celles de la phase 1a, elles vont plus fréquemment évoluer vers le développement de FV, car elles ont lieu au moment où le développement de la surcharge calcique s'associe à une augmentation de la résistance longitudinale de myocarde liée au découplage des jonctions GAP. Ces deux phénomènes conduisent à une hétérogénéité électrophysiologique propice à la genèse et au maintien des fibrillations ventriculaires (Carmeliet, 1999 ; Cascio et al., 2005).

Contrairement à celles de la phase 1a, les arythmies ventriculaires de la phase 1b peuvent être retardées par des techniques de pré-conditionnements ischémiques ou pharmacologiques, à l'origine d'approches préventives contre la mort subite induite par une ischémie du myocarde. Néanmoins, la phase 1 présente un intérêt majeur car plus de la moitié des décès par mort subite, attribuée à

l'ischémie, a lieu lors de cette phase. Cependant, il est difficile d'étudier les mécanismes d'arythmies au cours de cette phase chez l'homme et d'extrapoler, chez ce dernier, l'existence des phases 1a et 1b observées au cours des expérimentations animales. C'est pourquoi, au cours de cette phase 1, il reste difficile de prédire et prévenir les arythmies développées et de mettre en place des stratégies thérapeutiques optimales (Luqman et al., 2007).

### *I-5-3-2 Les arythmies ventriculaires de la phase 2 de l'IMA*

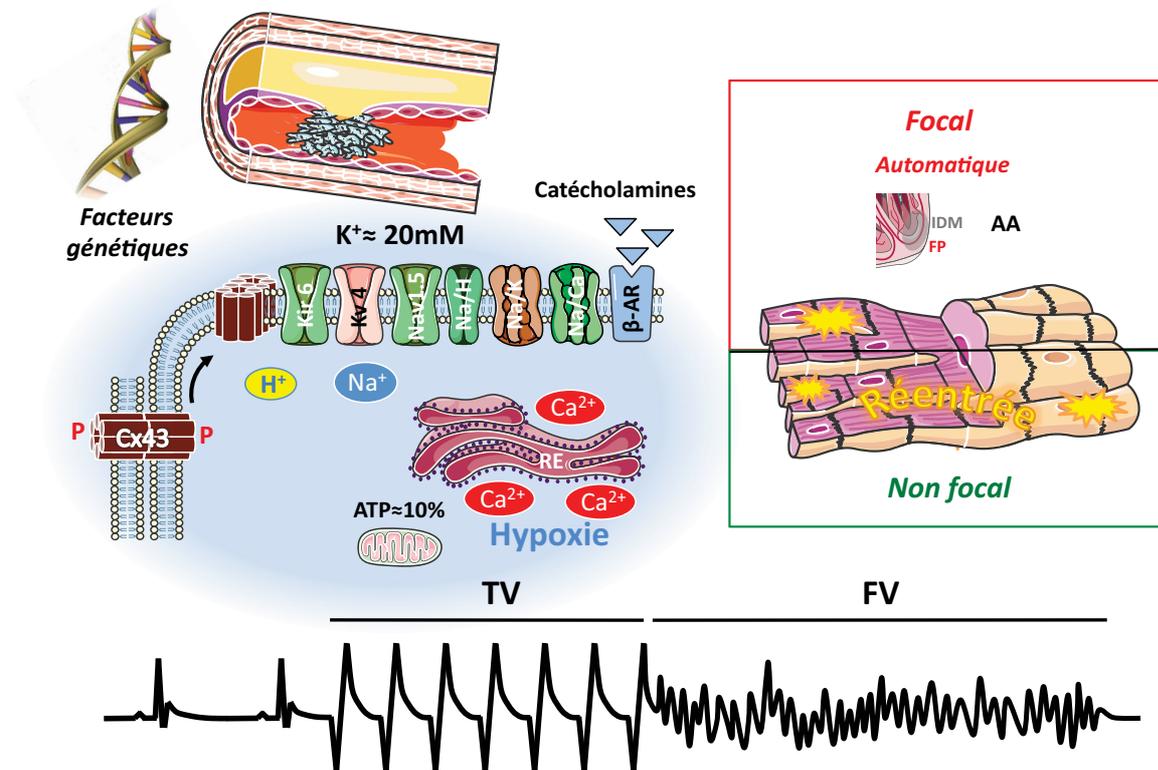
Durant les dernières décennies, de nombreux modèles animaux ont été utilisés afin de caractériser la survenue des arythmies post-ischémie. Initialement un modèle de ligature en deux étapes était utilisé avec une étape d'ischémie partielle suivie d'une ischémie totale. Cependant, dans ces conditions, les chercheurs n'étaient pas en mesure de différencier les arythmies de la phase 1 et 2, l'ischémie partielle initiale pouvant être à l'origine d'un retard de la phase 1. Puis, avec la mise en place d'un modèle de ligature permanente chez le rat, il a été permis de mettre en évidence, de manière univoque, l'existence d'une seconde phase de FV. Dans ce modèle, les FV de la phase 2, apparaissant spontanément après 2 heures d'ischémie soutenue, présentent une précocité et une prévalence supérieures à celles du modèle de chien en 2 étapes de ligature de Harris en 1950. En résumé, il apparaît que la susceptibilité des FV suite à une ischémie myocardique va dépendre de composantes en lien direct avec le choix du modèle expérimental comme l'espèce, la durée d'ischémie ou l'état de conscience au cours de l'évaluation entre autres. C'est pourquoi, il est difficile de transposer ces données à une situation clinique spécifique. Mais, néanmoins, deux phases distinctes semblent coexister (Clements-Jewery et al., 2005).

A ce jour, les données de recherche restent encore insuffisantes pour générer une vue précise sur le temps et la sévérité des FV de la phase 2 entre les différentes espèces. Sur la base de la non conservation de la bi modalité de la phase 1, des différences peuvent être attendues. De plus, même si l'importance relative entre les arythmies de la phase 1 et 2 reste trouble et incertaine chez l'homme, les FV de la phase 2 ont été observées *in vivo* suite à une seule étape de ligature permanente dans de nombreuses espèces comme le rat, le chien, le porc ou le singe. Quelques données chez le rat, qui ne se transpose pas à la majorité des données à l'heure actuelle, ont montré une susceptibilité plus élevée des FV de la phase 2 par rapport à celles de la phase 1 (Clements-Jewery et al., 2005).

Ainsi, dans le cas où les arythmies de la phase 1 n'ont pas été fatales pour les patients et que la reperfusion n'a pas été réalisée au moment où les dommages engendrés par l'ischémie étaient encore réversibles, l'infarctus commence à évoluer. La phase 2 des arythmies ventriculaires va alors débiter approximativement entre 1,5 et 5 heures après l'induction de l'IDM et perdurer entre 24 à 72 heures (Di Diego et al., 2011). En effet, cette phase va coïncider avec la mise en place de l'infarctus correspondant à l'apparition de dommages irréversibles initiés au minimum après 20 minutes d'ischémie continue ou sévère et pouvant être complets après un maintien de 60 minutes (Clements-Jewery et al., 2005). Ces dommages irréversibles associés à des remodelages ioniques, métaboliques et

électrophysiologiques vont être à l'origine des arythmies de la phase 2 dont la source va pouvoir être focalisée ou non (Di Diego et al., 2011).

En ce qui concerne les circonstances métaboliques, ioniques et électrophysiologiques de la phase 2, elles vont résulter de l'évolution progressive des changements initiés au cours de la phase 1 au niveau des cellules ayant survécu (Figure 21).



**Figure 21: Les arythmies de la phase 2 suite à une ischémie du myocarde.** Cette figure reprend les grandes variations métaboliques, ioniques et électrophysiologiques au niveau cellulaire initiées au cours de la phase 1b. Les différentes origines focalisées, automatiques ou non, et non focalisées des arythmies, comme la TV ou la FV, sont aussi reprises. (AA: Automaticité Anormale; ATP: Adénosine Tri Phosphate;  $Ca^{2+}$ : ion calcium; Cx43: Connexine 43; FP: Fibres de Purkinje; FV: Fibrillation Ventriculaire; IDM: Infarctus Du Myocarde;  $K^+$ : ion potassium; RE: Réticulum Endoplasmique; TV: Tachycardie Ventriculaire).

Le contenu en glycogène étant réduit et ceux en acide lactique et en ADP intracellulaire augmentés, une cessation de la glycolyse anaérobie est observée. Cette cessation conduit à des niveaux d'ATP et de créatine de l'ordre de 10 et 2 % du niveau normal respectivement (Clements-Jewery et al., 2005).

Sur le plan ionique, la mise en place de l'infarctus peut aussi être caractérisée par l'accumulation d'ions  $K^+$  dans le milieu extracellulaire, initiée au cours de la phase 1, qui va pouvoir alors excéder les 20mM (Clements-Jewery et al., 2005). Néanmoins, cette accumulation peut aussi être hétérogène entre le centre et le bord de la région ischémie (Janse et al., 1989). En effet, dans les fibres de Purkinje isolées suite à 3 heures d'ischémie, une réduction de la concentration intracellulaire et des

activités associées au  $K^+$  ont été décrites. De plus, les cellules de l'infarctus sont aussi caractérisées par des niveaux intracellulaires élevés en  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ . Cependant, il n'est pas certain que ces changements soient suffisants et nécessaires pour induire les FV de la phase 2 (Clements-Jewery et al., 2005).

Au niveau électrophysiologique, les fibres sous endocardiques du réseau de Purkinje ayant survécu à l'ischémie vont être une des principales origines focalisées de survenue d'arythmies durant l'évolution de l'IDM dans les modèles animaux comme chez l'homme (Friedman et al., 1973 ; Spear et al., 1977 ; Janse et al., 1989 ; Clements-Jewery et al., 2005; Bogun et al., 2006). Les diffusions passives de nutriments et de gaz depuis la cavité du ventricule semblent suffire pour maintenir en vie les fibres de Purkinje, mais pas pour maintenir leurs propriétés électrophysiologiques. Ainsi, les fibres de Purkinje et les fibres musculaires, ayant survécues à l'ischémie formant la zone bordant l'infarctus, vont présenter une dépolarisation de leur potentiel de repos, des réductions de la vitesse d'ascension et de l'amplitude de leur PA. La prolongation de leur durée de PA va être à l'origine de dépolarisation spontanée diastolique et de la genèse de DAD à l'origine de l'apparition d'ESV au niveau de la zone bordant l'infarctus (Janse et al., 1989 ; Pinto et al., 1999).

Comme dans la phase 1b, l'hyperactivité des zones adjacentes à l'ischémie, en réponse à la perte fonctionnelle de la zone infarctée, va induire un étirement du myocarde qui va être à l'origine d'activités déclenchées ou d'un automatisme anormal notamment au niveau de la zone bordant l'infarctus (Janse et al., 2003).

La connexine 43, dont l'expression membranaire est diminuée au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes de la zone soumise à l'ischémie *via* une internalisation intracellulaire des héli-canaux de connexine 43 suite à une déphosphorylation initiée au cours de la phase 1b, va aussi changer de localisation. En effet, Kieken et ses collaborateurs ont montré qu'à partir de 30 minutes d'ischémie, suite à des modifications transitoires d'interactions avec ses protéines partenaires, la connexine 43 change de localisation avec une perte de son expression au niveau des disques intercalaires et un transfert vers la membrane latérale des cardiomyocytes situés au niveau de la zone sous épocardique bordant l'infarctus chez le chien. Ce mécanisme semble spécifique de la phase aiguë de l'infarctus car il n'explique pas la latérisation de la connexine 43 observée sur des stades plus tardifs (Kieken et al., 2009). De plus, toujours dans cette même zone chez le rat, il a été montré une perte de la distribution normale des jonctions GAP, des jonctions adhérentes et des desmosomes dans les 6 à 12 heures suite à l'induction de l'IDM. Une diminution de l'expression de la connexine 43 pouvant atteindre les 5% a été décrite (Takamatsu et al., 2008). Ces modifications dans la zone bordant l'infarctus vont conduire à des baisses de la conduction et, associées à des activités déclenchées, être le substrat pour la formation et le maintien de réentrées.

Les arythmies de la phase 2 peuvent être aussi liées à des dommages engendrés par des mécanismes associés à la reperfusion du myocarde suite à une période d'ischémie (Clements-Jewery

et al., 2005). Cependant, dans le cas de notre étude portant sur un modèle de ligature permanente, ces mécanismes ne sont pas mis en jeu et ne seront pas développés dans ce manuscrit malgré leur importance pour leur prévention au cours de la phase de reperfusion chez l'homme.

Des études basées, soit une approche large comme une étude génétique GWAS (Aouizerat et al., 2011), soit *via* une approche plus ciblée portant sur des gènes candidats (Adabag et al., 2010 ; Elmas et al., 2010 ; Oliva et al., 2009), mettent en évidence une susceptibilité génétique chez des patients ayant nécessité une réanimation cardiaque ou une défibrillation suite à un arrêt cardiaque associée à la présence de TV ou FV suite à un IDM. Ces patients, porteurs de polymorphismes ou de mutations pour des gènes ayant des effets cardiovasculaires connus ou non, présentent une prédisposition génétique qui, associée à des facteurs environnementaux, va être à l'origine de leur profil clinique associé à une augmentation de l'incidence et de la sévérité des arythmies, ainsi qu'un risque accru de mortalité au cours des 24 premières heures post-IDM.

### *I-5-3-3 Les arythmies ventriculaires de la phase 3*

Les arythmies de la phase 3, comme énoncé précédemment, vont comprendre 1) les troubles arythmiques au cours de la période de mise en place de la cicatrice myocardique ou 2) de la présence d'un infarctus établis associées avec une hypertrophie ou une insuffisance cardiaque.

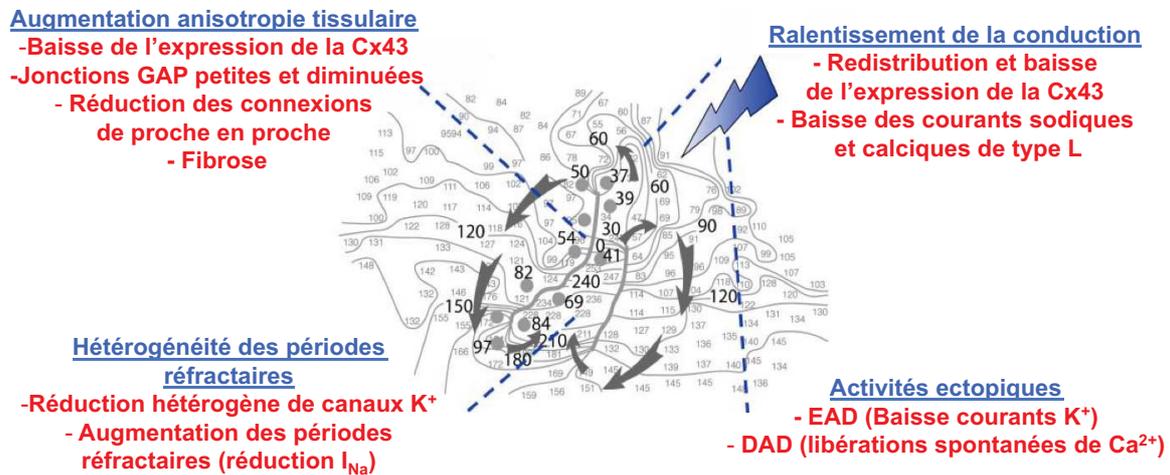
Durant un infarctus subaigu en cours de cicatrisation, de nombreux changements électrophysiologiques complexes vont avoir lieu au niveau de la zone bordant l'infarctus ainsi que dans le myocarde non atteint par l'ischémie. Ces changements sont à l'origine des substrats pour des TV ou FV (Janse et al., 1989).

En terme d'exemple, de nombreuses études ont été réalisées chez le chien au cours des 4 à 5 premiers jours suite à l'infarctus au niveau de la zone épicaudique bordant l'infarctus. Cette zone est reconnue comme présentant des anisotropies hétérogènes structurale et électrique responsables de la génération de réentrées et de TVs (Baba et al., 2005) (Figure 22).

Les cardiomyocytes ayant survécu au niveau de la zone bordant l'IDM présentent un PA avec une amplitude et une vitesse de dépolarisation réduite (Lue et al., 1992) et une limite de dépolarisation en phase 4 augmentée en plus d'une augmentation de leur durée de PA (Cabo et al., 2003). De nombreux courants potassiques sont diminués au niveau des cellules de cette zone bordante (Dun et al., 2005). Ces conditions ont été associées avec une augmentation de l'automatisme et la survenue d'EADs (Figure 22).

Ainsi, l'homéostasie du calcium est altérée dans la zone bordante et les cellules de Purkinje suite à un IDM *via* une diminution de courant  $I_{CaL}$  liée à des modifications des paramètres biophysiques (Dun et al., 2004). Pour rappel, la contraction cardiaque va être basée sur la libération de  $Ca^{2+}$  *via* le réticulum endoplasmique en réponse l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les canaux  $Ca^{2+}$  de type-L. Cette

libération va être réalisée par un récepteur canal à la ryanodine, RyR2. Or, la fonction de RyR2 est altérée après l'IDM, tandis que la fonction de l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ , permettant l'extrusion du calcium, n'apparaît pas modulée. Ces perturbations de l'homéostasie calcique induites par l'IDM vont donc favoriser l'apparition de DADs (Figure 22).



**Figure 22: Le mécanisme de la rentrée au niveau de la zone épocardique bordant l'infarctus chez le chien.** Schéma récapitulatif des différents acteurs contribuant à l'anisotropie tissulaire nécessaire au développement de réentrées et activités ectopiques pouvant initier les réentrées (Figure reprise à partir de Nattel et al. 2007) (Cx43 : Connexine 43; DAD: Post dépolarisation tardive; EAD: Post dépolarisation précoce; jonction GAP : jonction communicante).

Des anomalies de l'activation sont à l'origine d'une conduction ralentie et souvent discontinue au bord et dans la région de l'IDM. Des changements importants du courant  $\text{I}_{\text{Na}}$  au niveau de la zone bordant l'IDM, incluant une baisse de densité, une accélération de l'inactivation et un ralentissement de la réactivation du canal (Pu et al., 1997), altèrent l'excitabilité et la conduction. Ces modifications conduisent à une augmentation de la période réfractaire, facilitant les formations d'un bloc unidirectionnel fonctionnel et des réentrées. La conduction est aussi altérée *via* des diminutions de la taille et du nombre de GAP jonctions au niveau de la zone bordant l'IDM. De plus, une altération de la connexine 43 a été observée et corrélée comme un substrat pour les TV et les FV.

A partir d'études basées sur des populations, des évidences cliniques ont montré une influence génétique importante dans le risque de présenter une mort subite cardiaque (Tomaselli et al., 2004). En effet, de plus en plus d'études, isolées et limitées à de petites populations, montrent que des mutations ou des polymorphismes, plus ou moins en lien direct avec l'activité électrique du cœur, peuvent moduler l'expression et la fonction de protéines en affectant différents mécanismes comme la transcription, l'épissage alternatif, la traduction, et l'adressage de protéines entre autres. Ces altérations vont pouvoir être à l'origine de la pénétrance et de la sévérité du phénotype d'une pathologie cardiaque congénitale, ou être aussi un substrat arythmogène potentiel dans le cas de

pathologies plus communes comme, l'IDM, l'hypertrophie ou l'insuffisance cardiaque (Jagu et al., 2013). A titre d'illustration, dans une étude portant sur une petite cohorte de 13 patients présentant un IDM, le principal résultat de ce travail a été l'identification d'un variant commun, ou polymorphisme, pour le gène *KCNH2*, précédemment décrit pour augmenter le risque d'arythmies chez des patients atteints du syndrome congénitale du QT long (SQTL), avec une plus grande probabilité de développer des torsades de pointes (TdP) dans les jours qui suivent un IDM aigu. L'impact de cette prédisposition génétique dans l'apparition des TdP est établi par le fait qu'environ 85% des patients développant des TdP portent soit le polymorphisme de *KCNH2* (69%), soit d'une des 2 mutations identifiées et associées au SQTL (15%). Dans les deux cas de patients porteurs de ces 2 mutations, les suivis personnel et familial étaient négatifs pour l'identification de syncope et la mort subite au moment de leur présentation au service de soins intensifs (Crotti et al., 2012). De manière intéressante, ses observations montrent que des mutations, avec des impacts modérés sur l'activité cardiaque du patient se traduisant par l'absence de symptômes cliniques évidents, vont pouvoir prédisposer à l'apparition de troubles du rythme et augmenter le risque de mortalité au cours des premiers jours suite à un IDM.

Comme vu précédemment, les remodelages structuraux et fonctionnels du VG suite à un IDM se caractérisent par la présence d'une dilatation progressive, une hypertrophie ou de la fibrose. Ces remodelages structuraux s'accompagnent d'une détérioration de la fonction cardiaque gauche qui se traduit par une baisse de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG). A partir de données cliniques échocardiographiques et un suivi Holter à environ 11 jours, 1 et 2 ans après l'infarctus du myocarde, M. St John Sutton et ses collaborateurs ont identifié que des altérations de structure/fonction du VG suite au remodelage post IDM, étaient un substrat majeur pour l'apparition d'arythmies ventriculaires. Ils ont montré notamment des corrélations entre différents niveaux de taille pour la cavité du VG en diastole ou systole et les incidences d'extrasystoles ou de TV enregistrées chez ces mêmes patients (St John Sutton et al., 2003).

Toujours en terme de structure, des investigations par résonance magnétique au niveau cardiaque réalisées chez des patients infarctés, en phases aiguë ou chronique, avec une dysfonction cardiaque gauche, ont été conduites afin d'évaluer les tailles du cœur et de la zone périphérique de l'IDM. L'hétérogénéité entre ces deux zones se présentent comme un facteur prédictif non invasif de meilleur pronostic que la FEVG pour la détection de substrats d'arythmies ventriculaires mis en évidence par des protocoles de stimulations électrophysiologiques (Bello et al., 2005 ; Yan et al., 2006 ; Schmidt et al., 2007).

En dehors des remodelages électrophysiologique et fibrotique observés au niveau des zones bordante et centrale de l'IDM, des études récentes suggèrent un autre mécanisme impliqué dans la genèse d'arythmies au niveau de ces zones. Ils sembleraient que les myofibroblastes pourraient être électriquement couplés entre eux ou avec des cardiomyocytes au niveau de l'infarctus *via* des jonctions gap. Ils pourraient ainsi contribuer à une susceptibilité arythmique de cette zone. De manière

intéressante, McDowell et ses collaborateurs ont montré, à partir d'IRM *ex vivo* réalisées à partir de cœurs de lapins infarciés et des modèles informatiques de remodelages structuraux et ioniques, que la contribution des myofibroblastes dans la prédisposition des arythmies dépendait de leur densité dans la zone. Des densités intermédiaires sont propices à un remodelage ionique, et au contraire, des densités fortes causent une dépolarisation suffisante pour supprimer la possibilité de réentrée malgré les autres effets pro-arythmogènes (McDowell et al., 2013). Des expérimentations *in vitro* ont même montré que des différences de densité de fibroblastes sains et issus de la zone infarciée de 7 à 8 jours provoquaient des différences sur la durée du PA et sur la vitesse de conduction de l'influx électrique au travers d'une couche de cardiomyocytes néonataux (Vasquez et al., 2010).

Le pronostic des patients souffrant d'une dysfonction cardiaque, malgré une amélioration des thérapies, reste néanmoins critique avec une mortalité atteignant 20% dans la première année de la pose du diagnostic initial et 80% dans les 8 ans. Parmi l'ensemble des décès enregistrés chez des patients présentant une insuffisance cardiaque, 50% d'entre eux sont soudains et inattendus (Tomaselli et al., 2004; Coronel et al., 2014). L'insuffisance cardiaque est la finalité commune pour de nombreuses pathologies cardiaques en dehors des remodelages hypertrophiques et fibrotique post-infarctus. C'est le cas pour les cardiomyopathies dilatées ou hypertrophiques, l'hypertension, des défauts cardiaques congénitaux parmi d'autres. Ainsi, les changements électrophysiologiques et les mécanismes engagés dans l'arythmogénicité associés à l'insuffisance cardiaque vont dépendre de l'étiologie de celle-ci. Cette constatation est à l'origine des difficultés rencontrées par les cliniciens pour traiter les arythmies lors d'une insuffisance cardiaque. Les changements électrophysiologiques durant cette pathologie sont mis en évidence par une littérature équivoque, car hautement dépendante de l'espèce et des modèles expérimentaux utilisés. Cependant il existe néanmoins des dénominateurs communs jouant sur l'arythmogénicité comme le remodelage des canaux ioniques, le découplage des cellules, l'altération de l'homéostasie calcique et les modifications de la matrice extracellulaire (Coronel et al., 2013). Ces changements ressemblent énormément à ceux décrits à 4-5 jours au niveau de la zone épicaudique bordant l'IDM chez le chien.

La prolongation du PA est un processus commun à tous les modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque, comme chez l'homme. Elle représente l'expression d'une baisse de la réserve de la repolarisation. En effet, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque sont associées à des réductions des courants potassiques  $I_{to}$  et  $I_{Ks}$  (Tomaselli et al, 1999) seules ou combinées à une augmentation du courant sodique retardée  $I_{Na,Late}$  (Nattel et al.,2007). La repolarisation terminale est ralentie par une réduction de  $IK_1$  conduisant aussi à une diminution de la stabilité du potentiel de membrane et une augmentation de susceptibilité à des dépolarisations spontanées au niveau du myocarde (Nattel et al., 2007 ; Coronel et al., 2013). La présence d'un remodelage du courant sodique va dépendre du choix du modèle, même si l'élévation du courant  $I_{Na,Late}$  semble un élément reproductible et robuste.

Cette réduction de la réserve de repolarisation est mise en évidence 1) par une prolongation de l'intervalle QT ou 2) *via* des alternances au niveau de l'onde T qui est un facteur prédictif de mort subite. La prolongation de l'intervalle QT prédispose en elle-même à la génération d'EAD, par une réactivation de courants  $I_{CaL}$  ou seulement par la diminution de la réserve de repolarisation avec les fluctuations induites par les modifications de  $I_{K1}$  (Nattel et al., 2007 ; Coronel et al., 2013). Ces EAD vont pouvoir être à l'origine d'ESVs, de TV sous forme de torsades de pointes ou de FV (Figure 23).

L'élévation de la dispersion de la repolarisation associée à l'insuffisance cardiaque va pouvoir favoriser l'initiation de réentrées, plus spécialement lors d'un ralentissement suffisant de la conduction au niveau des zones présentant une repolarisation prolongée (Coronel et al. 2014).

En ce qui concerne la connexine 43, la forme majoritaire composant les gap junctions ventriculaires, son expression a été montrée comme étant diminuée et redistribuée vers les membranes latérales des cardiomyocytes chez l'homme (Peters et al., 1993 ; Peters et al., 1996 ; Severs et al., 2008). Ces remodelages sont un substrat potentiel, comme un bloc de conduction pour les réentrées (Poelzing et al., 2004). Cependant, les conditions de diminution de la connexine 43 pour atteindre la conduction du ventricule gauche ne semblent pas être atteintes par celles induites au cours de l'insuffisance cardiaque. En effet, des souris n'exprimant que 10% du niveau normal en connexine 43 ne présentent pas de modification de conduction au niveau de leur ventricule gauche (Stein et al., 2011). Cependant une combinaison d'un découplage modéré induit par une réduction de la connexine 43 associée à une baisse du canal Nav1.5 sont en revanche capable de ralentir la conduction (Stein et al., 2009) et être à l'origine de l'induction de troubles du rythme dans un modèle transgénique de knock-out conditionnel pour la connexine 43 (Jansen et al., 2012). Maintenant, comme la connexine 43 fait partie d'un complexe macromoléculaire comprenant Nav1.5, il pourrait être attendu qu'une altération d'un des composants de ce complexe pourrait avoir des conséquences sur les autres. Ainsi, une dysfonction de Nav1.5 pourrait probablement accompagner la baisse de la connexine 43 au cours de l'insuffisance cardiaque sans un effet direct de cette insuffisance cardiaque sur le canal Nav1.5. Cela pourrait ainsi conduire à une baisse de la conduction suffisante pour être une source arythmogène (Coronel et al., 2013).

Comme décrit auparavant, l'hypertrophie et le myocarde au cours de l'insuffisance cardiaque sont associés à des altérations de l'homéostasie calcique (Tomaselli et al., 1999 ; Luo et al., 2013). Ces altérations vont comprendre 1) **une relation inverse entre l'amplitude du transitoire calcique et la fréquence cardiaque** notamment liée à une réduction du contenu en  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (RS) pour de hautes fréquences cardiaques, 2) **une réduction de la recapture du  $Ca^{2+}$  dans le RS** liée à baisse d'activité de SERCA2a, et 3) **une augmentation de la concentration calcique intracellulaire** au cours de la diastole. L'ensemble de ces conditions va permettre des libérations spontanées de calcium du RS. En réponse à ces libérations, des augmentations de l'expression et de l'activité de l'échangeur NCX vont conduire en extrudant de la cellule le calcium à

la génération d'un courant sodique entrant responsable de la génération de DAD pouvant induire des PAs et causer des arythmies par des activités déclenchées (Nattel et al., 2007) (Figure 23).

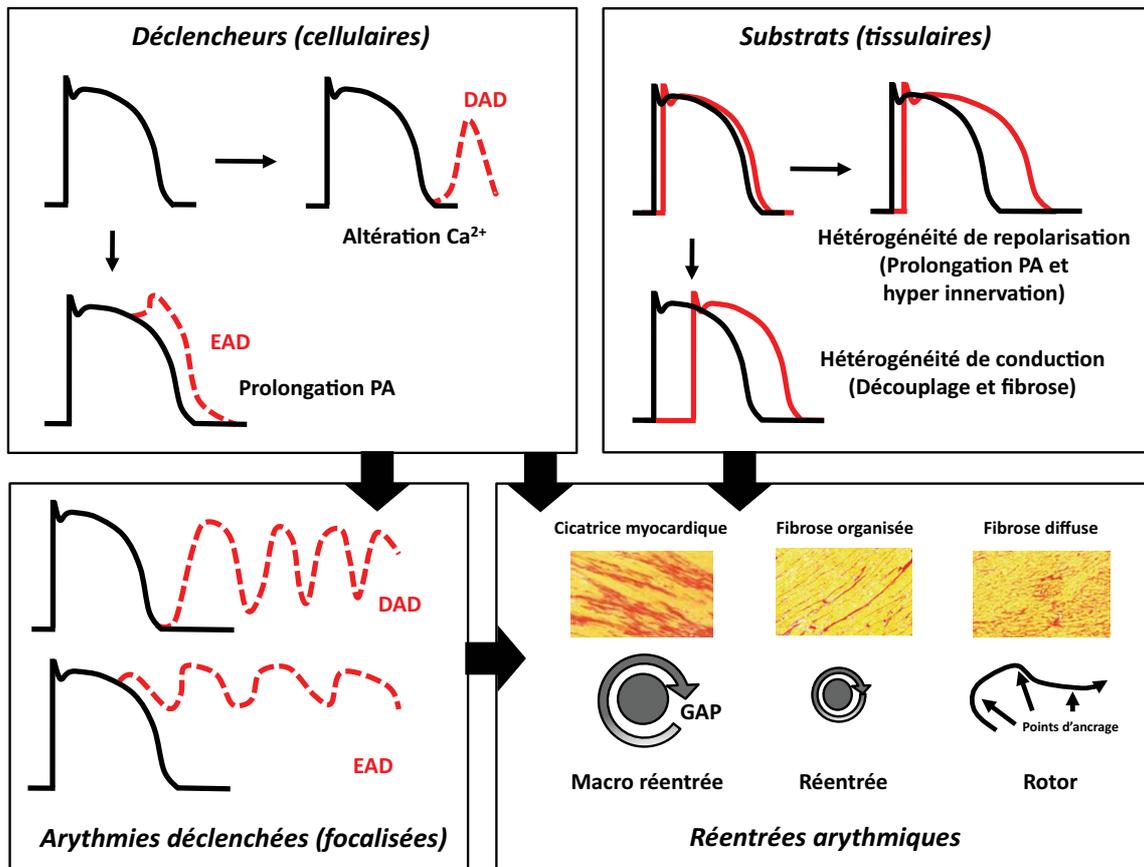


Figure 23: Diagramme de l'interaction entre les mécanismes des déclencheurs cellulaires et des substrats tissulaires impliqués dans l'arythmogénicité au cours de l'insuffisance cardiaque (Figure inspirée de Coronel et al. 2014 avec des illustrations de Jong et al. 2006) (DAD: Delayed After Depolarization; EAD: Early After Depolarization; GAP: espace; PA: Potentiel d'Action).

Au cours des processus d'hypertrophie et de mise en place de l'insuffisance cardiaque, de nombreux facteurs physiopathologiques, comme l'activation des systèmes neurohormonaux, vont conduire à un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) par les fibroblastes *via* la synthèse et l'accumulation de fibrose dans le myocarde. Cependant, la présence d'une fibrose interstitielle au niveau de la zone non infarcté du ventricule gauche n'est pas toujours décrite chez des patients présentant une insuffisance cardiaque terminale (Marijanowski et al., 1997). L'altération de la MEC va aussi contribuer à une diminution de la fonction diastolique. Concernant l'électrophysiologie cardiaque, l'accumulation de fibres de collagènes va conduire à une séparation des fibres myocardiques et potentiellement bloquer l'influx électrique et plus particulièrement la conduction transverse par une rupture du couplage intercellulaire latérale. Ainsi, la fibrose va pouvoir augmenter l'anisotropie permettant de faciliter la genèse d'arythmies focalisées et participer à la formation de bloc de conduction pouvant participer à la formation de réentrée (Coronel et al., 2014). La taille et le

type de fibrose vont en partie conditionner le niveau de réentrée, allant de la macro réentrée à des implications dans les mécanismes de rotor dans le cas d'une fibrose diffuse (Figure 23).

Le remodelage cardiaque du VG après un IDM a été décrit comme associée à la mise en place d'une hyper innervation du myocarde, régulée par les fibroblastes. Cette hyper innervation semble être associée avec la survenue de trouble du rythme. Chez l'homme, les présences régionales pour les nerfs du système nerveux sympathiques ont été retrouvées comme augmentées au niveau du myocarde et des vaisseaux chez des patients présentant une histoire de TV ou de mort subite, avec parmi eux des personnes ayant une maladie coronarienne (Cao et al., 2000). Chez le lapin, l'hyper innervation serait responsable d'une hétérogénéité de la repolarisation au niveau de la zone bordant l'infarctus pouvant être potentiellement un mécanisme de trouble du rythme conduisant à la mort subite (Jiang et al., 2007). Des études réalisées chez le rat montrent que l'utilisation de bloqueurs du système  $\beta$  adrénergique ou du système rénine angiotensine aldostérone vont réduire l'hyper innervation et les arythmies ventriculaires observées suite à un IDM (Jia et al., 2013).

### ***I-5-4 La mort subite cardiaque : une complication dévastatrice de l'infarctus du myocarde***

#### ***I-5-4-1 La mort subite cardiaque : définition, mécanismes et épidémiologie***

Malgré l'amélioration de la prise en charge des pathologies cardiovasculaires, la mort subite cardiaque (MSC) reste un problème majeur de santé publique. La MSC est un décès inattendu d'origine cardiaque apparaissant dès la première heure après l'apparition des premiers symptômes (Arshad et al., 2008).

La séquence d'événements la plus commune conduisant à la mort subite cardiaque paraît être la dégénération d'une TV vers une FV durant laquelle la désorganisation de la contraction des ventricules ne permet plus une éjection efficace du sang. Cette dégénération est souvent suivi par un arrêt cardiaque ou à *minima* d'une réduction de l'activité électrique (Rubart et al., 2005). Les descriptions des différents mécanismes, concernant la génération d'une TV et son passage vers une FV au cours d'une ischémie myocardique et de ses conséquences, ont été précédemment développés dans les parties ci-dessus (page 46 à 47).

Dans le monde, la MSC est à l'origine du décès de plus de 3 millions de personnes, avec seulement moins de 1% des cas qui ne soit pas fatal (Arshad et al., 2008). L'existence d'une atteinte coronarienne préexistante et ses conséquences, que sont l'ischémie aiguë du myocarde, la cicatrice d'un IDM précédent ou une insuffisance cardiaque, vont être à l'origine de 80% des cas de mort subite cardiaque. Les cardiomyopathies hypertrophiques et dilatées, comprenant les pathologies congénitales dont les anomalies des canaux ioniques, représentent la seconde cause avec 5 à 10% des cas de MSC (Rubart et al., 2005).

Dans le cadre de l'IDM, le taux de mort subite est 10 fois plus élevé au cours des 30 premiers jours, puis décroît exponentiellement jusqu'à 6 mois pour atteindre un niveau stable à 2 ans. On distingue 3 phases de survenue de MSC après l'IDM : une phase précoce entre 48 heures et 40 jours, une phase subaiguë entre 41 jours et 6 mois et une phase éloignée de 6 mois à plusieurs années.

Avec la mise en place des interventions coronariennes percutanées permettant une revascularisation des IDM avec sus-décalage du segment ST, la mortalité cardiaque a fortement diminué. Malgré cette avancée, la MSC reste une cause commune de décès après un IDM avec une implication dans les 24 à 40% de la mortalité totale. C'est pourquoi, des méthodes de stratification du risque, efficaces et robustes, sont nécessaires pour stratifier les patients en vue d'une prévention primaire de la mort subite cardiaque.

### *I-5-4-2 Les traitements préventifs des troubles du rythme et de la mort subite après l'IDM aigu*

A ce jour, les stratégies thérapeutiques pour prévenir la MSC et/ou les arythmies ventriculaires, générées par la présence d'un IDM, comprennent l'administration de traitements pharmacologiques anti arythmiques, l'implantation d'un défibrillateur cardiaque et l'ablation du substrat arythmogène par radiofréquence (Denniss et al., 2007).

Parmi les **traitements pharmacologiques anti arythmiques**, il a été montré que les utilisations des  $\beta$ -bloquants, des inhibiteurs des récepteurs à l'angiotensine et les statines, augmentaient la survie chez les patients à haut risque *via* une modulation du remodelage induit par l'infarctus du myocarde. En revanche, les utilisations de molécules anti arythmiques classiques, comme la flécaïnide ou le D-sotalol, ont été associées avec une aggravation du taux de mortalité. De même, l'amiodarone, un agent anti arythmique qui à des doses cliniques présente des effets bloqueurs sur de multiples canaux et transporteurs ioniques, n'a pas augmenté le taux de survie des patients traités. Ainsi, l'utilisation prophylactique d'agents bloqueurs spécifiques des canaux ioniques n'a pas réduit la mortalité mais pourrait même l'augmenter (Arshad et al., 2008; Rubart et al., 2005).

L'**implantation d'un défibrillateur cardiaque**, consistant à envoyer un choc électrique lorsqu'une TV est détectée, reste la thérapie la plus courante pour la prévention primaire de la mort subite cardiaque. Dans une phase distale de l'apparition l'IDM, les études MADIT I (Moss et al., 1996) et II (Moss et al., 2002) (Muticenter Automatic Defibrillator Implantation Trial), et MUSTT (Muticenter Unsustained Tachycardia Trial) (Buxton et al., 1999) ont montré que l'implantation de défibrillateur chez des patients présentant une altération de la fonction cardiaque gauche avec ou sans l'induction de TV, est une méthode présentant des effets bénéfiques pour la survie des patients. En revanche, les études DINAMIT (Defibrillator IN Acute Myocardial Infarction Trial) (Hohnloser et al., 2004) et IRIS (Immediate Risk Stratification Improves Survival) (Steinbeck et al., 2009) n'ont pas décrit d'effet bénéfique pour l'implantation d'un défibrillateur, en prévention primaire, chez des

patients avec une dysfonction ventriculaire majeure au cours des 40 premiers jours suite à l'infarctus. C'est pourquoi, dans le guide de l'ACC portant sur les critères appropriés pour l'implantation de défibrillateur (Russo et al., 2013), cette implantation a été interdite pour les patients en phase précoce. Les manques de bénéfice dans la prévention primaire précoce peuvent être liés 1) aux choix des tests utilisés pour définir la stratification du risque chez les patients, mais 2) peuvent aussi provenir d'une augmentation de la mortalité par les effets délétères de l'implantation, comme les risques d'infections, des chocs inappropriés et une association de chocs de hautes énergie.

D'autres possibilités, comme l'implantation d'un défibrillateur externe ou sous cutané afin d'éliminer une partie des effets délétères de l'implantation intra thoracique, sont en cours d'étude (Zaman et al., 2014). L'implantation de défibrillateurs représente dans tous les cas une thérapie onéreuse, nécessitant de prendre en considération le rapport entre coût et bénéfice. C'est pourquoi, une amélioration de la stratification du risque s'avère être un enjeu majeur afin d'identifier les populations de patients nécessitant cette procédure.

L'**ablation du substrat par radiofréquence** est une technique utilisée pour l'élimination de foyer(s) ectopique(s) d'arythmies, substrat anatomique des TV, suite à l'infarctus du myocarde (Stevenson et al., 1998 ; Aryana et al., 2007 ; Denniss et al., 2007). Elle va être exclusivement réservée aux patients pour lesquels les traitements pharmacologiques ou l'implantation d'un défibrillateur cardiaque ne sont pas applicables ou ne suffisent pas à eux seuls pour supprimer les arythmies (Stevenson et al., 1998; Bansch et al., 2003 ; Denniss et al., 2007).

### *I-5-4-3 La stratification du risque de mort subite après l'IDM aigu*

L'identification des patients ayant survécu à un IDM avec un haut risque de développer des TV et FV permettrait de mettre en place un suivi plus soutenu à la sortie de l'hôpital comme l'implantation de défibrillateur cardiaque pour réduire le risque de mort subite cardiaque. Pour rappel, l'apparition des arythmies ventriculaires est reconnue comme l'une des causes principales de mort subite après la sortie des patients de l'hôpital. Une grande variabilité de facteurs peut influencer le taux de mortalité suite à un IDM : des facteurs dépendant du patient (âge, sexe, facteurs de risque cardiovasculaires, infarctus antérieur, historique familiale) et des facteurs dépendant de la nature de l'atteinte cardiaque (fonction cardiaque, location et taille l'infarctus, présence d'une insuffisance cardiaque) (Liew et al., 2010).

A partir d'études cliniques comme MADIT I ou II, l'**altération de la fonction du ventricule gauche (VG)** a été montrée comme un des facteurs prédictifs le plus puissant permettant d'identifier sur une période éloignée de l'IDM, les patients pour lesquels l'implantation d'un défibrillateur apporte un bénéfice significatif sur le taux de mortalité. Cependant, malgré une recommandation de son utilisation par les directives américaines et européennes, beaucoup de problèmes se posent à l'utilisation exclusive de la dysfonction du VG pour stratifier le risque et guider l'implantation de

défibrillateur. En effet, il est décrit que les limites de la dysfonction du VG vont être son manque de spécificité, la faible amélioration du taux de survie pour le nombre d'implantations réalisées. De plus, il a été décrit une grande proportion de mort subite ayant eu lieu chez des patients avec une fonction du VG conservée. De même, comme mentionné au dessus, le gain apporté pour une implantation éloignée post-IDM n'est pas retrouvé lorsque le risque est étudié au cours de la phase précoce. Donc, bien que l'évaluation de la fonction du VG soit invariablement incorporée dans les modèles de stratification du risque pour prévenir la mort subite, il apparaît très clairement que d'autres tests ou éléments sont requis pour stratifier les patients à haut risque après un IDM (Zaman et al., 2014).

Ainsi, le risque de MSC est étudié *via* une grande variabilité d'investigations sur différents aspects de la physiopathologie post-IDM, apportant des informations pour améliorer la stratification du risque (Liew et al., 2010):

- Les **tests électrophysiologiques**, correspondant à une **stimulation ventriculaire programmée**, ont pour objectifs d'investiguer l'existence d'un substrat au niveau du myocarde pour des mécanismes de réentrée pouvant être à l'origine de tachycardies ventriculaires. Malgré sa nature invasive, et la nécessité d'un équipement spécialisé, la stimulation ventriculaire programmée est la seule autre méthode, en combinaison avec l'évaluation de la dysfonction du VG, ayant été prouvée comment pouvant réduire le risque de mortalité en phase tardive en motivant l'implantation de défibrillateur cardiaque dans les études cliniques MADIT I et II, et MUSTT. Cependant dans les études portant sur la phase précoce de mort subite, le bénéfice de cette méthode pour guider les implantations n'a pas encore été prouvé vraisemblablement à cause du délai de l'investigation, du protocole de stimulation choisi et de l'hétérogénéité des populations étudiées (Liew et al., 2010 ; Zaman et al., 2014).

- De nombreux paramètres issus de l'**ECG conventionnel à 12 voies**, comme la durée du QRS, un bloc de branche gauche et une dispersion de l'intervalle QT, ont été décrits comme d'importantes informations pronostics chez les patients après un IDM aigu. Cependant, l'utilisation de ces paramètres pour orienter la décision d'une implantation d'un défibrillateur semble limitée car la majorité de ces paramètres sont des marqueurs de l'avancement de la dysfonction ventriculaire. Des études portées sur la durée du QRS comme éventuel marqueur de risque n'ont montré aucune association avec la prédiction du risque de mort subite et la décision d'implantation d'un défibrillateur cardiaque (Liew et al., 2010 ; Zaman et al., 2014), Néanmoins, la relevance d'un « aspect fragmenté » pour le QRS reste à être évaluée pour son utilité dans la pratique clinique (Liew et al., 2010).

- Les **études de moyennage du signal de l'ECG** comparent et moyennent les complexes QRS d'environ 300 battements consécutifs pour produire un complexe filtré afin d'identifier la présence de variations pour des signaux de faible amplitude observés à la fin du QRS appelés « potentiels ventriculaires retardés ». Ces potentiels pourraient prédire l'induction de TV par stimulation ventriculaire programmée. A ce jour, cette méthode « appliquée seule » est limitée pour améliorer la

stratification du risque, notamment au cours de la phase aiguë avec une reperfusion (Zaman et al., 2014). En revanche, en combinaison avec la dysfonction du VG, un suivi Holter ou une imagerie nucléaire, elle pourrait contribuer à améliorer la prédiction du risque (Liew et al., 2010).

- Un **suivi par Holter de l'ECG** sur 24 heures s'avère un outil intéressant pour la stratification du risque en appréhendant plusieurs paramètres de l'activité électrique au cours du temps :

**1) La détection d'arythmies ventriculaires**, comme des extrasystoles fréquentes ou de tachycardies non soutenues (TVnS). Cette détection a une valeur prédictive sur de sérieux épisodes d'arythmies ou la mort chez les patients. Cependant, son utilisation seule est limitée à cause de sa spécificité. Il est à noter qu'une haute fréquence de TVnS est observée dans plus de 50% des patients avec un IDM (Liew et al., 2010 ; Zaman et al., 2014).

**2) La variabilité de la fréquence cardiaque ou HRV** en anglais (Heart Rate Variability) qui représente l'évaluation des variations du tonus du système nerveux autonome au niveau cardiaque, est mesurée sur de court (2 à 30 minutes) ou long (24 heures) périodes. La HRV est influencée par de nombreuses variables comme l'âge, le sexe et les traitements, et varie en fonction de l'activité du nœud sinusal. En considérant ces éléments et son inadéquation avec des patients présentant fréquemment des arythmies, cette technique ne peut pas être utilisée seule dans la détermination du risque chez les patients présentant un IDM (Liew et al., 2010 ; Zaman et al., 2014).

**3) La turbulence de la fréquence cardiaque (TFC)** qui mesure les fluctuations du rythme sinusal après une extrasystole ventriculaire (ESV) simple. En temps normal, il y a une accélération suivie d'une décélération du rythme sinusal en réponse à une ESV qui n'est pas retrouvé chez les patients à haut risque de mortalité post IDM. Plusieurs études cliniques rétrospectives et prospectives ont fourni l'évidence que la TFC était un puissant facteur indépendant et prédictif du risque suivant un IDM aigu (Liew et al., 2010).

**4) Les alternances de l'onde T**, battements à battements, reflètent une dispersion dans la repolarisation cardiaque associée à une dysfonction de l'homéostasie calcique créant des grandes différences de repolarisation pouvant causer des blocs unidirectionnels et donc des réentrées. A partir d'études cliniques, les alternances de l'onde T pourraient être un marqueur potentiel pour la mort cardiaque, au cours de la phase sub aiguë et tardive du risque de mort subite cardiaque post IDM, mais sans évidence de son utilisation au stade précoce pour guider l'implantation d'une défibrillateur (Zaman et al., 2014).

- L'utilisation de l'**IRM cardiaque** a apporté de nouvelles et pertinentes possibilités dans la prédiction de la mort subite cardiaque. Pour des patients dans la phase tardive du risque de mort subite cardiaque, une corrélation entre la taille de la zone périphérique de l'infarctus quantifiée par IRM et la présence d'arythmies ventriculaires ont été identifiées, mais non retrouvées pour des stades plus

précoces. Il commence aussi à émerger que la taille de l'infarctus mesurée par IRM serait un marqueur prédictif supérieur à la dysfonction du VG dans l'identification de patients présentant des TV induites par stimulation ventriculaire programmée, une plus value indéniable pour la prédiction du risque de mortalité et dans l'orientation vers une implantation de défibrillateur (Zaman et al., 2014).

De nombreuses études cliniques réalisées sur des familles commencent suggérer l'existence d'une **prédisposition génétique** à la mort subite cardiaque (Friedlander et al., 1998; Jouven et al., 1999 ; Dekker et al., 2006). Elles décrivent que la présence de cas de mort subite chez des parents, dont l'origine est entre autre un infarctus du myocarde, doit être assimilé comme un facteur de risque majeur dans l'apparition d'un premier cas de fibrillation ventriculaire ou d'arrêt cardiaque. En effet, dans un revue que notre équipe a rédigée en 2013, nous avons pu montrer que la présence de mutations ou de polymorphismes, dans des gènes codant pour de nombreux canaux ioniques ou récepteurs, pouvaient moduler ces derniers en impactant les différents mécanismes de la biosynthèse d'une protéine, allant de la simple régulation promotrice à la modulation d'activité pour un canal, voir à être associés à une insuffisance cardiaque et à l'augmentation du risque d'arythmies et de mort subite (Jagu et al., 2013). Au delà des canaux, d'autres gènes connus ou non comme associés à l'ischémie myocardique, à la signalisation neurohormonale, à l'homéostasie calcique ou aux propriétés calciques cardiaques peuvent aussi contribuer par la présence de mutations ou de polymorphismes à une augmentation du risque de mort subite (Rubart et al., 2005). De plus, que se soit dans les maladies d'origine génétique comme le syndrome du QT long ou de Brugada, ou dans les maladies complexes, comme l'infarctus du myocarde ou l'insuffisance cardiaque chronique, il y a une interaction entre un substrat arythmogène et de nombreux polymorphismes aussi appelés « gènes modificateurs » qui vont contribuer à diminuer ou augmenter la stabilité électrique cardiaque. La présence et les effets de ces variants communs, modifiant la susceptibilité d'arythmies, permettraient d'aider à comprendre pourquoi des patients présentant la même pathologie avec les mêmes signes cliniques vont dans certains cas survivent et dans d'autres cas meurent soudainement. C'est pourquoi, le dépistage génétique présente un énorme potentiel dans l'identification d'individus avec un risque élevé pour la mort subite cardiaque (Wellens et al., 2014).

### **I-6 Le canal sodique voltage dépendant Nav1.5 : de la physiologie à la physiopathologie cardiovasculaire**

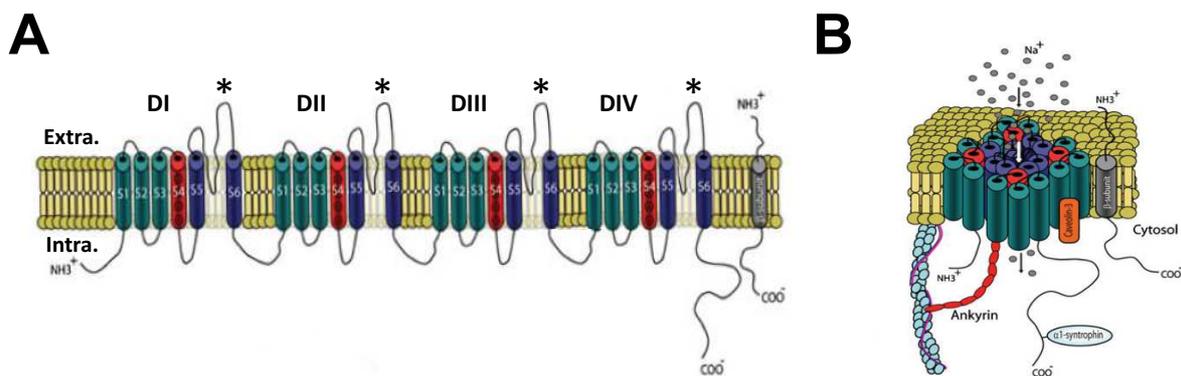
#### ***I-6-1 Le canal sodique Nav1.5 : structure et rôles***

##### ***I-6-1-1 Structure du canal sodique Nav1.5***

Les canaux sodiques voltages dépendants sont des protéines transmembranaires localisées au niveau de la membrane plasmique des cellules (Amin et al., 2010). Le canal sodique voltage dépendant majoritaire dans le cœur est l'isoforme Nav1.5 (Shy et al., 2012). Comme les autres

isoformes, ce canal est constitué d'une sous-unité  $\alpha$ , comprenant le pore et donnant son nom du canal, et de sous-unités accessoires  $\beta$  ayant des rôles dans l'expression et l'activité de la sous-unité  $\alpha$ .

Cette sous-unité  $\alpha$  nommée Nav1.5, encodée par le gène SCN5A est une protéine transmembranaire glycosylée qui va comprendre entre 2015 et 2016 acides aminés (selon fonction des variants d'épissage) avec un poids moléculaire apparent d'environ 220kDa (Abriel et al., 2010). Elle va être organisée en une extrémité N terminal cytoplasmique, 4 domaines transmembranaires homologues (DI à DIV) interconnectés par des boucles cytoplasmiques, et une extrémité C terminale cytoplasmique. Chaque domaine comprend 6 segments transmembranaires en hélice  $\alpha$  (S1 à S6) connectés par une alternance de boucles cytoplasmiques et extracellulaires. Le segment S4 de chaque domaine, chargé positivement, forme le voltage senseur et présente un rôle crucial dans l'activation du canal. La conformation prise par les 4 domaines permet l'association des segments S5 et S6 de chaque domaine pour former le pore du canal. De plus, les boucles extracellulaires des segments S5 et S6, aussi appelées boucles P, contiennent une composition particulière en acides aminés leur conférant la sélectivité du canal pour les ions sodium (Amin et al., 2010 ; Remme et al., 2010) (Figure 24A et B).



**Figure 24: Structure du canal sodique voltage dépendant Nav1.5.** **A**, Représentation linéaire de la structure de la sous-unité  $\alpha$  de Nav1.5 accompagnée d'une sous-unité accessoire  $\beta$  (segment gris). **B**, Représentation prenant en compte la conformation prise par les 4 domaines homologues pour former le pore du canal Nav1.5. Les segments S1 à S3 sont en vert, le segment S4 en rouge, et les segments S5 et S6 en bleu. Les astérisques signalent les boucles P impliquées dans la sélectivité du canal aux ions sodiums (Ces deux figures sont issues de l'article d'Amin et al. 2010) (D: Domaine ; Extra.: Extracellulaire; Intra.: Intracellulaire).

Les 4 sous-unités accessoires  $\beta$  ( $\beta 1$  à  $\beta 4$ ), décrites au niveau cœur et encodées par 4 gènes différents (SCN1B à SCN4B), sont des protéines de 30 à 40 kDa comprenant une extrémité N terminale extracellulaire, un segment transmembranaire et une extrémité C terminale cytoplasmique (Abriel et al., 2010 ; Amin et al., 2010).

### *I-6-1-2 Le fonctionnement et les rôles canoniques de Nav1.5*

Les canaux sodiques voltages dépendants ont été découverts pour la première fois en 1952 par Hodgkin et ses collaborateurs dans la genèse du potentiel d'action neuronal. Depuis, leurs rôles

canoniques dans la genèse et la conduction de l'influx électrique, au niveau des cellules excitables comme les neurones, les cellules musculaires squelettiques et les cardiomyocytes, sont très bien établis et décrits (Black et al., 2013). De plus, des évidences commencent à suggérer que des canaux sodiques voltage dépendants peuvent être exprimés et fonctionnels dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Fort et al., 2009), de l'intestin (Strege et al., 2007) et des voies respiratoires (Bradley et al., 2013). Cependant leurs rôles, dans ce type de cellule, restent encore à définir.

Un canal sodique voltage dépendant Nav1.5 présente, comme son nom l'indique, des propriétés, d'ouverture et de fermeture, associées à des changements de conformation du canal au cours du temps dus à des mouvements moléculaires en réponse à des changements des valeurs du potentiel membranaire.

Lorsque qu'un cardiomyocyte va être excité par des cellules adjacentes, son potentiel de membrane de repos est alors dépolarisé. Cette dépolarisation provoque un mouvement du segment S4 vers le côté extracellulaire de la membrane plasmique déclenchant ainsi l'activation du canal, soit l'ouverture du pore. Comme leur inactivation, assimilable à la fermeture du pore, commençant simultanément mais étant plus lente que leur activation, les canaux Nav1.5 vont donc être ouverts transitoirement. Ils vont générer le courant  $I_{Na}$  responsable de la dépolarisation très rapide au cours de la phase 0 du potentiel d'action des cardiomyocytes et avoir un rôle dans le déclenchement du couplage excitation-contraction par l'activation des canaux calciques de type L. De plus, avec la notion de la transmission de proche en proche de l'influx électrique, les canaux Nav1.5 contribuent fortement à la propagation des PA au travers des différents tissus et compartiments du cœur (Amin et al., 2010 ; Remme et al., 2010).

L'inactivation comprend différents états de conformation des canaux associés à des composantes rapide, intermédiaire et lente de l'inactivation. L'inactivation rapide est initiée par le mouvement du segment S4 du domaine DIV. Au niveau de la boucle reliant le domaine DIII et DIV, les acides aminés isoleucines, phénylalanine et méthionine, formant le motif IFM et des résidus glycine et proline voisins vont occlure le pore du canal en interagissant avec de nombreux acides aminés des boucles cytoplasmiques entre les segments S4-S5 des domaines DIII et DIV formant le mécanisme d'inactivation intermédiaire. A ce jour, les mouvements moléculaires responsables de l'inactivation lente ne sont pas encore bien déterminés. Dans tous les cas, plus de 99% des canaux Nav1.5 sont inactivés à la fin de la phase 1 du PA et ne peuvent être réactivés seulement après être sortis de leur état d'inactivation au cours de la phase 4 du PA (Amin et al., 2010).

Les canaux Nav1.5 peuvent aussi avoir un rôle dans la détermination de la durée du PA. En effet, au cours de la phase 3, une fraction des canaux Nav1.5 peut être réactivée et responsable d'un courant sodique dépolarisant, appelé « courant de fenêtre » mais aussi « persistant » ou « retardé », dont l'intensité est inférieure à 1% de celui généré au cours de la phase 0. Il est appelé « courant de fenêtre » car il se développe dans une fenêtre de voltage où la membrane atteint un potentiel suffisamment dépolarisé pour réactiver certains canaux tout en étant suffisant pour causer une

inactivation complète. Chez des sujets sains, cette fenêtre de voltage est relativement restreinte conduisant à un faible courant sodique persistant avec une faible implication dans la durée du potentiel d'action. Cependant, ce courant tardif va être modulé et avoir des conséquences dans les cas de cardiomyopathies héréditaires associées à Nav1.5 et de cardiomyopathies acquises comme l'insuffisance cardiaque.

### *I-6-1-3 Les rôles non canoniques de Nav1.5*

Depuis quelques années, les expressions de multiples sous-unités  $\alpha$  des canaux sodiques voltage-dépendant ont été identifiées dans de nombreuses cellules traditionnellement considérées comme non excitables. De plus, ces canaux sodiques vont jouer des rôles non canoniques en participant à de multiples et différentes fonctions effectrices pour ces cellules. En effet, par exemple, il apparaît clairement que les canaux sodiques ne sont pas seulement exprimés au niveau de la membrane plasmique mais aussi dans les membranes d'organites intracellulaires et contribuent ainsi à des processus aussi divers que la phagocytose, la motilité cellulaire, la libération de molécules bioactives et la régulation de l'activité de transporteurs ou échangeurs (Black et al., 2013).

Pour le canal Nav1.5, son expression a été retrouvée dans les astrocytes, les cellules de la microglie, les cellules cancéreuses, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Black et al., 2013). Au delà de son expression dans ces cellules non excitables, Nav1.5 a été montré comme impliqué dans différents mécanismes cellulaires:

1) Etant exprimé au niveau de la membrane des endosomes tardifs dans des macrophages, il va jouer un rôle dans le processus d'acidification de ces endosomes (Carrithers et al., 2007) ;

2) l'augmentation de l'expression d'une isoforme néonatale de Nav1.5 a été associée à un fort potentiel métastatique *in vitro* et à la progression du cancer du sein corrélée cliniquement avec l'invasion des nœuds lymphatiques (Fraser et al., 2005) ;

3) l'identification de fonctions angiogéniques en modulant l'adhésion, la prolifération et la tubulogénèse, au niveau de cellules endothéliales issues de cordon ombilicale humain (Andrikopoulos et al., 2011) ;

4), une augmentation de l'expression de Nav1.5 a été décrite et associée avec une élévation du courant de fenêtre au cours de processus de différenciation de fibroblastes atriaux humains en myofibroblastes. Cette élévation pourrait influencer les fonctions des myofibroblastes comme la prolifération, la migration ou la sécrétion de molécules actives (Chatelier et al., 2012).

Ainsi, il apparaît que l'émergence de ces rôles non canoniques pour Nav1.5 ouvre de nouvelles voies de recherche pour expliquer des mécanismes qui, associés ou non à ceux des rôles canoniques du canal, pourraient être impliqués dans le développement de pathologies héréditaires ou acquises en lien avec Nav1.5.

I-6-2 L'expression et les régulations du gène SCN5A, des ARN messagers Scn5a et de Nav1.5 au niveau cardiovasculaire

Le cycle de vie de Nav1.5 commence par la transcription de son gène SCN5A, suivie par la prise en charge de l'ARN messenger Scn5a et sa synthèse protéique au niveau du réticulum endoplasmique. A partir du réticulum, par une voie de sécrétion de l'appareil de golgi, Nav1.5 va être transporté et adressé à la membrane plasmique où il va exercer sa fonction de canal.

Au cours de ce processus, plusieurs mécanismes ont été décrits comme régulant la vie de Nav1.5, et cela à différents niveaux du gène à la fonction comme notamment la régulation transcriptionnelle du gène SCN5A, l'existence de nombreux épissages alternatifs pour l'ARN messenger Scn5a, la régulation de l'expression protéique et de l'activité de Nav1.5 par des mécanismes impliquant les modifications post-traductionnelles, en lien avec des protéines partenaires et des conditions environnementales (Figure 25).

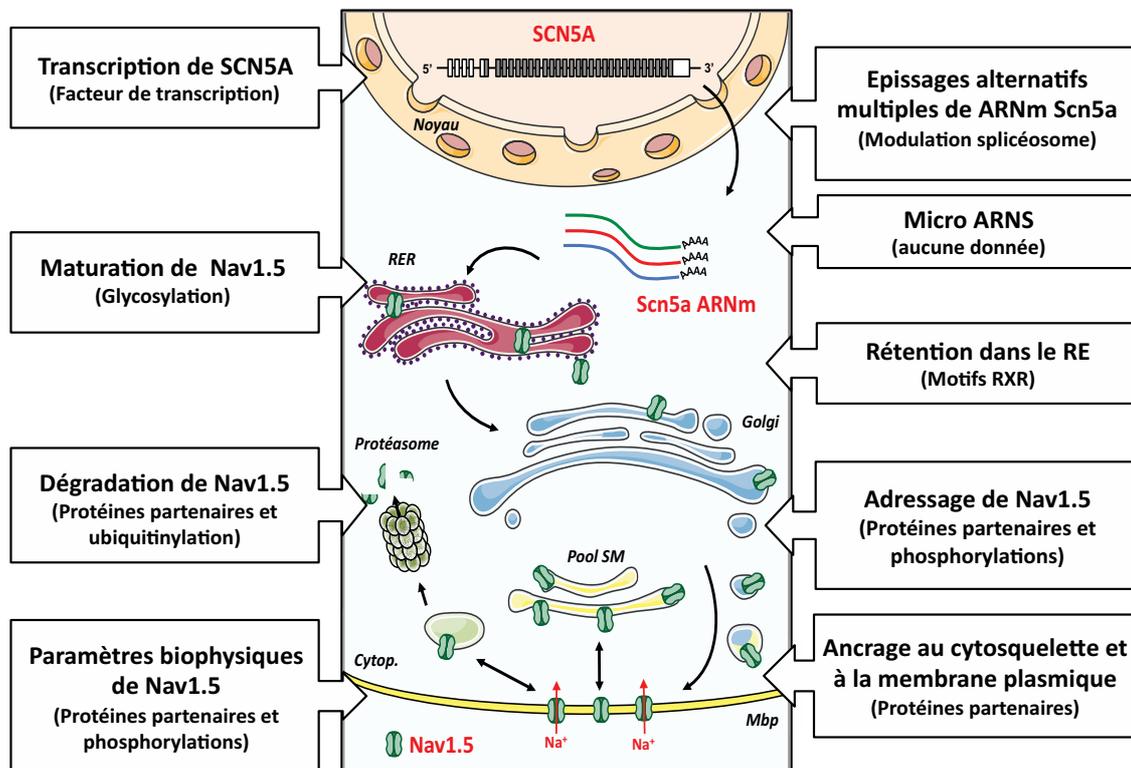


Figure 25: Le cycle de vie du gène SCN5A à la protéine Nav1.5 et ses multiples niveaux de régulation. La partie centrale représente schématiquement les différentes étapes existant entre la transcription du gène SCN5A à l'activité de la protéine au niveau de la membrane plasmique (ARNm: Acide Ribonucléique messenger; Cytop: Cytoplasme; Mbp: Membrane plasmique; Pool SM: Pool sous membranaire; RE: Réticulum endoplasmique; RER: Réticulum endoplasmique rugueux).

### *I-6-2-1 L'expression de Nav1.5 dans le cœur*

Les canaux Nav1.5 ne sont pas distribués de manière homogène dans le myocarde. Ils présentent une expression différentielle dans le système de conduction et au travers de la paroi du myocarde. La présence Nav1.5 est faible ou absente dans les nœuds sino-atrial et atrio-ventriculaire, mais abondant dans les faisceaux de His et les fibres de Purkinje. De plus, un gradient transmural de Nav1.5 est observé dans la paroi des ventricules gauche et droit avec une plus faible expression dans le myocarde sous épicaudique en comparaison avec le myocarde sous endocaudique (Remme et al., 2008). Au niveau cellulaire, l'expression de Nav1.5 va être préférentielle au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes par rapport à la membrane latérale ou le système des tubules T (Rook et al., 2011).

### *I-6-2-2 La structure du gène SCN5A et ses régulations transcriptionnelle et post transcriptionnelle*

Le gène SCN5A comprend 28 exons différents. Parmi eux, les exons 2 à 28 vont contenir la séquence codant pour la protéine Nav1.5. L'exon 1 et une partie de l'exon 2 codent pour la région 5' non traduite, ou 5'UTR (UnTranslated Region), tandis que l'exon 28 contient la séquence de la région 3' non traduite (Wang et al., 2006). Cette organisation génomique semble être conservée au travers des espèces (van Stuijvenberg et al., 2010).

De multiples variants de l'ARN messagers Scn5a codant pour Nav1.5 ont été détectés dans le cœur des mammifères principalement résultants de l'épissage alternatif de l'ARN messenger Scn5a. Ces mécanismes d'épissage semblent apparemment être conservés au cours de l'évolution (Rook et al., 2011 ; Schroeter et al., 2010). Au niveau des cœurs humain et murin, deux variants majoritaires ont été décrits, au niveau de l'extrémité 3'UTR, pour être différents au niveau de l'exon 28A codant pour des queues de poly-adénine courte ou longue (Shang et al., 2004). Dans cette même région, 3 variants minoritaires ont été identifiés, seulement chez l'homme, correspondant à l'épissage alternatif de l'exon 28A par les exons 28B à 28D à l'origine de formes tronquées et non fonctionnelles pour Nav1.5 (Shang et al., 2007). A ce jour, seuls les mécanismes de ce site d'épissage sont réellement décrits et impliquent des interactions avec les protéines RBM25 et LUC7F3 (Gao et al., 2011). Du côté de l'extrémité 5'UTR, 4 et 3 variants d'épissage ont été respectivement décrits chez l'homme et la souris. Ces derniers diffèrent de la séquence non codante de l'extrémité 5'UTR par un épissage alternatif de l'exon 1 avec l'exon 2, nommés 1A à 1D. Cependant, de nombreuses variations de l'organisation génomique ont été observées dans cette région. L'existence de l'exon 1D semble être spécifique de l'homme et abolir complètement la traduction de Nav1.5. Alors que l'exon 1A reste homologue entre les espèces, en revanche les exons 1B et 1C vont présenter une séquence et une localisation qui vont être différentes entre l'homme et d'autres mammifères comme le rat, le chien ou la souris (van Stuijvenberg et al., 2010). Au stade néonatal, il a aussi été rapporté l'existence d'un ARN messenger contenant un exon 6A néonatal qui présente 31 nucléotides, soit 7 acides aminés de

différence, au niveau de la bouche S3-S4 du DI par rapport à l'exon 6 de la forme adulte (Rook et al., 2011). D'autres variants d'épissages des messagers *Scn5a* existent et sont répertoriés avec leurs effets potentiels sur Nav1.5 dans la revue généraliste de Rook et ses collaborateurs en 2011.

L'expression du canal Nav1.5 va être tissu ou cellule spécifique et donc dépendante d'une régulation transcriptionnelle du gène *SCN5A*. Pour le gène humain, des analyses d'activités rapportrices du promoteur réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires ont mis en évidence des séquences associées avec l'exon 1A, 1B et 1C jouant effectivement un rôle dans sa régulation transcriptionnelle. Cependant, les facteurs de transcription impliqués et leurs sites de liaisons respectifs ne sont pas encore déterminés et restent à être confirmés comme régulant effectivement l'expression de *SCN5A in vivo* (van Stuijvenberg et al., 2010 ; Yang et al., 2004). Pour le gène *SCN5A* chez la souris, des éléments activateurs et répresseurs de la transcription pour le gène *SCN5A* ont été associés aux exons 1A et 1C toujours à partir de système d'activité rapportrice dans une lignée cellulaire de cardiomyocytes H9c2 (Shang et al., 2004). En 2008, il a ainsi été montré que l'angiotensine II (AngII), par son implication dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS en anglais pour Reactive Oxygen), réduisait l'expression des ARN messagers *Scn5a* en induisant l'activation du facteur NFκB décrit pour se lier sur un site au niveau de l'exon 1C (Shang et al., 2008). Plus récemment, les ROS ont aussi été identifiées comme une cause d'augmentation de l'adressage nucléaire du facteur de transcription FOXO1 qui, dans cette même étude, a été décrit comme se fixant sur des séquences génomiques, appelées « éléments de réponse à l'insuline », au niveau du promoteur du gène *SCN5A* et étant capable de réprimer son expression (Mao et al., 2012). Bien que ces premières études s'avèrent essentielles, de nombreuses recherches restent à être entrepris afin de comprendre les bases moléculaires de la régulation transcriptionnelle du gène *SCN5A* et donc de l'expression de Nav1.5 dans des tissus donnés (Rook et al., 2011).

A ce jour, aucune observation ne montre concrètement une modulation de la traduction de Nav1.5 par une régulation post transcriptionnelle des ARNs messagers *Scn5a* par micro ARNs. Seule une étude, basée sur une analyse de réseau entre des canaux ioniques/connexines et une base de données sur les micro ARNs, suggère une hypothétique régulation de *SCN5A* par des micro ARNs (Zhou et al., 2010). Cela reste à être validé *in vivo*.

### *I-6-2-3 Les modifications post traductionnelles de Nav1.5*

Parmi l'ensemble des processus de régulation, la mise en évidence et les effets de nombreuses modifications post traductionnelles sur l'expression membranaire et l'activité de Nav1.5 ont été étudiées.

Dans un premier temps, la protéine Nav1.5 présente dans ses boucles extracellulaires de multiples motifs d'acides aminés conservés pour des glycosylations au niveau d'asparagine, aussi appelée N-glycosylation, sites conservés au cours de l'évolution. La présence de glycosylations a été

démontrée comme impactant les propriétés électrophysiologiques d'activation et d'inactivation du canal (Rook et al., 2011).

Des études réalisées au niveau cellulaire, en utilisant la stimulation de la voie  $\beta$  adrénergique par des agonistes comme l'isoprénaline ou des analogues de l'AMPc combinés ou non à une inhibition de la protéine kinase A (PKA), ont décrit un rôle direct de la PKA dans l'augmentation du courant  $I_{Na}$  cardiaque (Lu et al., 1999). Des sites de phosphorylation pour la PKA sur Nav1.5 ont aussi été identifiés au niveau de la région cytoplasmique entre le domaine DI et DII auprès desquels des motifs potentiels de rétention dans le RE de type RXR ont été localisés (Zhou et al., 2002). Donc, il serait envisageable que ses motifs de rétention par la liaison de protéines chaperonnes empêchent précocement le trafic du canal à la membrane plasmique, et qu'inversement, la phosphorylation de Nav1.5 par la PKA soit en mesure de masquer des sites de rétention permettant une augmentation de l'expression membranaire du canal (Rook et al., 2011). Cette hypothèse est rendue plausible *via* la mise en évidence d'une corrélation de la redistribution des pools situés sous la membrane plasmique et au niveau du RE de Nav1.5 vers la membrane plasmique, redistribution qui est à l'origine d'une augmentation du courant  $I_{Na}$  dans des HEK 293 suite à l'application d'AMPc (Hallaq et al., 2006).

La protéine kinase C (PKC) serait également impliquée dans la modulation du courant  $I_{Na}$ . L'effet le plus décrit à ce jour est l'association de l'activation de la PKC avec une diminution de  $I_{Na}$  (Qu et al., 1996 ; Xiao et al., 2001 ; Liu et al., 2009). Cependant, l'absence de changement (Watson et al., 1997) ou une augmentation du courant ont aussi été décrites avec l'activation PKC (Ko et al., 2006). Dans certaines études, ces modulations du courant  $I_{Na}$  sont corrélées à des altérations des propriétés biophysiques d'activation et d'inactivation du canal. Cependant, les mécanismes moléculaires en lien avec l'activation de la PKC et les conséquences sur le courant sodique restent encore à être établis.

Récemment, il a été établi que le canal Nav1.5 est régulé *via* la voie du calcium avec le calcium lui-même, la calmoduline (CaM) et la kinase dépendante de la CaM de type II (ou CaMKII) (Deschenes et al., 2002 ; Tan et al., 2002 ; Kim et al., 2004 ; Young et al. 2005). En effet, une interaction directe du calcium avec l'extrémité C terminale de Nav1.5 par l'intermédiaire d'un domaine EF-like a été mise en évidence (Wingo et al., 2004). Deux motifs IQ interagissant avec la CaM ont également été identifiés dans la boucle reliant les domaines DIII et DV, comme au niveau de l'extrémité terminale. Le mécanisme, impliquant les zones de fixation du  $Ca^{2+}$  et de la CaM au niveau de Nav1.5, reste encore à être clarifié avec des effets variables selon les études. A ce mécanisme vient se surajouter la modulation potentielle par la CaMKII dont le rôle semble porter sur une régulation de l'inactivation afin de moduler le courant  $I_{Na}$  tardif. Cette modulation serait associée avec la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Wagner et al., 2011). Cependant, la multiplicité des différences d'espèces, des systèmes d'expression, des conditions électrophysiologiques et des isoformes protéiques étudiés conduit à une non reproductibilité de ces différents résultats. Cela suggère néanmoins l'existence de plusieurs mécanismes de régulation de Nav1.5 par le calcium. C'est

pourquoi des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier le(s) mode(s) d'action de cette voie (Rook et al., 2011).

Des résultats de recherche montrent enfin que le système d'ubiquitinylation associé au protéasome est impliqué dans la régulation de l'expression membranaire de Nav1.5 par une internalisation et/ou une dégradation de la protéine. Il a été notamment montré que Nedd4-2, une ubiquitine ligase E3, interagit physiquement avec Nav1.5. Cette interaction est à l'origine d'une diminution de la densité de courant par ubiquitinylation du canal (Abriel et al., 2010).

Pour finir, de nombreuses études suggèrent que le niveau de phosphorylation des tyrosines, contrôlé par un équilibre entre les activités des tyrosines kinases (Syn par exemple) et phosphatases (PTPH1), régule la densité du courant  $I_{Na}$  majoritairement en modulant les propriétés de l'inactivation du canal (Rook et al., 2011).

### *I-6-2-4 Nav1.5 et ses protéines partenaires*

Le canal Nav1.5 fait partie d'un complexe dit macromoléculaire. Il va en effet interagir avec un grand nombre de protéines dites partenaires. Parmi elles, les sous unités accessoires  $\beta 1$  à  $\beta 4$  vont présenter des effets variables sur l'expression et/ou les modulations des propriétés biophysiques du canal en fonction des études (Abriel et al., 2010). Puis, de nombreuses autres protéines partenaires interagissent avec Nav1.5 et peuvent être aussi classées entre 3 grandes familles (Abriel et al., 2010):

- des « ancrés ou adaptateurs » qui vont jouer des rôles dans le trafic et l'expression de Nav1.5 à la membrane plasmique comme l'ankyrine G, la syntrophine, la connexine 43, la N-cadhérine, la SAP97, la plakophiline 2, l' $\alpha$ -actinine 2 et MOG1 (Rook et al., 2011).

- des enzymes qui vont interagir et moduler l'expression ou les propriétés physiques par leurs modifications post traductionnelles comme l'ubiquitine ligase Nedd4-2, la CaMKII ou PTPH1 comme vu précédemment dans la partie sur les modifications post traductionnelles de Nav1.5 (Rook et al., 2011).

- des protéines qui vont moduler les propriétés biophysiques du canal comme 14-3-3 $\eta$ , la cavéoline 3, le facteur FHF1B, la calmoduline, la thélétonine ou la plakophilin 2 (Rook et al., 2011).

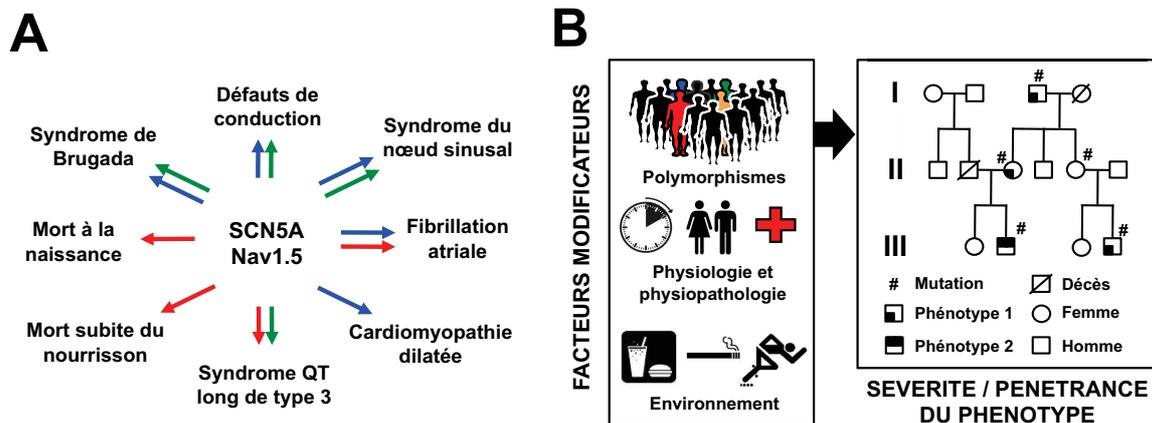
### *I-6-3 Nav1.5 et les cardiomyopathies héréditaires*

Un certain nombre de pathologies cardiaques peut être expliqué en partie par des altérations dans les gènes codant pour des protéines exprimées dans le cœur. On parle alors de cardiomyopathies héréditaires. Depuis 1995, plusieurs centaines de mutations ponctuelles différentes ont été répertoriées pour le gène SCN5A ou les gènes codant pour des protéines régulant Nav1.5. Elles sont associées à de nombreuses pathologies cardiaques (Tfelt-Hansen et al., 2010).

Les mutations, entraînant un gain de fonction de Nav1.5, vont être associées à des pathologies comme le syndrome du QT long de type 3, la fibrillation atriale, la mort à la naissance, le syndrome de mort subite du nourrisson. D'un autre côté, les mutations, conduisant à une perte de l'expression ou de

l'activité de Nav1.5, vont être à l'origine de pathologies comme les troubles progressifs de la conduction. Elles ont été associées au développement d'une fibrose cardiaque (maladie de Lenègre), le syndrome de Brugada, le syndrome du nœud sinusal, de fibrillation atriale et de cardiomyopathies dilatées (Amin et al., 2010 ; Tfelt-Hansen et al., 2010) (Figure 27A).

Cependant malgré cette vision binaire de l'altération de Nav1.5 associée à des pathologies définies comme des entités différentes, il émerge de plus en plus qu'une même mutation peut conduire au développement de différents phénotypes. On parle alors de syndrome de chevauchement. En effet, à titre d'exemple, il apparaît que la mutation 1795insD sur SCN5A exprimée chez les membres d'une même famille va induire une grande variabilité de type et de sévérité de symptômes incluant le syndrome du nœud sinusal, la présence de bradycardie, des défauts de conduction, le syndrome de Brugada et le syndrome du QT long de type 3. Il s'avère que ces symptômes peuvent être isolés ou combinés. Un certain nombre d'études a démontré que ce concept de syndrome de chevauchement se porte à être spécifique du gène SCN5A (Tfelt-Hansen et al., 2010) (Figure 26A).



**Figure 26: Nav1.5 et cardiomyopathies héréditaires.** A, Diagramme reprenant l'association entre les types de mutations de SCN5A et leurs expressions phénotypiques avec les mutations gain de fonction (en rouge), perte de fonction (en bleu) et associées à un syndrome de chevauchement (en vert). B, Schéma récapitulatif de l'implication potentielle de facteurs modificateurs comme les polymorphismes, des facteurs physiologiques ou pathologiques (sexe, âge, pathologie sous jacente) et des facteurs environnementaux (alimentation, tabac, activité sportive, etc.) dans la sévérité, la pénétrance et l'expression phénotypique d'une mutation.

De plus, la pénétrance d'une mutation, soit l'expression phénotypique de celle-ci, n'est pas toujours acquise. En effet, certaines mutations sont facilement identifiables avec une pénétrance de 100% dans le pédigré familial. En revanche, d'autres mutations présentent une pénétrance beaucoup plus faible. Pour le syndrome de Brugada, il a été reporté que la pénétrance de certaines mutations pouvait descendre à 10%. Ceci peut rendre difficile ou impossible toute évaluation pour une mutation comme étant la cause d'une pathologie, ou toute identification de porteur de la mutation qui pourrait développer ou non la pathologie. Ces défauts de pénétrance ne sont encore que partiellement compris. Il se pourrait même que les mutations pour SCN5A ne conduisent pas à la pathologie si elles ne sont

pas co-exprimées avec d'autres polymorphismes ou mises en présence de facteurs environnementaux pouvant induire la pathologie (Tfelt-Hansen et al., 2010). En effet, des études ont montrés que la présence de polymorphismes communs, comme le polymorphisme H558R, est en mesure de moduler les effets de mutations de SCN5A (Gui et al., 2010 ; Poelzing et al., 2006). De plus, pour le syndrome de Brugada comme pour la fibrillation atriale, il y a une grande dépendance de l'âge en lien avec le début de l'apparition des premiers symptômes. Cette observation indique que des facteurs fondamentaux, non identifiés à ce jour, peuvent être impliqués dans une régulation du courant sodique (Tfelt-Hansen et al., 2010) (Figure 26B).

Pour conclure, les mutations du gène SCN5A, modulant l'expression ou l'activité de Nav1.5, vont conduire ou non à une expression phénotypique à l'origine ou contribuant à différentes pathologies. Cependant, les variabilités d'expressions phénotypiques, de pénétrance et de sévérité pour les mêmes mutations préfigurent d'une situation plus complexe qu'une simple pathologie monogénique agrégeant la présence d'une mutation d'un gène à une maladie. En effet, l'expression du panel de polymorphismes par chaque individu, mosaïque de ceux des parents, et l'existence de facteurs environnementaux vont pouvoir être à l'origine de cette situation plus que complexe qui peut masquer, moduler ou exacerber l'expression d'une mutation.

### ***I-6-4 Nav1.5 et les cardiomyopathies acquises d'origine ischémique : l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque***

Depuis plus d'une quinzaine d'années, des études mettent aussi évidence des dysfonctions de Nav1.5 associées à des pathologies acquises communes comme l'infarctus du myocarde (IDM) ou de l'insuffisance cardiaque (IC) (Remme et al., 2010).

#### ***I-6-4-1 Les modifications de Nav1.5 au cours de la phase aigüe de l'IDM***

Comme cela a été décrit dans la partie sur les arythmies associées à l'IDM, les changements métaboliques observés, au niveau du myocarde suite à une ischémie, provoquent une inactivation du courant sodique se traduisant par une diminution de l'excitabilité cardiaque et un ralentissement de la conduction. Ces deux conséquences vont avoir des effets antinomiques avec une réduction du risque d'arythmies ventriculaires dans le cas de l'excitabilité et un effet pro arythmogène pour l'impact sur la conduction (Janse et al., 1989).

Des données réalisées sur la zone épicaudique bordant un IDM de 5 jours chez le chien, zone réputée pour être la source de génération de réentrées rythmiques, ont décrit une réduction de l'activité de Nav1.5 et augmentation de la proportion de cellules avec un marquage absent ou hétérogène pour ce même canal (Baba et al., 2005). Parallèlement, une autre étude a montré que les produits issus de la peroxydation des lipides, ayant lieu au cours de l'ischémie, pouvaient altérer la fonction des canaux sodiques alors qu'ils sont retrouvés abondamment au niveau de la zone bordant l'infarctus à 5 jours chez le chien (Fukuda et al., 2005).

Chez l'homme, l'étude CAST (Cardiac Arrhythmias Suppression Trial), réalisée aux Etats Unis dans les années 1980, a montré qu'un ralentissement de la conduction chez des patients avec un infarctus en phase aiguë, par des bloqueurs des canaux sodiques comme l'encainide ou la flécaïnide, était pro-arythmogène avec une augmentation de 4% de la mortalité par rapport au groupe contrôle (Garratt et al., 1989).

Comme vu précédemment, une prédisposition génétique existe pour la survenue d'arythmies ventriculaires et la mort subite cardiaque au cours d'un IDM. Pour le gène SCN5A, il n'est pas encore reconnu que la présence de mutations et/ou de polymorphismes puisse jouer un rôle déterminant dans la prévalence de mort arythmique au cours de la phase aiguë de l'infarctus (Remme et al., 2010). Néanmoins, plusieurs études commencent à suggérer des liens potentiels:

- 1) il a été observé une association entre la mutation G400A de SCN5A avec perte de fonction et une augmentation de l'apparition d'épisodes d'arythmies ventriculaires avec la nécessité de défibriller à plusieurs reprises au cours des 24 heures suite à un IDM (Du et al., 2007 ; Oliva et al., 2009);

- 2) en 2010, dans une étude portant sur 71 patients inclus pour une mort subite sans cause apparente en dehors de l'hôpital, 6% de ces patients étaient porteurs d'une mutation pour le gène SCN5A en association avec un diagnostic d'une maladie coronarienne cardiaque sévère à l'autopsie (Adabag et al., 2010) ;

- 3) deux plus tard, la mutation E446K de SCN5A, associée au syndrome du QT longs avec une augmentation du courant tardif au niveau électrophysiologique, a été identifiée chez un patient de 88 ans qui a développé de nombreux épisodes de torsades pointées dans le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour suite à un IDM avec une prolongation de son intervalle QT corrigé par rapport au jour de son admission en soin intensif (Crotti et al., 2012) ;

- 4) plus récemment, une étude a comparé la présence de mutations et de polymorphismes pour le gène SCN5A entre des patients en phase aiguë de l'IDM associée avec ou non l'apparition de FV. Elle a décrit la présence d'une mutation pour SCN5A chez 2 patients parmi les 46 associés avec l'apparition de FV. Ces deux mutations n'ont pas été retrouvées chez les patients ne présentant pas de FV et dans la population contrôle (Boehringer et al., 2014).

Donc, à la vue de ces observations, il est suggéré une interaction pro arythmogène entre une dysfonction de canaux sodiques et une ischémie du myocarde (Remme et al., 2010).

### *I-6-4-2 Les modifications de Nav1.5 au cours de l'insuffisance cardiaque*

Comme décrit auparavant, l'insuffisance cardiaque (IC) est associée à un fort taux de mortalité dû soit à une altération terminale de la fonction « pompe » du cœur, soit à l'apparition d'arythmies ventriculaires létales (Remme et al., 2010). Une altération des propriétés électrophysiologiques par un changement du profil d'expression des canaux ioniques et des jonctions GAP est aussi décrite (Nattel et al., 2007).

Plusieurs mécanismes, comme la prolongation de la durée du PA *via* des réductions des canaux potassiques ou des altérations de l'homéostasie calcique, vont prédisposer au développement d'arythmies ventriculaires au cours de l'IC (Janse et al., 2004). Cependant, une augmentation du courant sodique retardé au cours de la phase de plateau peut aussi augmenter la durée du PA. A partir de biopsies du myocarde de patients insuffisants cardiaques de classes NYHA III et IV et de biopsies issues d'un modèle canin d'IC par électrostimulation, il a été montré chez les deux espèces une baisse de la densité de courant au pic de  $I_{Na}$  et une apparition d'un courant sodique retardé  $I_{Na,Late}$  par rapport à la condition contrôle. Ce courant tardif est associé à une augmentation de la fraction des canaux qui n'entre pas dans leur état d'inactivation au cours de la phase de plateau du PA (Valvidia et al., 2004). Plus tard, le même groupe de recherche a montré que le courant  $I_{Na,Late}$  augmenté et ralenti dans l'IC, conduisait à une variabilité de la durée du PA battement à battement, et était développé majoritairement par le canal Nav1.5 (Matltsev et al., 2007). Cette augmentation du courant  $I_{Na,Late}$  peut prolonger la durée du PA et altérer l'homéostasie intracellulaire en  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ , une source arythmogène comme décrit précédemment dans les arythmies associés à l'IDM. En ce qui concerne le mécanisme, il a été récemment montré que les espèces réactives de l'oxygène, pour rappel générées au cours de l'IDM et contribuant au remodelage ventriculaire gauche et ses conséquences comme l'insuffisance cardiaque, vont activer la voie  $Ca^{2+}$ - Calmoduline CaMKII augmentant le courant  $I_{Na,Late}$  (Wagner et al., 2011 ; Herren et al., 2013) impliquant une potentielle association la CaMKII avec Nav1.5 et la phosphorylation du canal (Wagner et al., 2006).

A l'opposé de l'élévation du courant  $I_{Na,Late}$ , une perte de fonction pour les canaux Nav1.5 est souvent associée à l'IC pouvant mener à un ralentissement de la conduction et des arythmies ventriculaires par des phénomènes de réentrées. Cette altération de la disponibilité des canaux sodiques peut résulter de différentes causes qui vont varier en fonction de l'espèce, du modèle et des conditions expérimentales. Dans certaines études, une diminution de la transcription du gène SCN5A a été observée (Borlak et al., 2003 ; Shang et al., 2007). Cette diminution est corroborée par des études montrant une régulation négative de l'expression du gène SCN5A par les facteurs de transcription comme NF $\kappa$ B ou Foxo1 dans des conditions de stress oxydant retrouvées dans l'IC (Shang et al., 2008 ; Mao et al., 2012). Cependant dans d'autres cas, l'expression de SCN5A a été décrite comme non modifiée (Zicha et al., 2004), voir augmentée (Partemi et al., 2012).

Plus précisément en ce qui concerne la régulation des ARNm Scn5a, le groupe Samuel C. Dudley Jr a mis en évidence, au cours de l'insuffisance cardiaque uniquement chez l'homme, une augmentation des épissages alternatifs de l'exon 28 A par les exons 28B à D, codant pour des formes tronquées, impliquant l'augmentation de 2 facteurs d'épissage, RBM 25 et LUC7F3, en présence d'angiotensine II, d'hypoxie ou d'un stress oxydant (Shang et al., 2007 ; Gao et al., 2011). Dans une étude pilote réalisée sur des patients insuffisants cardiaques ayant eu une implantation appropriée ou non d'un défibrillateur cardiaque un an auparavant, le même groupe a montré une forte association entre l'expression tissulaire et celle des globules blancs circulants pour ces variants de l'exon 28. Il a

aussi été mis en évidence que l'augmentation du niveau d'expression circulant des variants 28C et D corrélait avec les patients insuffisants cardiaques ayant eu une implantation appropriée du défibrillateur, mais aussi avec une classe NYHA de 3 ou 4, et une durée de QRS plus élevée (Gao et al., 2014). Après une confirmation de ces résultats sur la base d'une plus grande population, cette étude pourrait être le fondement de la mise en place des variants de l'exon 28 de SCN5A comme biomarqueurs sériques pour l'évaluation du risque d'arythmies et d'implantation de défibrillateurs chez les patients insuffisants cardiaques.

Il a aussi été montré qu'un défaut de glycosylation de Nav1.5 pouvait être en lien avec les altérations du courant sodique observées dans le cas d'un modèle murin d'IC d'origine non ischémique (Ufret-Vincenty et al., 2001). De plus, l'élévation intracellulaire en calcium caractéristique de l'IC pourrait être une source de réduction du courant sodique par une régulation directe des canaux sodiques par le  $Ca^{2+}$  ou la calmoduline (Casini et al., 2009).

Les différences de nombreux facteurs comme l'espèce, la zone de tissu investiguée, l'étiologie et le stade de la pathologie peuvent expliquer la grande variabilité des résultats observés dans l'expression des ARNm de SCN5A, de l'expression et des régulations biophysiques de Nav1.5 au cours de l'insuffisance cardiaque (Herren et al., 2013). Donc, à partir de l'ensemble de ces données, il apparaît que la (dys)fonction des canaux sodiques Nav1.5 s'avère être très complexe et peut avoir des impacts sur l'arythmogénicité du myocarde par ces différentes voies.

## **II- Les objectifs généraux de la thèse**

### **II-1 Présentation du travail de synthèse sur le contexte de mon sujet de thèse**

Au delà du gène SCN5A abordé tout au long de mon manuscrit, la présence de mutations et de polymorphismes sur de nombreux gènes peut être responsable de troubles de l'activité électrique cardiaque et de cardiomyopathies structurales.

Ce contexte faisant partie des fondements de mon sujet de thèse, un de mes objectifs a été de participer à la réalisation d'un travail de synthèse portant sur les associations entre la présence de mutations ou polymorphismes sur des gènes et le développement de pathologies cardiaques comme la mort subite ou l'insuffisance cardiaque.

### **II-2 Participation à la caractérisation du modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup>**

Suite à la dernière publication portant sur l'identification des phénotypes mineur et sévère au sein du modèle murin d'inactivation hétérozygote pour le gène SCN5A (Scn5a<sup>+/-</sup>), les objectifs de mon équipe ont été de caractériser plus en détails le développement du remodelage cardiaque chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> au cours du vieillissement aux niveaux fonctionnel, structural et moléculaire.

Dans le cadre de ces travaux d'équipe, j'ai eu pour objectifs de réaliser une caractérisation transcriptomique afin d'identifier des voies de signalisation associés au développement de la fibrose et au défaut de conduction chez les animaux invalidés à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A au cours du vieillissement. De plus, j'ai aussi participé aux caractérisations fonctionnelle et structurale par échocardiographie de ce modèle.

### **II-3 Projet n°1 : Etude des implications du gène SCN5A dans la survenue des arythmies et des remodelages ventriculaires observés lors d'un infarctus du myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire**

Comme décrit au cours de mon introduction, de nombreuses études ont commencé à décrire une interaction potentielle entre la présence de mutations pour le gène SCN5A et la survenue de troubles du rythme après un événement d'ischémie cardiaque.

A mon arrivée dans l'équipe, j'ai eu pour objectif de mettre en place une démarche expérimentale, à l'aide du modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup>, afin d'étudier les implications éventuelles d'une perte de fonction de la protéine Nav1.5 sur la survenue de troubles du rythme ventriculaire en phase aiguë d'un infarctus du myocarde (IDM) et au cours des remodelages ventriculaires post-IDM.

**II-4 Projet n°2 : Caractérisation de la structure et de la fonction cardiaque d'un nouveau modèle murin exprimant la mutation humaine T220I responsable d'une perte de fonction modérée pour Nav1.5.**

En parallèle des études portant sur le modèle d'inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A, mon équipe a fait l'acquisition d'un modèle murin surexprimant la mutation humaine T220I pour le canal sodique Nav1.5.

A son arrivée dans notre laboratoire, j'ai eu pour objectif de participer à l'étude de ce nouveau modèle murin, et plus précisément, en réalisant les caractérisations fonctionnelle et structurale par échocardiographie, ainsi que la caractérisation électrocardiographique par télémétrie et ECG de surface chez l'animal non vigile.

**II-5 Projet n°3 : Caractérisation de l'expression et fonctionnelle pour Nav1.5 dans le poumon chez la souris**

Une étude prospective sur différents tissus de l'organisme a permis d'identifier l'expression de l'ARN messager du gène SCN5A dans les poumons chez la souris.

Dans la continuité du projet portant sur les implications du gène SCN5A dans les remodelages post-IDM, il a été décidé de réaliser une caractérisation plus fouillée de l'expression du gène SCN5A et son expression protéique au niveau pulmonaire en comparaison avec notre tissu de référence, le cœur. En parallèle, une caractérisation fonctionnelle pulmonaire a été effectuée à partir de nos modèles murins d'inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A ou surexprimant la mutation T220I pour établir un rôle potentiel de Nav1.5 dans la fonction pulmonaire. Dans la partie projet n°3 de mon manuscrit, le contexte et les résultats de ces travaux seront présentés en détails.

**II-6 Projet n°4 : Caractérisation d'une cardiomyopathie dans un modèle murin d'inactivation pour le gène BSCL2.**

Au cours de ma thèse, j'ai été amené à collaborer avec l'équipe du professeur Bertrand Cariou, et plus particulièrement le docteur Xavier Prieur, pour mes compétences théoriques et techniques sur les évaluations moléculaire et fonctionnelle d'un remodelage cardiaque.

Les objectifs de cette collaboration ont été de caractériser la fonction et la structure cardiaque d'un nouveau modèle murin de lipodystrophie liées à l'inactivation homozygote du gène BSCL2. Les travaux résultant de cette collaboration font l'objet du projet n°4 de mes travaux de thèse.

### **III- Présentation du travail de synthèse portant sur les différents impacts fonctionnels de variations génétiques associées à l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme et la mort subite cardiaque**

Ce travail de synthèse est répertorié dans l'annexe n°1.

#### **III-1 Le contexte ayant défini le sujet de ce travail de synthèse**

Au cours de mon doctorat, j'ai pu m'imprégner de la littérature portant sur l'association entre les cardiomyopathies congénitales et acquises, arythmiques et/ou structurales, et des altérations de la protéine Nav1.5. Au travers de ce travail, j'ai ainsi pu percevoir la diversité et la complexité des mécanismes physiopathologiques liés à des mutations ou des polymorphismes, modulant le phénotype et/ou la sévérité des pathologies associés à ces variations génétiques. Au fil de mes lectures, j'ai pu constater que des variations génétiques, au delà de notre gène candidat, étaient décrites et illustraient l'altération de divers mécanismes biologiques dans le développement de pathologies congénitales et acquises, comme l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme et la mort subite.

#### **III-2 Les objectifs de ce travail de synthèse**

Dans cet optique, au cours de ma 2<sup>ème</sup> année de doctorat, nous avons soumis une revue au journal « *Frontiers in physiology* » nommée « *Identifying potential functional impact of mutations and polymorphisms : linking heart failure, increased risk of arrhythmias and sudden cardiac death.* ». Cette revue a été acceptée et publiée en septembre 2013.

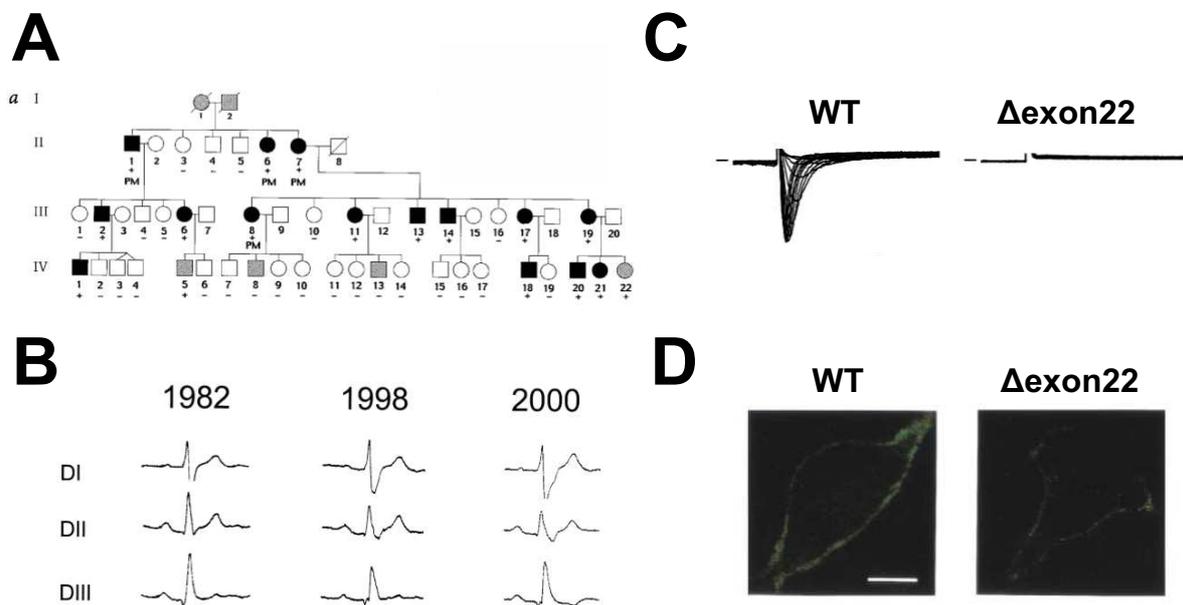
L'esprit de ce travail s'est voulu à caractère pédagogique. Nous avons abordé un certain nombre d'exemples mettant en situation des mutations et/ou des polymorphismes de gènes connus pour être directement liés ou non à l'insuffisance cardiaque, aux troubles du rythme et à la mort subite. Par ces exemples, nous avons pu établir une liste non exhaustive des différents mécanismes moléculaires pouvant conduire à différents impacts fonctionnels qui pouvaient découler de ces variations génétiques. Allant « du gène à la fonction », modulant l'expression ou l'activité des protéines encodées, ces mécanismes peuvent conduire à des pathologies cardiovasculaires plus ou moins sévères.

L'objectif de notre rédaction a été d'apporter une vision actualisée, didactique et relativement complète sur la complexité mécanistique entourant l'association de la génétique, l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme et la mort subite.

## IV- Le modèle murin d'invalidation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A: antériorités et contributions personnelles

### IV-1 Ce que l'on savait du modèle *Scn5a*<sup>+/-</sup>

En 1999, Schott et ses collaborateurs, chercheurs au sein de l'institut du thorax, ont identifié le gène SCN5A comme étant le premier gène où une mutation pouvait être responsable de la maladie de Lenègre. Cette pathologie est définie comme une dégénérescence progressive du tissu de conduction cardiaque au cours du vieillissement (Charpentier et al., 2012). *Via* une approche génétique conduite chez une grande famille française présentant de nombreux cas de bloc de la conduction cardiaque (Figure 27A), ces auteurs ont pu identifier une mutation sur le gène SCN5A avec une transmission autosomique dominante et s'agrégeant totalement avec l'apparition des troubles de la conduction. Cette mutation a été décrite comme une substitution d'une thymine en cytosine, au niveau d'un site donneur d'épissage alternatif hautement conservé au niveau de l'intron 22 du gène SCN5A. Cette substitution pourrait conduire à la génération d'un ARN messager avec un saut de l'exon 22, causant potentiellement la production d'une forme protéique de Nav1.5 ayant perdue son segment S4 dans le domaine DIII, un segment chargé en acides animés chargés positivement et sensibles au potentiel (Schott et al., 1999).



**Figure 27: Insuffisance haplotypique de Nav1.5 et maladie de Lenègre.** A, Arbre phylogénétique de la famille explorée (Schott et al.,1999). B, Evolution du défaut de conduction d'un membre de la famille au cours du temps (Probst et al., 2003). C, Caractérisation électrophysiologique de l'expression de la mutation de SCN5A identifiée dans la famille (Probst et al., 2003). D, Adressages membranaires des formes de Nav1.5 sauvage ou délétée pour l'exon 22 (Probst et al., 2003).

#### *IV- Modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup> et vieillissement*

En 2003, Probst et ses collaborateurs ont confirmé : 1) l'existence du saut de l'exon 22 en présence de cette mutation ; 2) l'insuffisance haplotypique de Nav1.5 avec une délétion de l'exon 22 conduisant à une perte totale du courant sodique voltage dépendant (Figure 28C) malgré une expression membranaire de la protéine non modifiée (Figure 28D). Les auteurs ont donc clairement associé cette insuffisance haplotypique avec l'apparition progressive des troubles de la conduction, au cours du vieillissement (Figure 27B), confirmant ainsi les travaux de Schott et ses collaborateurs (Probst et al. 2003).

Entre temps, les mêmes auteurs avaient également identifié la mutation G1406R, correspondant à une substitution d'une guanine en thymine située en position 4372 dans l'exon 23 de SCN5A. Comme pour le premier exemple précédemment décrit, cette substitution a été associée à une perte totale du courant sodique dans un système de réexpression hétérologue, et son agrégation avec le phénotype des membres d'une autre grande famille française présentant des défauts de conduction ou un syndrome de Brugada (Kyndt et al., 2001).

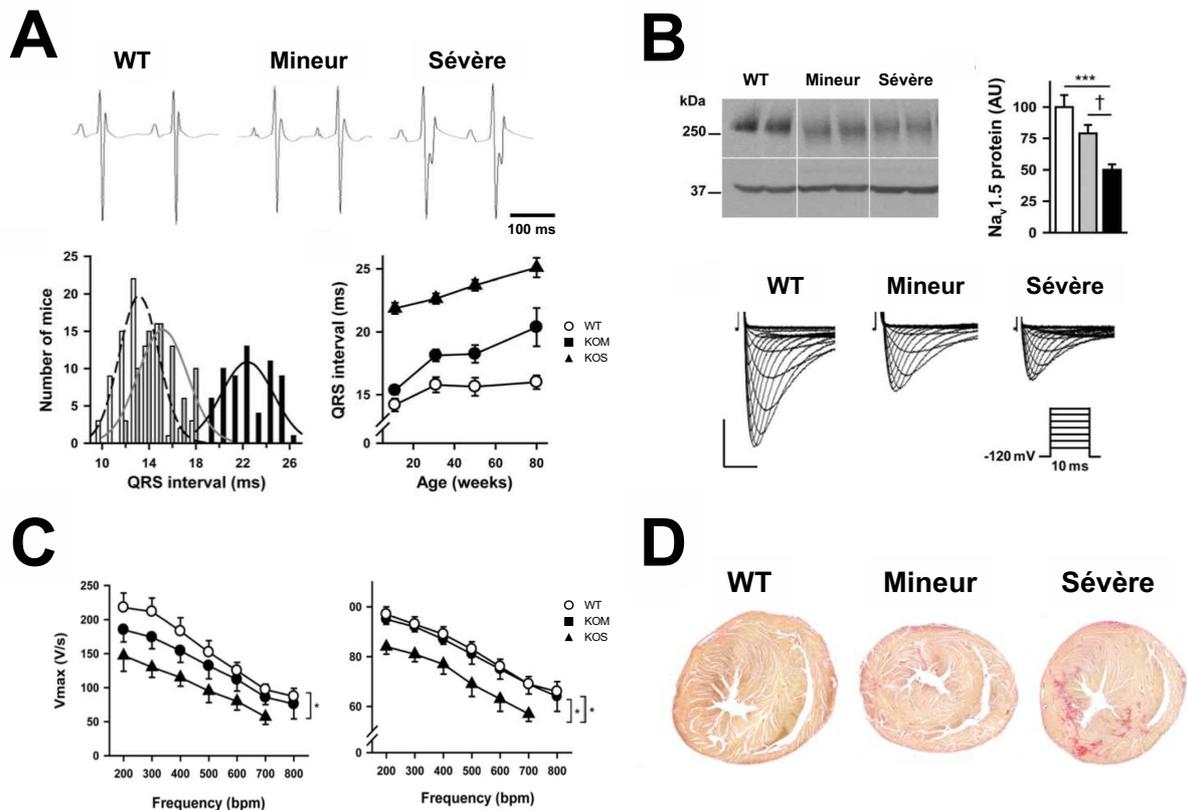
Dans ce contexte suggérant un rôle primordial pour le canal sodique Nav1.5, avec l'identification de nombreuses mutations pour le gène SCN5A associées avec le développement de cardiomyopathies et de troubles du rythme, en 2002, Papadatos et ses collaborateurs ont généré et caractérisé un modèle murin d'inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A. Au cours de ce travail, les auteurs ont pu montrer qu'une perte d'expression totale de Nav1.5 s'avère être létale au stade embryonnaire et qu'une inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A est associée à une réduction des conductions atriale et atrio-ventriculaire, ainsi qu'à une perte des excitabilités atriale et ventriculaire (Papadatos et al., 2002).

A la vue de ces premières données de caractérisation, mon équipe d'accueil a pu travailler sur ce modèle murin et s'est attachée à identifier les causes de ces altérations électrocardiographiques. Ce travail a été réalisé dans le cadre du réseau européen « EugTrigTreat » visant à identifier les causes, les mécanismes et des solutions thérapeutiques pour les pathologies rythmiques et structurales. Ainsi, la contribution du canal Nav1.5, dans l'initiation et la propagation de l'influx électrique cardiaque, les mécanismes physiopathologiques responsables des symptômes observés chez des patients atteints du syndrome de Brugada ou de la maladie de Lenègre, ont pu être étudiés.

Mon équipe a ainsi pu retrouver la présence de ralentissements de la conduction atriale, atrio-ventriculaire et ventriculaire chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> à des âges jeunes comme précédemment décrits (Royer et al., 2005). De plus, ces différences sont conservées au cours du vieillissement. Ces observations soulignent la relevance de ce modèle pour étudier la maladie de Lenègre (Charpentier et al., 2012). En parallèle de ces défauts de conduction cardiaque, le développement d'une fibrose cardiaque interstitielle et périvasculaire hétérogène a également été observé dans le myocarde des

animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup>. Cette fibrose est associée avec une relocalisation de la connexine 43 sans modification de l'expression totale de cette dernière (Royer et al., 2005 ; van Veen et al., 2005).

Toujours au cours de ce travail, mon équipe a pu mettre en évidence des variations dans la pénétrance au niveau de la conduction cardiaque chez les animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup>. Ces variations conduisent à l'identification de deux populations d'individus en fonction de la répartition des QRS. Des animaux de phénotype dit « mineur » (KOM) présentant une légère élévation du QRS (< 19 ms) sont différenciés d'un phénotype « dit plus sévère » (KOS) caractérisé par un élargissement important du complexe QRS (≥ 19 ms) par rapport aux animaux sauvages. Cette différence, qui est conservée au cours du vieillissement (Figure 28A), a été corrélée au niveau d'expression protéique pour Nav1.5 avec notamment des réductions de 25 et 50% de Nav1.5 observées respectivement chez les animaux KOM et KOS. Néanmoins, ces différences d'expression protéique n'ont pas été retrouvées au niveau fonctionnel. Des diminutions similaires du courant sodique ont été enregistrées pour des cardiomyocytes isolés à partir de cœurs d'animaux KOM et KOS (Figure 28B).



**Figure 28: Pénétrance et invalidation à l'état hétérozygote du gène SCN5A chez la souris.** **A**, Tracés ECG représentatifs d'animaux sauvages (WT), *Scn5a*<sup>+/-</sup> de phénotypes mineur (KOM) et sévère (KOS). Répartition des valeurs de QRS et évolution au cours du vieillissement. **B**, Expressions protéiques de Nav1.5 dans le cœur et enregistrements du courant sodique à partir de cardiomyocytes WT, KOM et KOS. **C**, Vitesses maximales d'ascension et amplitudes du potentiel d'action ventriculaire chez des animaux WT, KOM et KOS. **D**, Coupes histologiques de cœur colorées au rouge Sirius représentatives du développement de fibrose observé chez des animaux WT, KOM et KOS âgés de 85 semaines. (Modifiées à partir de Leoni et al., 2010).

#### ***IV- Modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup> et vieillissement***

Au delà de ces observations, ces deux phénotypes diffèrent sur d'autres points. Ainsi, des arythmies ventriculaires sous anesthésie ont été observées uniquement chez les animaux KOS. Parallèlement, l'amplitude et la vitesse de dépolarisation maximale du potentiel d'action ventriculaire s'avèrent être plus réduites chez les animaux KOS, tandis que celles des KOM sont proches de celles enregistrées pour les animaux sauvages ou dans une situation intermédiaire (Figure 28C). Enfin, une fibrose plus importante est observée chez les KOS à 85 semaines (Figure 28D) (Leoni et al., 2010).

En dehors des défauts progressifs de la conduction ventriculaire, de nombreuses études ont aussi portées sur les autres aspects observés initialement sur les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>.

En 2002, Papadatos et ses collaborateurs avaient montré chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> une susceptibilité aux troubles du rythme avec l'induction de tachycardies ventriculaires sur deux tiers des cœurs isolés, perfusés sous stimulation ventriculaire programmée. Cette observation a fait que ces souris ont été utilisées comme modèle d'étude afin d'identifier les mécanismes des troubles du rythme observés chez les patients présentant un syndrome de Brugada. Depuis, les potentiels d'action monophasiques, enregistrés à partir de cœurs isolés, perfusés et soumis à des protocoles de stimulation programmée, ont montré : 1) une susceptibilité à l'induction d'arythmie au niveau de la chambre de chasse du ventricule droit et 2) des augmentations d'hétérogénéité transmurale et régionale de la durée des potentiels d'action et des périodes réfractaires dans ce même ventricule. Les durées les plus courtes ont été enregistrées au niveau de la chambre de chasse (Stokoe et al., 2007; Martin et al., 2010a; Martin et al., 2010b; Martin et al., 2011a; Martin et al., 2011b; Martin et al., 2011c; Charpentier et al., 2012).

Parallèlement les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> ont rendu possible la compréhension du rôle de Nav1.5 dans la fonction du nœud sinusal et les mécanismes physiopathologiques de ses dysfonctions. Il a ainsi pu être montré que les souris Scn5a<sup>+/-</sup> présentent une légère bradycardie associée à des blocs sino-atriaux au cours du vieillissement. Ainsi, un ralentissement de la conduction et de nombreux blocs sino-atriaux ont pu être enregistrés à partir de préparations de nœud sinusal de souris KO. Ces observations sont concordantes avec la diminution de l'expression de Nav1.5 décrites pour les cellules de la zone périphérique du nœud sinusal, cellules qui présentent une réduction du rythme intrinsèque de l'activité pacemaker (Lei et al., 2005). Depuis, il a été confirmé que l'âge et la déficience en Nav1.5 altèrent la fonction de ce nœud sinusal *via* un remodelage électrique associé à une fibrose induite par la voie du TGF- $\beta$  (Hao et al., 2011).

#### **IV-2 Mes contributions aux travaux de caractérisation sur le modèle Scn5a<sup>+/-</sup>**

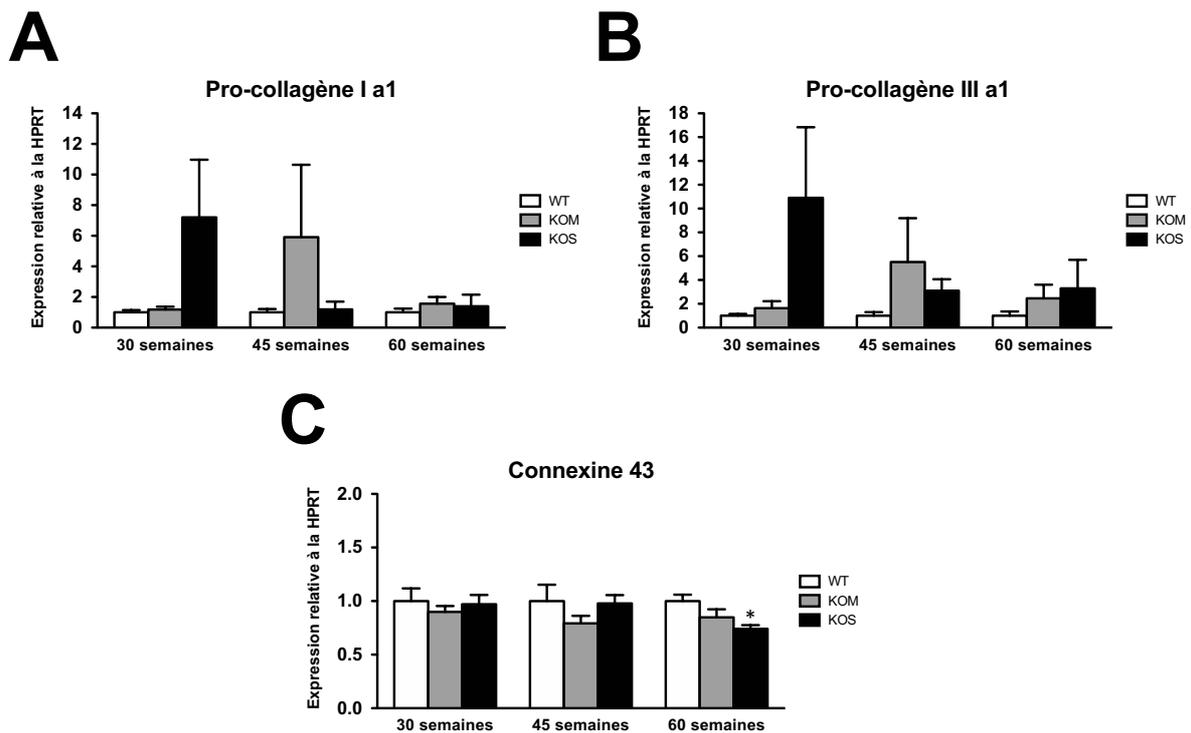
Suite à la dernière publication en 2010 (Leoni et al., 2010), mon équipe s'est attachée à explorer les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans le développement de la fibrose au cours du vieillissement chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>.

Dans un travail en cours d'écriture (Derangeon et al., page 176 à 205), nous avons montré que le développement de la fibrose avait lieu entre 45 et 60 semaines. Bien qu'il a été noté qu'aucune différence n'a été observée entre les souris KOM et KOS à l'âge de 60 semaines, un développement majoré de cette dernière a été observé à 85 semaines chez les animaux KOS. Des activations des voies de signalisation décrites comme étant canoniques pour la fibrose, comme celles du CTGF, de SPARC et du TGF- $\beta$ , ont été retrouvées. Parallèlement, nous avons observés que les animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> présentaient jusqu'à 30 semaines une augmentation de l'expression protéique de la connexine 43, avec une normalisation de cette dernière à 45 semaines.

#### IV-2-1- Caractérisations transcriptomiques

##### IV-2-1-1 Approches par PCR quantitative

Dans ce cadre, mon travail à consister à évaluer les niveaux d'expression en ARNm des pro-collagènes de type I et III, majoritairement exprimés dans le cœur, à partir de préparations de paroi libre issue de ventricule gauche. Ces évaluations ont été conduites afin de savoir si l'augmentation de la fibrose pouvait s'expliquer par une transcription accrue des messagers codant pour ces collagènes chez les animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup>. Le même travail de caractérisation a été réalisé pour la connexine 43.



**Figure 29: Evaluations transcriptomiques de la fibrose et conduction cardiaques dans le modèle murin *Scn5a*<sup>+/-</sup> au cours du vieillissement.** Expression des ARNm du pro-collagène Ia1 (A), du pro-collagène IIIa1 (B) et de la connexine 43 (C) ( $n=5$  par condition; \* $p<0,05$  vs WT respectivement; KOM: animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> avec un phénotype mineur; KOS: animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> avec un phénotype sévère).

Comme indiquées dans la figure 29, les quantifications de l'expression des transcrits codant pour les pro-collagènes I et III se sont montrées très hétérogènes. Nous avons ainsi été dans l'impossibilité d'expliquer le développement de la fibrose par une augmentation de la synthèse des transcrits d'intérêt. Ces résultats suggèrent que le phénotype pro-fibrotique décrit ne s'explique pas par une régulation transcriptionnelle.

Au delà de la synthèse, la formation de fibres de collagène implique de nombreuses étapes faisant intervenir un certain nombre de protéines et enzymes. Ainsi, la lysyl-oxydase (LOX) a été décrite comme une enzyme intervenant dans la liaison des fibres de collagène, les rendant insolubles et résistantes à la dégradation. De manière intéressante, l'expression de cette enzyme a été retrouvée augmentée à partir de préparations de fibroblastes de rat et humains *via* une stabilisation de son ARNm par la voie du TGF- $\beta$  (Lopez et al., 2010). Comme, ce facteur de croissance est augmenté à partir de 45 semaines dans notre modèle, il serait maintenant pertinent de caractériser l'expression et/ou activité de cette enzyme.

En ce qui concerne la connexine 43, les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> présentent une augmentation transitoire de l'expression protéique jusqu'à 30 semaines, expression qui se normalise à 45 semaines. Notre caractérisation moléculaire a permis d'exclure toute régulation transcriptionnelle dans cette cinétique. En effet, seule une baisse significative de 25% a été observée chez les animaux KOS à 60 semaines (*Figure 29C ; WT-60 semaines, n=5, 1,00±0,06 ; KOM-60 semaines, n=5, 0,84±0,07 ; KOS-60 semaines, n=5, 0,74±0,03 ; \*p<0,05 vs WT*). Ainsi, l'augmentation transitoire et la normalisation observées semblent résulter d'une régulation post transcriptionnelle qui reste à être identifiée.

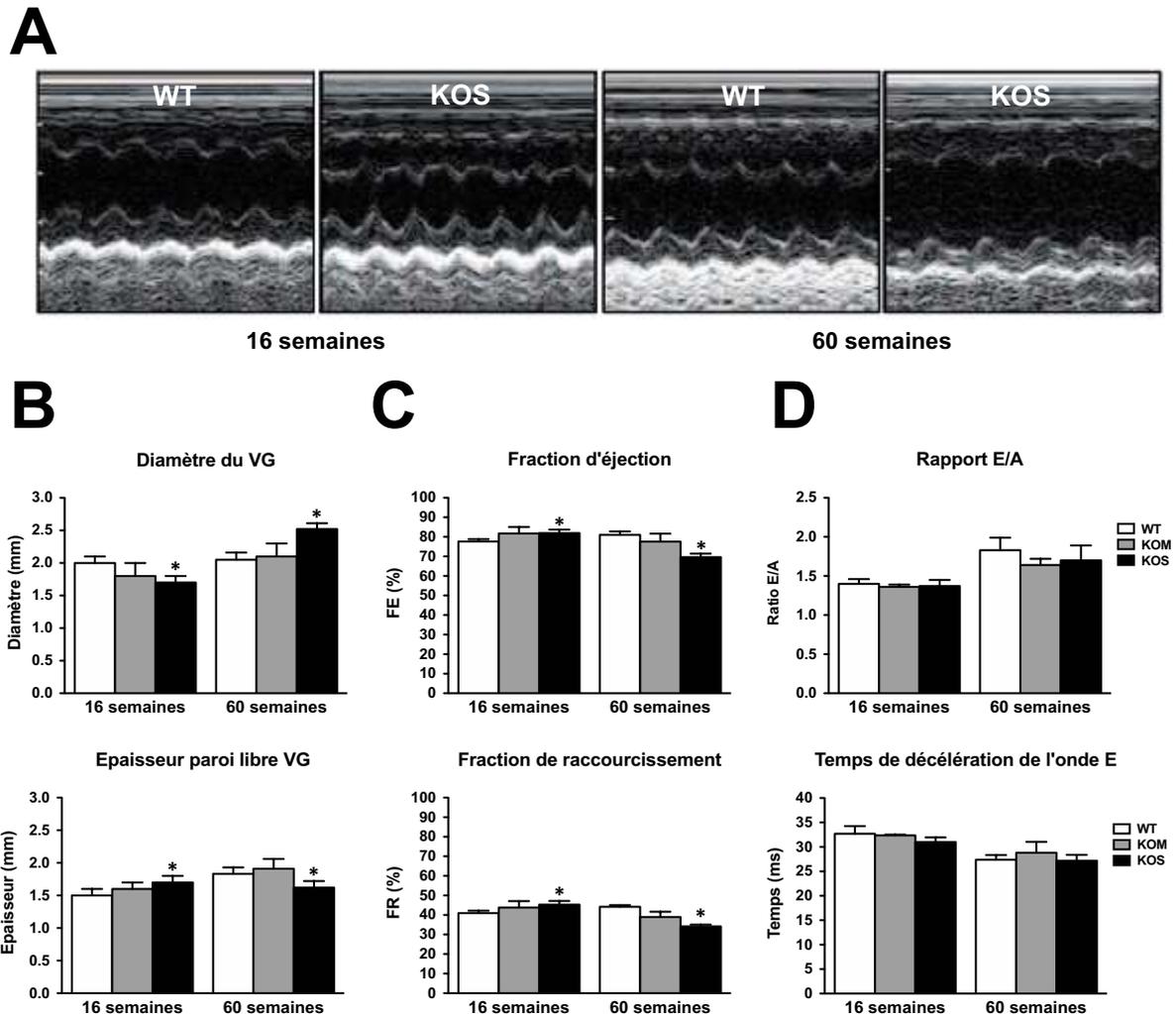
##### *IV-2-1-1 Approche par RNASeq*

Dans le cadre du projet METATRANS en collaboration avec l'équipe « Variabilité génétique et mort subite » de Richard REDON de l'institut thorax, nous avons mis en place une étude transcriptomique à haut débit sur la base de la technologie du RNASeq. Les préparations étudiées ont été obtenues à partir de parois libres de ventricule gauche issus d'animaux WT, KOM et KOS à des âges différents (6, 20 et 45 semaines). L'approche RNASeq, nouvelle génération de séquençage du transcriptome, a été menée avec un double objectif : identifier 1) des différences d'expressions géniques et 2) l'impact du vieillissement sur les deux phénotypes « mineur » et « sévère » observés pour le modèle Scn5a<sup>+/-</sup>.

Cette technologie, nouvellement acquise au laboratoire, nécessite une période de mise au point avec une démarche standardisée associée avec le développement d'outils d'analyse informatiques adaptés. Ayant menée la partie « humide » de ce travail, notre équipe de bio-informaticiens traite actuellement les données générées. Ces résultats devraient apporter une vision à la fois plus large et intégrée des régulations transcriptionnelles mises en jeu dans notre modèle, permettant d'appréhender, d'intégrer et de comprendre le(s) mécanisme(s) pouvant expliquer la différence de pénétrance et l'effet du vieillissement chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>.

IV-2-2- Caractérisation échocardiographique

Au début de ma thèse, ayant contribué à la mise en place de la plateforme d'échocardiographie au sein de ma structure, j'ai pu ainsi participer aux caractérisations structurale et fonctionnelle de notre modèle.



**Figure 30: Evaluations échocardiographiques des remodelages structuraux et fonctionnels du modèle murin *Scn5a*<sup>+/-</sup> au cours du vieillissement.** Illustrations d'acquisition en temps-mouvement à partir d'incidences en petit axe à 16 semaines et 60 semaines (A). Remodelages structural (B), systolique (C) et diastolique (D) (*WT-16semaines*, *n*=23 ; *KOM-16semaines*, *n*=10 ; *KOS-16semaines*, *n*=12 ; *WT-60semaines*, *n*=6 ; *KOM-60semaines*, *n*=7 ; *KOS-60semaines*, *n*=6 ; \**p*<0,05 vs *WT* respectif) (*KOM*: animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> avec un phénotype mineur; *KOS*: animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> avec un phénotype sévère; *VG*: Ventricule gauche).

J'ai aussi pu mettre en évidence un remodelage concentrique chez les animaux *KOS* à l'âge de 16 semaines. Ce remodelage se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la paroi libre (Figure 30B ; *WT*, *n*=23, 1,5±0,1 mm ; *KOS*, *n*=12, 1,7±0,1 mm ; \**p*<0 05 vs *WT*) associée à une réduction du diamètre du ventricule gauche (Figure 30B ; *WT*, *n*=23, 2,0±0,1 mm ; *KOS*, *n*=12, 1,7±0,1 mm ; \**p*<0 05 vs *WT*) sans modification gravimétrique (*WT*, *n*=23, 9,17±0,34g/mm ; *KOS*, *n*=12,

#### IV- Modèle murin *Scn5a*<sup>+/-</sup> et vieillissement

8,87±0,35 g/mm). Comme attendu pour ce type de remodelage, de légères augmentations des fractions d'éjection (Figure 30C; WT, n=23, 77,63±1,18 % ; KOS, n=12, 81,92±1,79 % ; \*p<0 05 vs WT) et de raccourcissement (Figure 30C; WT, n=23, 40,96±1,24 % ; KOS n=12, 45,31±1,90 % ; \*p<0 05 vs WT) ont été observées chez les animaux KOS.

En revanche, le temps de décélération de l'onde E (Figure 30D; WT, n=23, 32,7±1,56 ms; KOS, n=12, 31,01±0,94 ms) et le rapport de l'onde E sur l'onde A (Figure 30D ; WT, n=23, 1,40±0,06 ; KOS, n=12, 1,37±0,08) du flux mitral ne sont pas modifiés chez ces mêmes animaux, traduisant l'absence de dysfonction diastolique. Il est à noter que les animaux KOM présentent, une nouvelle fois, un phénotype intermédiaire.

A 60 semaines, parallèlement au développement d'une fibrose précédemment décrite, synonyme de remodelage, j'ai pu mettre en évidence uniquement chez les animaux KOS un amincissement des parois ventriculaires (Figure 30B ; WT, n=6, 1,83±0,10 mm ; KOS, n=6, 1,62±0,10 mm ; \*p<0 05 vs WT), une dilatation de la cavité du ventricule gauche (Figure 30B ; WT, n=6, 2,05±0,11 mm ; KOS, n=6, 2,52±0,08 mm ; \*p<0 05 vs WT) et une gravimétrie cardiaque inchangée (WT, n=10, 11,17±0,36 g/mm ; KOS, n=10, 11,11±0,34 g/mm). Ces remodelages structuraux, suggérant un dilatation ventriculaire modérée, sont associés à des baisses modestes des fractions d'éjection (Figure 30C; WT, n=6, 81,00±1,79 % ; KOS, n=6, 69,67±1,76 % ; \*p<0 05 vs WT) et de raccourcissement (Figure 30C ; WT, n=6, 44,20±0,88 % ; KOS, n=6, 34,17±0,87 % ; \*p<0 05 vs WT) sans dysfonction diastolique (Figure 30D). Les animaux KOM présentent toujours un phénotype intermédiaire.

De manière intéressante, une approche d'imagerie par résonance magnétique, conduite chez des patients atteints du syndrome de Brugada, a montré que les porteurs de mutations faux-sens ou conduisant à une troncation de Nav1.5 présentaient une dilatation et une dysfonction systolique des ventricules gauche et droit (van Hoorn et al., 2012). Cette publication souligne une nouvelle fois la pertinence de notre modèle murin dans l'étude et la compréhension des mécanismes mis en place dans les pathologies associées à une perte de fonction pour Nav1.5.

## **V- Projet n°1 : Etude des implications du gène SCN5A dans la survenue des arythmies et des remodelages ventriculaires observées lors d'un infarctus du myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire**

**Equipe 1 « Cardiopathies et mort subite » dirigée par le Dr Charpentier**

### **Contexte**

Comme décrit précédemment dans mon introduction, seules quelques études cliniques sporadiques avec une très faible proportion de sujets montrent des liens ténus entre des événements de maladie coronarienne ou ischémique et la survenue de troubles du rythme ventriculaire associés à la survie de patients porteurs de mutations pour le gène SCN5A.

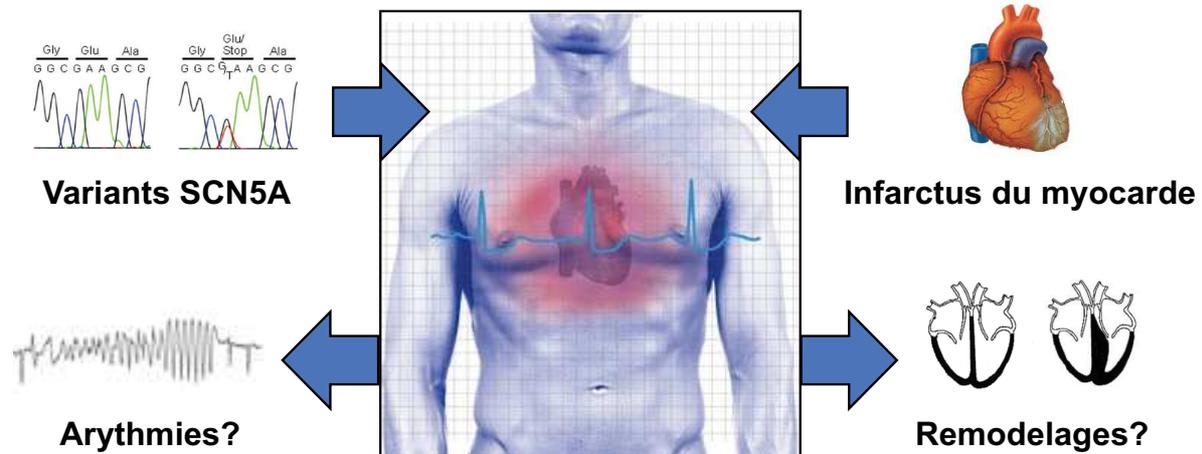
Au cours de mon Master 2 dans l'équipe dirigée par Flavien Charpentier, mon objectif était de participer à la caractérisation du modèle Scn5a<sup>+/-</sup> à l'âge de 16 semaines. J'ai ainsi pu mettre en évidence, dans des conditions de base, l'existence d'un remodelage concentrique chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> de phénotype sévère (KOS). Comme décrit précédemment, les phénotypes mineur et sévère du modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup> présentent de nombreuses différences. A la vue de la sévérité de l'atteinte de la conduction, de la susceptibilité à la survenue spontanée de troubles du rythme et de la présence d'un remodelage concentrique chez les animaux KOS, nous avons fait le choix d'utiliser préférentiellement les animaux de phénotype mineur (KOM) afin de mettre en évidence une interaction potentielle entre les cardiopathies congénitales et les cardiomyopathies acquises dans le développement de troubles du rythme et de remodelages post ischémiques. En effet, le phénotype mineur correspond par ses caractéristiques au phénotype décrit chez des patients porteurs de mutations pour le gène SCN5A.

### **Objectifs de mon sujet de doctorat**

Donc à partir de contexte, les objectifs de ma thèse ont été (Figure 31):

- De mettre en place la plateforme de télémétrie afin de réaliser un suivi de l'activité électrique de manière continue au cours du temps, et de valider une démarche expérimentale nécessaire pour évaluer des troubles du rythme chez nos animaux opérés ou non afin d'identifier une prédisposition d'une altération de l'expression ou de l'activité de Nav1.5 dans la survenue d'arythmies ventriculaires au cours de la phase aiguë d'un infarctus du myocarde.

- De mettre en évidence, au delà du risque d'augmentation de l'incidence des arythmies, par des approches échocardiographiques et moléculaires, l'existence d'une ou plusieurs implications de Nav1.5 sur le déroulement ou la sévérité du développement des remodelages cardiaques associés à l'infarctus du myocarde.



**Figure 31: Les hypothèses de mon doctorat.**

A terme, l'objectif final de cette étude serait de mettre en évidence que l'existence de mutations pour le gène SCN5A pourrait s'avérer un critère à intégrer à la liste de ceux utilisés pour définir la stratification du risque chez des patients susceptibles de développer des troubles du rythme suite à leur infarctus du myocarde pouvant conduire à des cas de mort subite cardiaque. Elle pourrait permettre d'envisager la mise en place d'une meilleure prise en charge de cette population par un suivi plus régulier et une orientation facilitée vers l'implantation d'un défibrillateur cardiaque chez les patients porteurs de mutations pour le gène SCN5A.

## **Etude des implications du gène SCN5A dans la survenue des arythmies et des remodelages ventriculaires observés lors d'un infarctus du myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire**

**Benoît Jagu<sup>1</sup>, Agnès Carcouet<sup>1</sup>, Stéphanie Lemarchand<sup>1</sup>, Thierry Le Tourneau<sup>1</sup>, Flavien Charpentier<sup>1</sup>, Gilles Toumaniantz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, L'institut du thorax, Nantes, équipe Cardiopathies et mort subite.

**Résumé :** Le canal sodique Nav1.5, codé par le gène SCN5A, a un rôle primordial dans l'activité électrique du cœur. Plusieurs pathologies rythmiques et structurales sont associées à des mutations pour ce gène et/ou des modifications de l'expression et de l'activité de Nav1.5 sont rapportées au cours de l'insuffisance cardiaque. Des cas cliniques isolés suggèrent un lien entre des mutations pour ce gène SCN5A associées à une situation de pathologie coronarienne et la survenue d'épisodes d'arythmies ventriculaires potentiellement létales. **Objectifs.** Notre étude a pour objectif de chercher à caractériser le rôle du gène SCN5A dans les survenues de troubles du rythme et de remodelages ventriculaires suite à un infarctus du myocarde et cela à partir d'un modèle murin de ligature coronaire. **Résultats.** Par une étude préclinique, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la survenue des arythmies ventriculaires au cours des 24 premières heures suite à un infarctus du myocarde, par ligature permanente, chez des animaux présentant une invalidation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A (Scn5a+/-). Cette étude a également permis d'identifier un profil inflammatoire supérieur et une réserve de conduction plus réduite à 48 heures chez ces mêmes animaux laissant présager un remodelage cardiaque plus sévère après un infarctus du myocarde, suggéré par des données préliminaires obtenues à 4 semaines après l'infarctus. **Conclusion et perspectives.** Notre étude montre pour la première fois un lien entre une altération de l'expression du gène SCN5A et la survenue des troubles du rythme ventriculaire et présume d'un rôle potentiel de ce canal dans le remodelage cardiaque post ischémique. A terme, les résultats préliminaires sur le remodelage devront être confirmés et étendus à l'identification et la compréhension des mécanismes responsables de l'augmentation de cette susceptibilité aux troubles du rythme ainsi que d'un remodelage ventriculaire plus sévère associés à une dysfonction de Nav1.5 suite à un infarctus du myocarde.

**Mots-clés :** SCN5A, Nav1.5, infarctus du myocarde, arythmies ventriculaires, remodelages cardiaques, insuffisance cardiaque, mort subite cardiaque et stratification du risque.

## **Introduction**

Des modifications de l'expression et/ou de l'activité de Nav1.5 sont clairement associées à des situations physiopathologiques congénitales ou acquises. Depuis plus de 15 ans, de nombreuses études mettent en évidence que l'expression de nombreuses mutations pour le gène SCN5A, conduisant à des gains ou des pertes de fonction pour Nav1.5, pouvant être à l'origine du développement de troubles du rythme ou de cardiomyopathie dilatée chez des patients porteurs de ces altérations génétiques. Ces mêmes études suggèrent également une pénétrance incomplète de ces mutations avec l'existence de nombreux « porteurs sains » au niveau des familles étudiées laissant suggérer d'autres composantes génétiques et environnementales impliquées dans l'expression phénotypique des mutations pour le gène SCN5A.

A la fin des années 1980, l'étude clinique CAST a été le premier élément montrant que l'inhibition de Nav1.5, par une approche pharmacologique, semblait avoir un impact sur la survie des patients avec une augmentation de 4% de la mortalité au cours des 40 premiers jours suite à l'infarctus du myocarde (IDM) (Garratt et al., 1989 ; Pratt et al., 1990). Par la suite, de nombreuses études ont montré l'existence de régulations pour l'expression et des modifications post-traductionnelles de l'activité de Nav1.5 au cours d'un remodelage cardiaque et de l'insuffisance cardiaque qui en résulte. En 2007, Dan Hu et ses collaborateurs ont été les premiers à décrire, dans une étude conduite sur 17 patients, une augmentation de l'incidence des épisodes de tachycardies et fibrillations ventriculaires dans les 12 heures suite à l'entrée en soins intensifs d'un patient porteur d'une mutation pour le gène SCN5A avec perte de fonction (Hu et al. 2007). Depuis, quelques études sur des cas isolés montrent aussi que des mutations de SCN5A avec un gain de fonction pour le gène SCN5A ont été également associées à une augmentation de bouffées de « torsades de pointes » au cours des premiers jours suite à une ischémie myocardique ou identifiées chez patients présentant les altérations d'une maladie coronarienne sévère et également victime de mort subite cardiaque (Adabag et al., 2010 ; Crotti et al., 2012).

A partir de ce contexte bibliographique, les objectifs de cette étude sont de mettre en évidence l'existence d'un lien entre une réduction de l'expression et/ou de l'activité de Nav1.5 et 1) une prédisposition génétique de variants rares pour le gène SCN5A avec le survenue de troubles du rythme au cours des premières heures suite à un infarctus du myocarde, 2) une modification du décours ou de la sévérité des remodelages cardiaques post ischémiques et du risque d'arythmies au cours de l'insuffisance cardiaque faisant suite à cet infarctus.

## **Matériels et méthodes**

### **Statuts sanitaire et éthique**

Toutes les expérimentations animales décrites dans ce manuscrit, ont été réalisées à l'UTE (Unité Thérapeutique Expérimentale), structure certifiée par le ministère de l'agriculture et située à l'Institut de Recherche Thérapeutique d'Université de Nantes (IRT-UN) auquel est rattaché l'Institut

du thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR6291. Les procédures expérimentales ont été approuvées par la rédaction d'une saisine soumise et validée par le Ministère de l'Agriculture et de la Recherche, puis par le CREEA (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale - Pays de la Loire).

### **Animaux**

Les animaux sauvages (WT), *Scn5a*<sup>+/-</sup> de phénotype mineur (KOM), dérivés sur un fond pur Sv129 ont été utilisés pour les expériences de cette étude. Ils ont été génotypés et phénotypés par ECG selon des critères précédemment décrits (Leoni et al., 2010 ; Derangeon et al. en cours d'écriture, page 176 à 205). Tous les animaux ont été hébergés dans une animalerie à température contrôlée (22°C) avec des cycles jour/nuit de 12 heures, où l'eau et l'alimentation sont fournies *ad libitum*.

### **Modèle expérimental d'infarctus du myocarde par ligature permanente de l'artère coronaire descendante gauche**

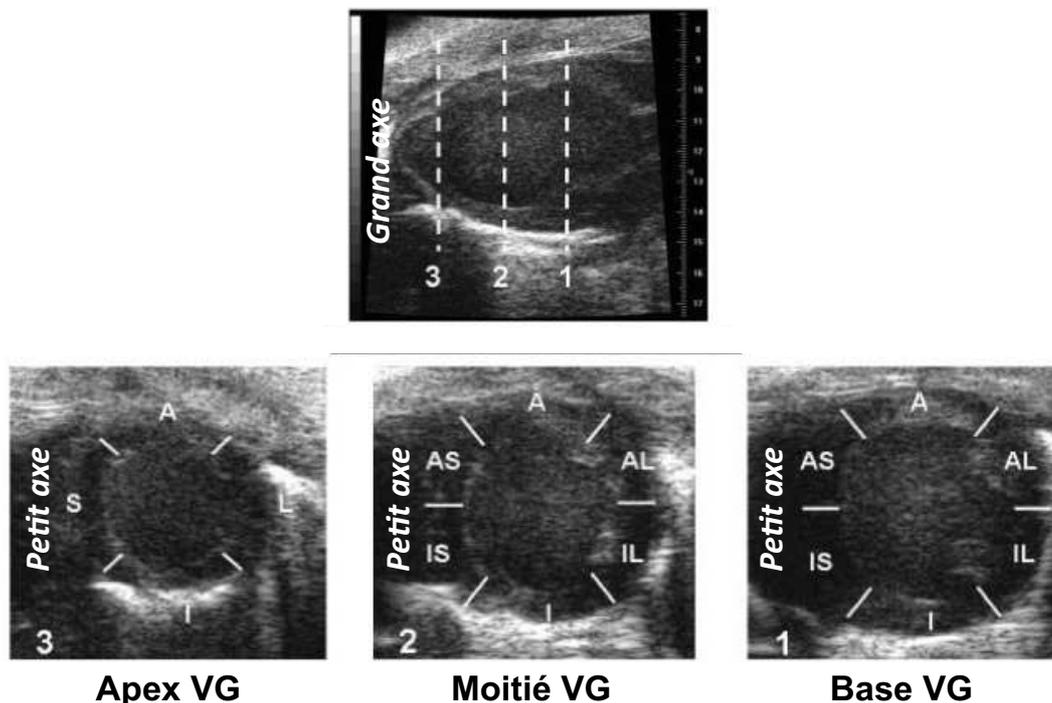
Après une anesthésie *via* une injection intra-péritonéale d'un mélange « Kétamine-Xylazine », les animaux de 12-15 semaines sont préparés et reçoivent une dose de Nubain pour assurer une analgésie. Une intubation endotrachéale est alors effectuée afin de placer les animaux sous respiration artificielle *via* un ventilateur dédié au petit animal. Une thoracotomie au niveau du 4<sup>ème</sup> espace intercostal gauche est alors réalisée afin d'accéder à la partie gauche du cœur. Pour le groupe des animaux infarciés, une ligature avec un fil de propylène (7-0 non résorbable) est posée à 1-2 mm en dessous de l'oreillette gauche au niveau l'artère coronaire descendante gauche. L'apparition d'un blanchissement du myocarde en aval de la ligature permet de valider la procédure. Pour le groupe contrôle, la zone en dessous de l'oreillette est juste traversée avec le fil pour mimer au plus près la procédure sans effectuer la ligature à proprement parlé. Après la procédure, la cage thoracique est refermée en faisant attention de ne pas induire de pneumothorax ou de ne pas léser les poumons. Après avoir réaliser la suture, chaque animal reçoit une nouvelle injection de Nubain pour maintenir la couverture analgésique post opératoire. L'animal, qui est placé sur un tapis chauffant jusqu'à son réveil complet, est extubé à la présence de réflexe respiratoire. L'animal peut ensuite être remis dans une cage afin de débiter les enregistrements de télémétrie.

### **Echocardiographie**

Sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane, une échocardiographie en 2 dimensions (2-D) est réalisée sur les animaux sur la base d'un échographe Vivid 7 (GE Healthcare) avec une sonde de 14MHz (modèle 10S). Pour l'évaluation des troubles segmentaires pariétaux afin de localiser et quantifier les infarctus à 48 heures suite à l'opération, des acquisitions en mode B sont réalisées avec une incidence parasternale en « petit axe » au niveau de la base, au milieu et à l'apex du ventricule gauche (Figure 32). Une évaluation multi-segmentaire pourra ainsi être établie avec précision.

Afin d'observer le remodelage structural, le diamètre du ventricule gauche et les épaisseurs de parois libre et septale du ventricule gauche sont mesurés en fin de diastole à partir d'images

parasternale en « grand axe » en mode « temps-mouvement ». La fonction systolique est alors évaluée *via* les mesures des fractions d'éjection et de raccourcissement obtenues toujours à partir des acquisitions « temps-mouvement » réalisées en « grand axe ». Pour la fonction diastolique, la vitesse du sang au travers la valve mitrale est mesurée au cours du temps en Doppler pulsé avec une incidence apicale des 4 cavités du myocarde. A partir des flux mitraux enregistrés, le temps de relaxation isovolumétrique, le rapport des ondes E sur A, et le temps de décélération de l'onde E sont mesurés. Au cours de chaque acquisition, un électrocardiogramme sommaire est enregistré par l'échographe permettant de mesurer la fréquence cardiaque au moment des mesures et de s'affranchir de tout biais d'évaluation.



**Figure 32 : Incidences utilisées en échocardiographie pour réaliser l'index de troubles segmentaires ou « wall motion score index » en anglais.** (A: Antérieur; AL: Antéro-latéral; AS: Antéro-septal; IL: Inféro-latéral; IS: Inféro-septal; I: Inférieur ou postérieur; S: Septal; VG: Ventricule Gauche)(Illustrations extraites et modifiées à partir de Zhang et al., 2007).

### Télémetrie ECG

A partir d'animaux âgés de 10-12 semaines, sous anesthésie gazeuse et analgésie contrôlées, un émetteur TA11ETA-F10 (Data Sciences International, DSI™) est implanté avec des électrodes fixées sur les muscles du thorax en sous cutanée. Ce dispositif permettra l'obtention d'un enregistrement ECG avec une dérivation en DII. Suite à une période de convalescence de 2 semaines, une session de 24 heures (12h jour/12h nuit) contrôles est enregistrée *via* la plateforme de télémetrie à l'aide du logiciel DATAquestART Gold 4.33 (DSI™) afin d'évaluer l'activité électrique basale et identifier des animaux atypiques à exclure. Puis, une heure après la pause de la ligature coronaire, un enregistrement est de nouveau réalisé pendant les 47 heures suivant l'induction de l'infarctus du

myocarde. A partir du logiciel Ponemah v5.1 (DSI™), la fréquence cardiaque est mesurée sur des périodes de 30 secondes toutes les 10 minutes afin d'avoir un suivi électrocardiographique au cours du temps. Pour l'identification et la quantification des troubles du rythme ventriculaire, une analyse d'intervalle R-R est réalisée afin d'identifier des différences d'intervalle de couplage entre les ondes R de l'ECG. A partir de ces tracés, des mesures de paramètres, comme les durées du complexe QRS et du segment STc (STc=QTc-QRS), sont aussi effectuées à 24 heures et à 48 heures afin d'évaluer l'état de la conduction et la repolarisation cardiaques.

### Quantification des ARNm par PCR quantitative

Les ARN totaux des ventricules gauches ont été extraits selon la méthode de Chomczynski et ses collaborateurs en 1987 avec du Trizol® Reagent (Ambian, Life technologies). La qualité et la quantité des ARNs totaux sont évaluées respectivement par un dépôt sur gel d'agarose contenant du bromure d'Éthyidium et mesure de spectrophotométrie au Nanodrop (ThermoScientific). Après un traitement à la DNase I (DNase I recombinant, Roche) et une purification par précipitation alcoolique, 1µg d'ARN totaux traités est réverse transcrit afin de constituer une banque d'ADN complémentaires (ADNc) de chaque extrait à l'aide d'un kit d'hexamères nucléotidiques aléatoires (Random primers, Invitrogen™) et d'une réverse transcriptase (MMLV, Invitrogen™). Chaque couple d'amorces utilisé, issu de littérature ou conçu par le logiciel Oligo 7S, a été vérifié *in silico* par un PrimerBlast (NCBI) et des BlastN (NCBI), puis validés *in vitro* par la réalisation d'une rampe d'efficacité d'amplification à l'aide de dilutions en cascade de banques d'ADNc exprimant les ARN messagers ciblés :  $\alpha$ -MHC (S: 5'-AAGGTGAAGGCCTACAAGCG-3'; AS: 5'-TTTCTGCTGGACAGGTTATTCC-3'), ANP (S: 5'-ACAGCCAAGGAGGAAAAGGC-3'; AS: 5'-CCACAGTGGCAATGTGACCA-3'),  $\beta$ -MHC (S: 5'-AAGGTGAAGGCCTACAAGCG-3'; AS: 5'-TTCTGCTTCCACCTAAAGGGC-3'), BNP (S: 5'-TCCAGAGCAATTCAAGATGCA-3'; AS: 5'-CTTTTGTGAGGCCTTGGTCC-3'), Collagène 1a (S: 5'-GAGGGCGAGTGCTGTCCTT-3'; AS: 5'-GGTCCCTCGACTCCTATGACTTC-3'), Collagène 3a (S: 5'-TGAAGGAAATAGCAAATTCACCTACAC-3'; AS: 5'-TCAAAGACTGTCTTGCTCCATTC-3'), Connexine 43 (S: 5'-AAGTGAAAGAGAGGTGCCCA-3'; AS: 5'-GTGGAGTAGGCTTGGA-CCT-3'), Cyclophiline (S: 5'-TGGCAAATGCTGGACCAAA-3'; AS: 5'-GCCATCCAGCCATTCA-GTCT -3'), HPRT (S: 5'-GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT-3'; AS: 5'-AAAGA ACTTATAGCC-CCCCTTGA-3'), Interleukine-1 $\beta$  (S: 5'-GCTCATCTGGGATCCTCTCC-3'; AS: 5'- CCTGCCTGA-AGCTCTTGTTG -3'), Interleukine-6 (S: 5'-CTTGGGACTGATGCTGGTGA-3'; AS: 5'- TGCAAGT-GCATCATCGTTGT -3'), MMP-9 (S: 5'-ACCAAGGGTACAGCCTGTTCCCT-3'; AS: 5'-GGTAGC-TATACAGCGGGTACATGA -3'), Scn5a (S: 5'-GAAGAAGCTGGGCTCCAAGA-3' ; AS: 5'- CAT-CGAAGGCCTGCTTGGTC -3' ), Serca2a (S: 5'-CCCCCTGGGAGAATATCTGG-3'; AS: 5'- GAT-CTGGAAAATGAGCGGCA-3'), TGF- $\beta$ 1 (S: 5'-CTTTAGGAAGGACCTGGGTT-3'; AS: 5'- CAG-GAGCGCACAATCATGTT-3'), TIMP-1 (S: 5'-CACTCACTGTTTGTGGACGGA-3'; AS: 5'- CAAGCAAAGTGACGGCTCTG -3'), TNF- $\alpha$  (S: 5'-ATGAGAAGTTCCCAAATGGC-3'; AS: 5'-

CTCCACTTGGTGGTTTGCTA -3'). Toutes les investigations de PCR quantitative ont été réalisées avec le kit MESA Blue qPCR Master Mix Plus for SYBR® Assay w/fluorescein (Eurogentec®, Belgique) et l'utilisation de l'appareil iCycler CFX96™ Real Time System (BioRad Laboratories). Les données enregistrées sont traitées et normalisées par le logiciel CFX Manager Software (BioRad Laboratories) selon la méthode des  $\Delta\Delta Ct$ . Pour chaque gène ciblé, le niveau d'expression a été normalisé sur celui de la HPRT ou de la cyclophiline, gènes de quantification qualifiés au laboratoire et faisant partie des gènes dont les expressions sont les plus stables suite à un infarctus du myocarde chez la souris (Everaert et al., 2011).

### Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les tests statistiques ont été réalisés à partir du logiciel GraphPad Prism5. A la vue des effectifs en présence pour cette étude, des tests de Mann Whitney ont été choisis afin d'évaluer la significativité des différences observées. Les valeurs sont jugées significatives lorsque la valeur de p est au minimum inférieure à 0,05.

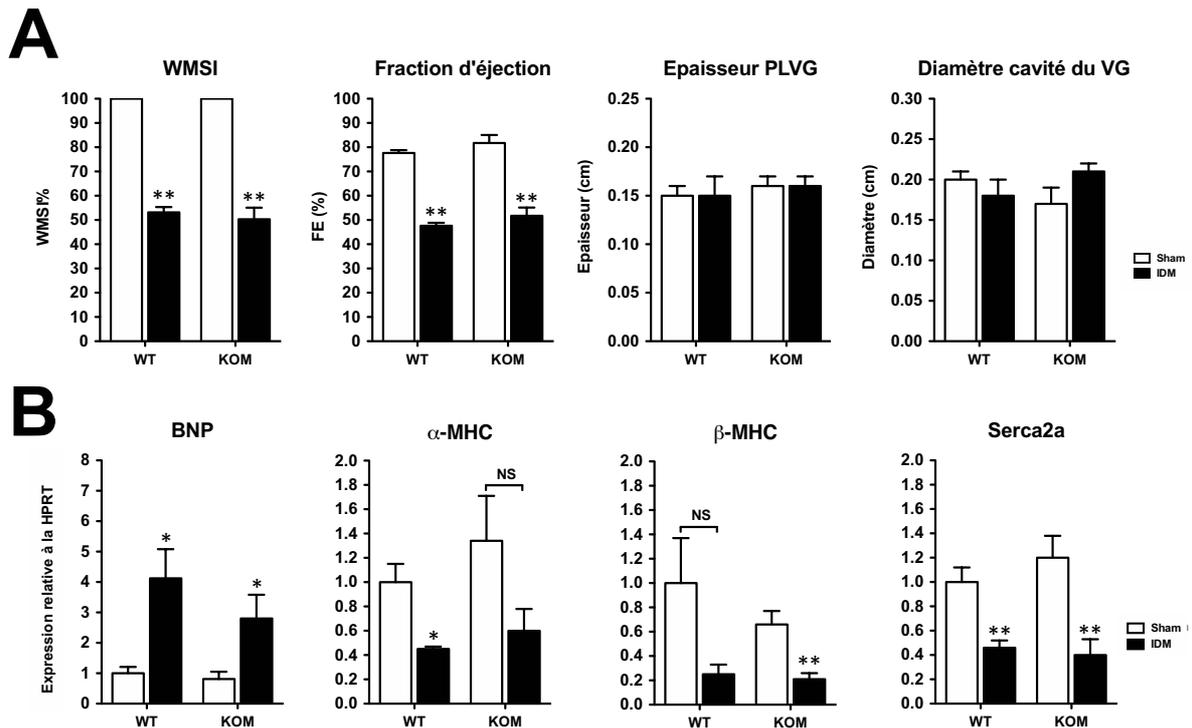
## Résultats

### Des atteintes identiques de l'infarctus du myocarde entre les animaux sauvages et KOM

A 48h, nous avons voulu évaluer la fonction cardiaque afin de pouvoir comparer l'impact de l'IDM chez nos animaux sauvages et KOM.

Dans notre étude, nous avons eu recours à l'utilisation du « Wall motion score index » (WMSI) réalisé à l'aide l'échocardiographie afin d'évaluer la taille de l'infarctus du myocarde. Cette méthode est également validée chez l'homme suite à un infarctus du myocarde. Depuis quelques années, elle a aussi été validée chez la souris (Zhang et al. 2007), elle est de plus en plus répandue pour évaluer la taille de l'infarctus chez les animaux de laboratoire (Port et al., 2011). De plus, cette technique ne nécessite pas d'euthanasier les animaux afin de procéder à cette évaluation.

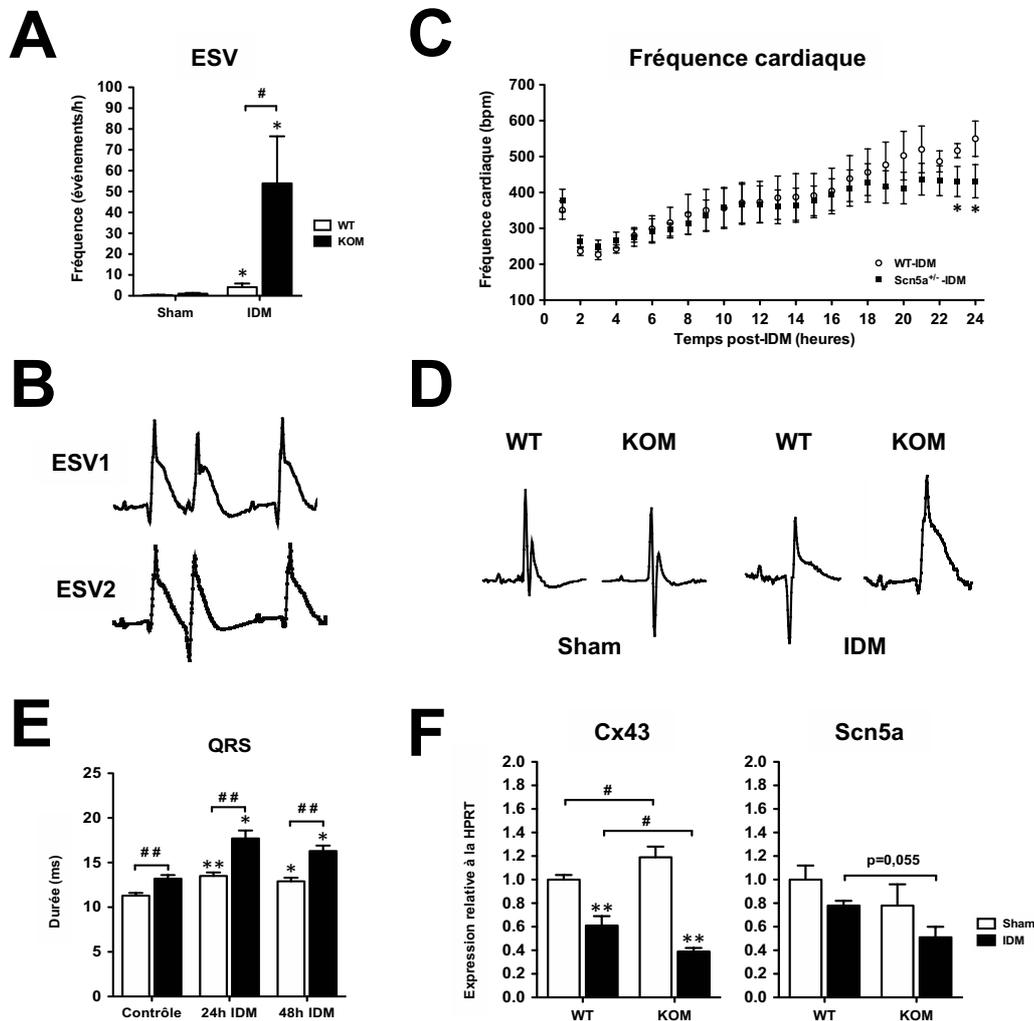
Par échocardiographie, nous avons montré que les animaux sauvages et KOM, présentant un infarctus du myocarde antéro-latéral, ont des tailles d'infarctus identiques avec des diminutions similaires de la motilité du ventricule gauche en comparaison à des animaux contrôles (*Figure 33A* ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $100\pm 0$  % ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $100\pm 0$  % ; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $53,15\pm 2,20$  %,  $**p<0,01$  vs *WT-Sham* ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $50,29\pm 4,80$  %,  $**p<0,01$  vs *KOM-Sham*), de la fraction d'éjection (*Figure 33A* ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $77,63\pm 1,18$  % ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $81,74\pm 3,28$  % ; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $47,63\pm 1,18$  %,  $**p<0,01$  vs *WT-Sham* ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $51,74\pm 3,38$  %,  $**p<0,01$  vs *KOM-Sham*) avec aucune modification de l'épaisseur de la paroi libre (*Figure 33A*; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $0,15\pm 0,01$  cm ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $0,16\pm 0,01$  cm; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $0,15\pm 0,02$  cm; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $0,16\pm 0,01$  cm) et du diamètre (*Figure 33A*; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $0,20\pm 0,01$  cm; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $0,18\pm 0,02$  cm; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $0,17\pm 0,02$  cm; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $0,21\pm 0,01$  cm) du ventricule gauche en fin de systole.



**Figure 33: Remodelages cardiaques structural et fonctionnel à 48h post IDM.** **A**, Evaluation de l'index de motilité pariétale ou « wall motion score index », de la fraction d'éjection, de l'épaisseur de la paroi libre du VG ainsi que le diamètre de la cavité du VG en systole. **B**, Expression en ARNm du BNP, de l'isoforme  $\alpha$  et  $\beta$  des chaînes lourdes de la myosine et de la pompe calcique Serca2a. ( $n=5$  par génotype;  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  vs sham) (BNP: Brain Natriuretic Peptide; FE: Fraction d'Ejection; IDM: Infarctus du Myocarde; KOM: souris *Scn5a*<sup>+/-</sup> avec une phénotype mineure. MHC: Myosin Heavy Chain; PLVG: Paroi Libre du VG; Serca2a: Sarco-Endoplasmique Reticulum Calcium ATPase 2a; Sham: procédure contrôle de l'IDM; VG: Ventricule Gauche; WMSI: Wall Motion Score Index).

La similitude de dysfonction ventriculaire entre les animaux sauvages et KOM a aussi été retrouvée au niveau moléculaire avec les mêmes variations de l'expression en ARN messager codant pour le BNP, un marqueur de stress ventriculaire (Figure 33B ; WT-Sham,  $n=5$ ,  $1,00\pm0,21$  ; KOM-Sham,  $n=5$ ,  $0,81\pm0,24$  ; WT-IDM,  $n=6$ ,  $4,12\pm0,96$  ,  $*p<0,05$  vs WT-Sham ; KOM-IDM,  $n=5$ ,  $2,80\pm0,78$  ,  $*p<0,05$  vs KOM-Sham), l'isoforme  $\alpha$  (Figure 33B ; WT-Sham,  $n=5$ ,  $1,00\pm0,15$  ; KOM-Sham,  $n=5$ ,  $1,34\pm0,37$  ; WT-IDM,  $n=6$ ,  $0,45\pm0,02$  ,  $*p<0,05$  vs WT-Sham ; KOM-IDM,  $n=5$ ,  $0,60\pm0,18$ ), et  $\beta$  (Figure 33B ; WT-Sham,  $n=5$ ,  $1,00\pm0,37$  ; KOM-Sham,  $n=5$ ,  $0,66\pm0,11$  ; WT-IDM,  $n=6$ ,  $0,25\pm0,08$  ,  $*p<0,05$  vs WT-Sham ; KOM-IDM,  $n=5$ ,  $0,21\pm0,05$  ,  $**p<0,01$  vs KOM-Sham), des chaînes lourdes de la myosine, et la pompe calcique Serca2a (Figure 33B ; WT-Sham,  $n=5$ ,  $1,00\pm0,11$  ; KOM-Sham,  $n=5$ ,  $1,20\pm0,18$  ; WT-IDM,  $n=6$ ,  $0,46\pm0,06$  ,  $**p<0,01$  vs WT-Sham ; KOM-IDM,  $n=5$ ,  $0,40\pm0,13$  ,  $**p<0,01$  vs KOM-Sham).

**Augmentation de la survenue des troubles du rythme ventriculaire et ralentissement de la conduction chez les animaux invalidés à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde**



**Figure 34: Arythmies ventriculaires et propriétés électrophysiologiques au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde.** **A**, Fréquence des ESVs au cours des 24 heures suite à l'IDM. (*WT-Sham*,  $n=5$  ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ; *WT-IDM*,  $n=6$ ; *KOM-IDM*,  $n=5$ .  $*p<0,05$  vs *Sham*,  $^{\#}p<0,05$  vs *WT*). **B**, Tracés représentatifs d'ESV majoritairement observées. **C**, Suivi de la fréquence cardiaque au cours des premières 24 heures suite à l'IDM chez les animaux sauvages et KOM. (*WT-Sham*,  $n=5$  ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ; *WT-IDM*,  $n=6$ ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $*p<0,05$  vs *WT*). **D**, Tracés ECG des animaux sham et infarciés à la fin des premières 24 heures après l'IDM. **E**, Mesures de l'intervalle de complexes QRS chez les animaux infarciés versus leur ECG contrôle. (*WT*,  $n=6$ ; *KOM*,  $n=5$ ;  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  vs contrôle,  $^{\#\#}p<0,01$  vs *WT*). **F**, Quantification des niveaux d'expression des ARNm de la connexine 43 et de *Scn5a*. ( $n=5$  par génotype,  $**p<0,01$ , vs *Sham*.  $^{\#}p<0,05$ )(*Cx43*: connexine 43; *ESV*: Extrasystole ventriculaire; *KOM*: *Scn5a*<sup>+/-</sup> phénotype mineure; *IDM*: Infarctus du myocarde; *Sham*: procédure contrôle de l'IDM).

Au cours du suivi par télémétrie des 24 premières heures suite à l'IDM, nous avons observé une augmentation significative d'un facteur 13 de l'incidence des extrasystoles ventriculaires (ESV) (Figure 34B) chez les animaux KOM en comparaison aux animaux sauvages suite à un IDM (Figure 34A ; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $4,16 \pm 1,75$  ESV/h ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $53,94 \pm 22,60$  ESV/h) alors qu'aucune survenue n'est observée pour les groupes contrôles (Figure 35A ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $0,30 \pm 0,20$  ESV/h ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $1,00 \pm 0,40$  ESV/h). La fréquence cardiaque enregistrée chez ces animaux sauvages et KOM infarciés évolue de la même manière sans différence au moment où ont lieu les troubles du rythme (Figure 34C).

Puis à 24h et 48h suite à l'IDM, par comparaison aux valeurs enregistrées chez ces mêmes animaux avant l'opération, nous avons pu observer un défaut de conduction induit par l'infarctus qui se traduit par une augmentation significative de l'intervalle QRS (Figure 34E) dont la différence observée est sensiblement mais significativement augmentée entre les animaux sauvages et KOM (24h contrôle ;  $QRS_{KOM} - QRS_{WT} = 1,90$  ms ; 48h IDM,  $QRS_{KOM} - QRS_{WT} = 3,4$  ms). Une augmentation de la repolarisation a été également observée suite à l'infarctus qui est identique à 24 et 48h mais qui ne diffère pas entre les animaux sauvages et KOM.

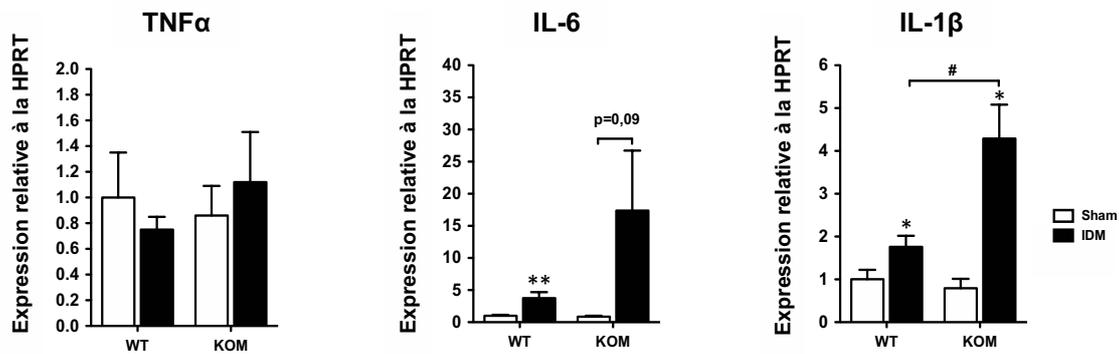
Suite à des caractérisations moléculaires, nous avons pu observer, dans des conditions contrôles, une augmentation significative de l'expression de la connexine 43 chez les animaux KOM. En revanche, une forte baisse de l'expression de la connexine 43 est observée suite à l'infarctus du myocarde, baisse que est 2 fois plus importante chez les animaux KOM par rapport aux sauvages (Figure 34F ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $1,00 \pm 0,04$  ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $1,19 \pm 0,09$ ,  $^{\#}p < 0,05$  vs *WT-sham* ; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $0,61 \pm 0,08$ ,  $^{**}p < 0,01$  vs *WT-Sham* ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $0,39 \pm 0,03$ ,  $^{**}p < 0,01$  vs *KOM-Sham* et  $^{\#}p < 0,05$  vs *WT-IDM*). De plus, une tendance à une baisse de l'expression de *Scn5a* plus importante a été observée chez les animaux KOM après l'IDM, une variation proche de la significativité (Figure 34F ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $1,00 \pm 0,12$  ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $0,78 \pm 0,18$  ; *WT-IDM*,  $n=6$ ,  $0,78 \pm 0,04$ ,  $^{**}p < 0,01$  vs *WT-Sham* ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $0,51 \pm 0,09$ ,  $p = 0,055$  vs *WT-IDM*). Ces observations suggèrent un profil transcriptomique favorable au ralentissement de la conduction chez les animaux KOM suite à l'infarctus du myocarde.

#### **Augmentation du profil pro inflammatoire chez les animaux KOM infarciés à 48 heures post IDM**

A 48 heures, lors de la phase inflammatoire décrite comme étant associée à l'infarctus du myocarde, nous avons étudié l'expression transcriptomique de 3 cytokines pro-inflammatoires classiquement décrites comme augmentées dans cette situation.

Nous avons observé 1) une absence d'élévation de l'expression du TNF $\alpha$  (Figure 35 ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $1,00 \pm 0,35$  ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,  $0,86 \pm 0,23$  ; *WT-IDM*,  $n=5$ ,  $0,75 \pm 0,10$  ; *KOM-IDM*,  $n=5$ ,  $1,12 \pm 0,10$ ), 2) une augmentation de l'expression de l'interleukine-6 avec une tendance à la majoration chez les animaux KOM infarciés (Figure 35 ; *WT-Sham*,  $n=5$ ,  $1,00 \pm 0,14$  ; *KOM-Sham*,  $n=5$ ,

0,86±0,15 ; WT-IDM, n=5, 3,74±0,95 , \*\*p<0,01 vs WT-Sham ; KOM-IDM, n=5, 17,37±9,35, p=0,06 vs KOM-Sham), et 3) une augmentation de l'interleukine 1β qui est significativement plus élevée chez les animaux KOM infarciés (Figure 35 ; WT-Sham, n=5, 1,00±0,22 ; KOM-Sham, n=5, 0,79±0,22 ; WT-IDM, n=5, 1,76±0,26 , \*p<0,05 vs WT-Sham ; KOM-IDM, n=5, 4,29±0,79 , \*p<0,05 vs KOM-Sham et #p<0,05 vs WT-IDM). Ces résultats suggèrent un profil pro inflammatoire plus élevé chez les animaux KOM à 48 heures suite à l'infarctus du myocarde que les animaux contrôles.

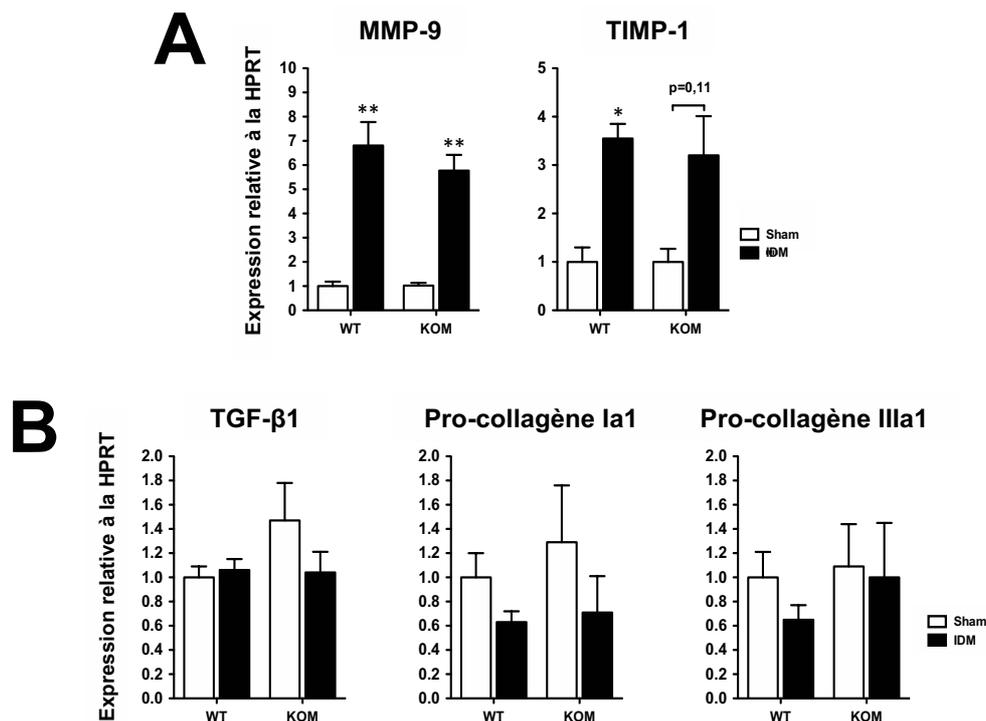


**Figure 35: Expressions des cytokines pro-inflammatoires à 48h post IDM.** Quantification des niveaux d'expression des ARNm codant pour le TNFα, l'IL-6 et l'IL-1β. (n=5 par génotype; \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs sham, #p<0,05 vs WT) (IDM: Infarctus du Myocarde; IL: Interleukine; Sham: procédure contrôle de l'IDM; TNFα: Tumor Necrosis Factor α).

### Remodelage de la matrice extracellulaire à 48 heures post IDM

Toujours à 48 heures post-IDM, nous avons voulu étudier les modifications éventuelles apportées à la matrice extracellulaire. Ces dernières sont impliquées dans la colonisation de la zone infarctée par les cellules inflammatoires pour permettre l'élimination des débris cellulaires et à terme la mise en place d'une cicatrice myocardique associée à une synthèse et une organisation de fibres de collagènes.

Au niveau transcriptomique, des augmentations de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 (Figure 36A ; WT-Sham, n=5, 1,00±0,18 ; KOM-Sham, n=5, 1,02±0,11 ; WT-IDM, n=5, 6,81±0,97 , \*p<0,05 vs WT-Sham ; KOM-IDM, n=5, 5,77±0,65 , \*p<0,05 vs KOM-Sham) et de son inhibiteur tissulaire préférentiel TIMP1 (Figure 36A, WT-Sham, n=5, 1,00±0,30 ; KOM-Sham, n=5, 1,00±0,27 ; WT-IDM, n=5, 3,55±0,30 , \*p<0,05 vs WT-Sham ; KOM-IDM, n=5, 3,20±0,81 , p=0,11 vs KOM-Sham) ont été observées après l'IDM sans différence entre les animaux sauvages et KOM. Pour de la synthèse de collagène, aucune augmentation de l'expression du TGF-β1 (Figure 36B ; WT-Sham, n=5, 1,00±0,09 ; KOM-Sham, n=5, 1,47±0,31 ; WT-IDM, n=5, 1,06±0,09 ; KOM-IDM, n=5, 1,04±0,17), des pro-collagènes de type Ia1 (Figure 36B ; WT-Sham, n=5, 1,00±0,20 ; KOM-Sham, n=5, 1,29±0,47 ; WT-IDM, n=5, 0,63±0,09 ; KOM-IDM, n=5, 0,71±0,30) et de type IIIa1 (Figure 36B ; WT-Sham, n=5, 1,00±0,21 ; KOM-Sham, n=5, 1,09±0,35 ; WT-IDM, n=5, 0,65±0,12; KOM-IDM, n=5, 1,00±0,45) n'a également été observée. Il y aurait même une tendance à la baisse concernant notamment le pro-collagène de type I.



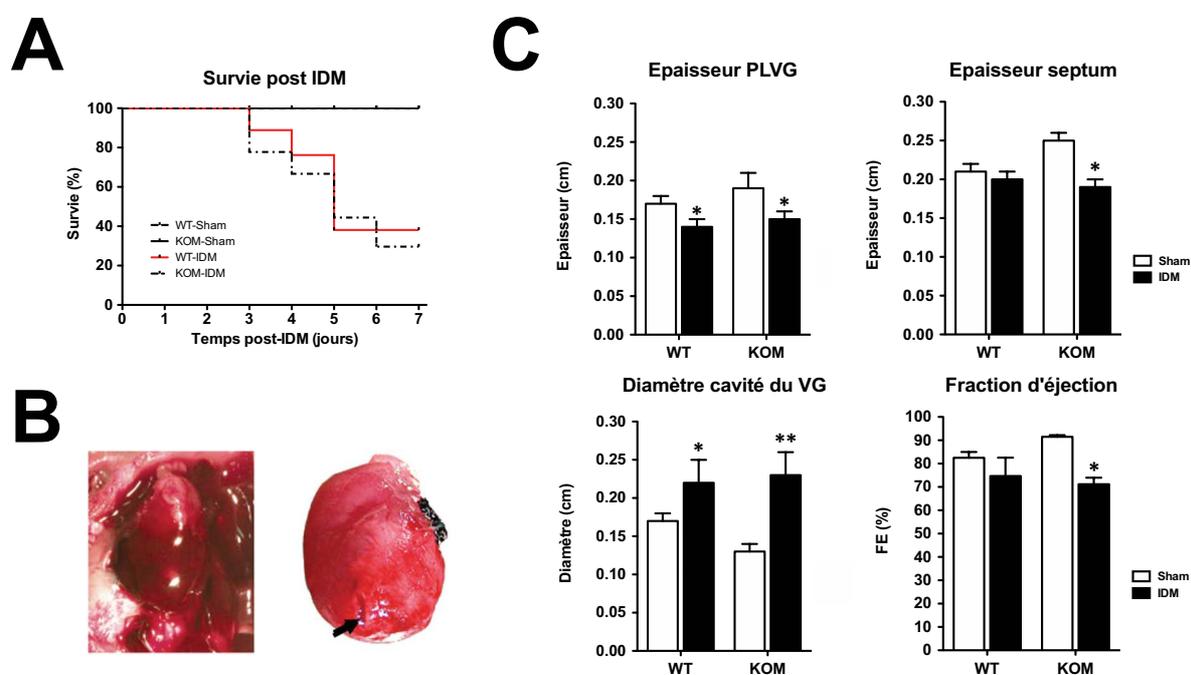
**Figure 36: Remodelage de la matrice extracellulaire à 48h post IDM.** A, Expression en ARNm de la MMP-9 et TIMP-1. B, Expressions en ARNm codant pour le TGF-β1, le collagène de type I et de type III. (n=5 par génotype; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs sham. Coll: Collagène; IDM: Infarctus du Myocarde; MMP: Matricial MetalloProteinase; Sham: procédure contrôle de l'IDM; TGF-β1: Tissue Growth Factor β1; TIMP: Tissue Inhibitor of MMP).

#### Rupture cardiaque et remodelage post ischémique 4 semaines post-IDM.

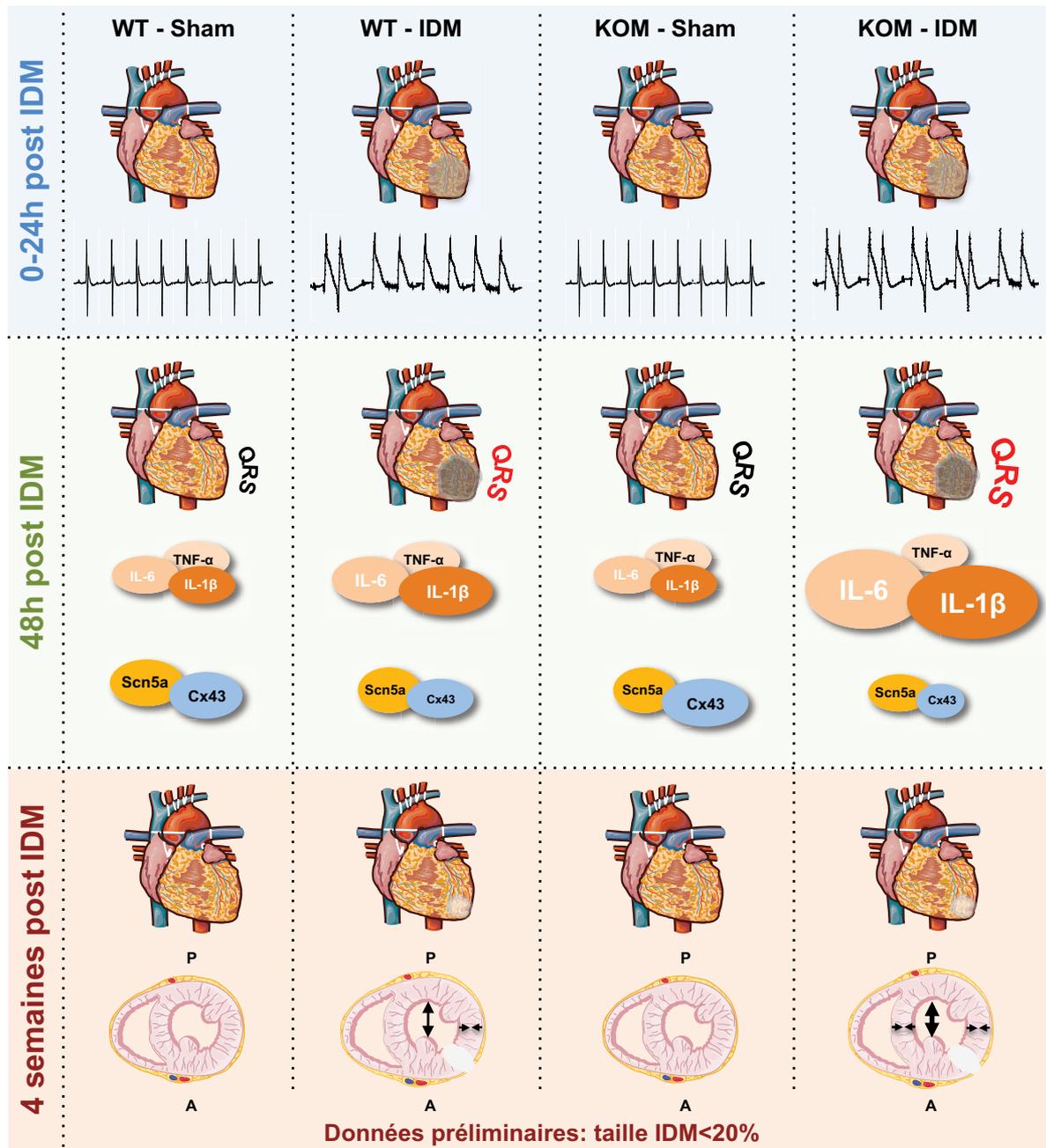
En parallèle de la phase aiguë, nous avons commencé à investiguer si la perte de fonction pour Nav1.5 pouvait avoir des conséquences sur le remodelage chronique induit par l'infarctus du myocarde. Sur la base de premières séries d'opération, nous avons eu malheureusement une très forte mortalité entre le 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour après l'infarctus (Figure 37A) systématiquement liée à une rupture cardiaque (Figure 37B). Ayant des problèmes de disponibilité en animaux, nous n'avons pas pu poursuivre l'étude du remodelage au cours de l'insuffisance cardiaque durant ses phases compensée et décompensée comme nous l'avions prévu. Seuls des données sur des effectifs faibles ont été collectées à ce jour. Ce travail est maintenant en cours de réalisation.

A partir des animaux sauvages et des animaux  $Scn5a^{+/-}$ , ayant survécus et atteints les 4 semaines post-IDM, nous avons pu observer et scorer au cours du prélèvement la présence d'infarctus avec une taille inférieure à 20% du ventricule gauche. Des données préliminaires, par échocardiographie, mettent en évidence une dysfonction systolique modérée chez les animaux infarciés avec des fractions d'éjection significativement plus diminuées chez les animaux  $Scn5a^{+/-}$  (Figure 37C; WT-Sham, n=3, 82,50±2,50 %;  $Scn5a^{+/-}$ -Sham, n=3, 91,50±0,71 %; WT-IDM, n=3, 74,67±7,88 %;  $Scn5a^{+/-}$ -IDM, n=4, 71,20±2,78 %, \* $p < 0,05$  vs  $Scn5a^{+/-}$ -Sham). Sur la base de ces

faibles effectifs, nous avons observé, une dilatation du ventricule gauche (Figure 37C ; WT-Sham,  $n=3$ ,  $0,17\pm0,01$  cm ; Scn5a<sup>+/-</sup>-Sham,  $n=3$ ,  $0,13\pm0,01$ ; WT-IDM,  $n=3$ ,  $0,22\pm0,03$  cm ; Scn5a<sup>+/-</sup>-IDM,  $n=4$ ,  $0,23\pm0,03$  cm) associée à un amincissement des parois septale (Figure 37C ; WT-Sham,  $n=3$ ,  $0,21\pm0,01$  cm ; Scn5a<sup>+/-</sup>-Sham,  $n=3$ ,  $0,25\pm0,01$  cm; WT-IDM,  $n=3$ ,  $0,20\pm0,01$  cm ; Scn5a<sup>+/-</sup>-IDM,  $n=4$ ,  $0,19\pm0,01$ , \* $p<0,05$  vs KOM-Sham) et libre du ventricule gauche en systole (Figure 37C ; WT-Sham,  $n=3$ ,  $0,17\pm0,01$  cm ; Scn5a<sup>+/-</sup>-Sham,  $n=3$ ,  $0,19\pm0,02$  cm; WT-IDM,  $n=3$ ,  $0,14\pm0,01$  cm ; Scn5a<sup>+/-</sup>-IDM,  $n=4$ ,  $0,15\pm0,01$  cm). A la vue de ces effectifs, nous parlerons à ce stade des inclusions de simple tendance. Toute fois, pour deux de ces paramètres, des tendances pour des valeurs plus élevées ont été observées chez les animaux KOM par rapport aux animaux sauvages. Ces observations laissent présager de l'existence d'un remodelage plus important chez les animaux invalidés à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A malgré des tailles d'infarctus relativement petites associées à un contexte d'insuffisance cardiaque compensée.



**Figure 37: La rupture myocardique en phase aiguë et les remodelages post IDM.** A, Evaluation de la survie des animaux suite à l'induction de l'infarctus. B, Illustrations représentatives du phénomène de rupture de la paroi du myocarde, la cause majeure de mortalité des animaux au cours de la phase aiguë de l'IDM dans notre étude C, Evaluation par échocardiographie des épaisseurs de parois du septum et libre du VG, du diamètre du VG au cours de la systole et de la fraction d'éjection. ( $n=3-4$  par condition; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  vs Sham)(IDM: Infarctus du myocarde; Sham: procédure contrôle de l'IDM; PLVG: Paroi libre du VG; VG: Ventricule Gauche).



**Figure 38: Figure récapitulant les données majeures observées au cours de ces travaux de thèse. En haut,** les résultats au cours des premières 24 heures sur l'incidence des arythmies, avec une augmentation des troubles chez les animaux KOM-IDM. **Au milieu,** les résultats des mesures de QRS, et de la quantification des ARNs des acteurs de la conduction et de l'inflammation. **En bas,** schématiquement, les données préliminaires de remodelage cardiaque à 4 semaines post IDM par échocardiographie sur la base d'IDM de taille inférieure à 20% du ventricule gauche (*Postérieur; Sham: Contrôle de la procédure d'infarctus; TNF: Tumor Necrosis Factor*).

## Discussion

### La taille de l'infarctus ne semble pas dépendante de l'expression de Nav1.5

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence du « Wall Motion Score Index », de la fraction d'éjection ainsi que des remodelages ventriculaires à 48 heures post IDM entre les animaux

sauvages et KOM. Ainsi, la perte de l'expression de Nav1.5 ne semble pas avoir de conséquences apparentes sur la taille de l'infarctus et sur le remodelage ventriculaire à ce stade précoce de la pathologie. Maintenant, il serait intéressant de compléter ces observations par une étude segmentaire par échocardiographie et *via* des investigations histologiques afin d'évaluer plus précisément la taille des infarctus.

Dans le même temps, nous avons pu observer de manière inattendue que les expressions en ARNm codant pour les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  des chaînes lourdes de la myosine et la pompe Serca2a étaient fortement diminuées, tandis que l'expression du BNP était significativement augmentée. Ces résultats ont aussi été décrits par Port et ses collaborateurs dans un modèle d'IDM par une ligature permanente de la coronaire gauche descendante, mais sur un fond C57Bl/6. Ce travail portait sur des échantillons de ventricules où la zone infarctée avait été retirée avant l'extraction (Port et al., 2011). Nos variations d'expression n'ont pas été retrouvées comme étant majorées chez les animaux KOM. Ceci concorde avec nos données d'échocardiographie qui indiquaient que les animaux présentent des infarctus de tailles identiques avec des effets similaires.

#### **La perte de fonction de Nav1.5 augmente l'incidence des troubles du rythme en phase aiguë de l'infarctus du myocarde**

Le suivi de l'activité électrique cardiaque, en continu par télémétrie, nous a permis de montrer pour la toute première fois une augmentation de l'incidence des troubles du rythme en association avec une perte de fonction pour Nav1.5. Suite à l'induction de l'infarctus, nous avons en effet observé, chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>, une augmentation significativement plus élevée de la fréquence des extrasystoles ventriculaires au cours des 24 premières heures. Puis entre 24 et 48 heures post IDM, les taux d'arythmies deviennent relativement faibles et identiques entre les animaux sauvages et KOM. Cette cinétique de survenue des arythmies a également été décrite chez le rat (Baldo et al., 2008). Néanmoins, aucune mortalité n'a été observée au moment de la pose de la ligature et au cours du suivi par télémétrie pendant les 48 heures suite à des fibrillations. Cependant il est établi que la souris est une espèce pour laquelle il est difficile de déclencher spontanément des troubles du rythme, comme les tachycardies et les fibrillations ventriculaires classiquement retrouvées chez l'homme, causes de décès au cours de la phase aiguë de l'IDM. Néanmoins lors de la mise en place de ce protocole, les quelques animaux KOS utilisés semblaient présenter eux ce type de complication, avec des fibrillations « massives » lors du serrage de la ligature. C'est pourquoi, avec toute proportion gardée, ces résultats sont un reflet préclinique des quelques études mettant en avant une association entre la survenue de troubles du rythme ventriculaire et la présence d'une mutation pour le gène SCN5A au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (Hu et al., 2007 ; Oliva et al., 2009).

Pour le moment, aucune cause n'a pu être clairement identifiée afin d'expliquer cette augmentation de la survenue des troubles du rythme chez les KOM. Ainsi, dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution de la fréquence cardiaque, pouvant être une source de déclenchement de

phénomènes arythmiques soit suite à une bradycardie favorisant l'apparition de parasystoles au niveau de foyers ectopiques, soit suite à une tachycardie qui va pouvoir perturber d'autant plus l'homéostasie calcique et être l'origine d'activité déclenchée. Parallèlement, avec la complexité des troubles du rythme, il n'est pas exclu que la fréquence cardiaque puisse masquer des événements arythmiques. Au cours de notre étude, nous n'avons observé aucune différence de fréquence entre les animaux sauvages et KOM sur la période des 24 premières heures où ont été observés les troubles du rythme. En revanche, une bradycardie est observée à partir de 23h, bradycardie qui est maintenue jusqu'à 48 heures. Il est décrit que les animaux *Scn5a<sup>+/-</sup>* présentent déjà une légère tendance à avoir un rythme plus bas qui pourrait, dans notre cas être exacerbée par la présence de l'infarctus. Néanmoins, il semble que l'induction des extrasystoles ne soit pas dépendante de la fréquence mais plutôt intrinsèque à la perte d'expression de *Nav1.5* puisque les survenues ont lieu au cours de la période où aucune différence de fréquence n'a été observée.

Au cours de ces premières 24 heures, nous sommes en présence d'arythmies de phase 2 suite à un infarctus du myocarde qui trouvent leur origine potentielle par deux sources : 1) une origine focalisée attribuée à la génération de DAD au niveau des **fibres de Purkinje sous endocardiques** dont l'activité est perturbée par l'ischémie, 2) une origine non focalisée avec l'induction de phénomènes de **réentrées**. Dans notre étude, les extrasystoles ventriculaires observées présentent majoritairement des formes similaires avec des intervalles de couplage identiques pour chaque animal, il semble donc que l'origine des arythmies soit plutôt focalisée.

A ce jour, dans nos conditions physiopathologiques, peu d'études sont disponibles chez les rongeurs. Les seules réelles données sur l'expression, l'activité et le rôle de *Nav1.5* dans les mécanismes arythmiques au cours de l'infarctus proviennent d'études réalisées chez le chien utilisant le modèle de Harris caractérisé par une ligature en deux temps. Précédemment, un certain nombre de papiers ont pu montrer dans ce modèle que des modifications des courants sodiques, calciques et potassiques, ainsi que des modifications des jonctions communicantes créaient des anisotropies hétérogènes structurale et ionique au niveau de la **zone sous épocardique bordant l'infarctus, responsables de l'apparition de réentrée et de TV** observées par des études de cartographie de l'activité électrique de surface et à partir de simulations informatiques (Cabo et al., 2003 ; Baba et al., 2005 ; Dun et al., 2005). Plus récemment, Dun et ses collaborateurs ont montré que l'expression de *Nav1.5* n'était pas modifiée au niveau de la zone sous épocardique bordant l'infarctus à 24 heures, mais présentait même une baisse de 25% à 48 heures, baisse maintenue à 5 jours comme décrit précédemment (Baba et al., 2005 ; Dun et al., 2005). En parallèle de l'expression de *Nav1.5*, Dun et ses collaborateurs se sont aussi intéressés à l'ankyrine G, une protéine partenaire nécessaire à l'adressage et l'expression membranaire de *Nav1.5* au niveau des disques intercalaires (Mohler et al. 2004). Dans leur modèle chez le chien, l'expression de l'ankyrine G, au niveau de la zone épocardique bordant l'infarctus, augmente à 48 heures et 5 jours post IDM, à l'opposé de l'expression de *Nav1.5*.

De manière intéressante, des études par immunomarquage de l'ankyrine G, réalisées sur des cellules isolées de la zone épocardique bordant un infarctus de 5 jours, révèlent une réorganisation de l'expression membranaire avec une perte au niveau des tubules T au profit d'une large augmentation de recrutement au niveau de la membrane latérale (Dun et al., 2013), où l'expression de Nav1.5 a été décrite comme hétérogène et diminuée (Baba et al., 2005). Cette augmentation de l'ankyrine G pourrait s'avérer être un mécanisme de compensation de l'hétérogénéité et la diminution d'expression de Nav1.5 au niveau de la membrane latérale.

D'autre part, dans la même publication, Dun et ses collaborateurs se sont aussi concentrés sur l'étude des **cellules isolées à partir des fibres de Purkinje sous endocardiques** au niveau de la zone infarctée à 24-48 heures après l'induction de l'infarctus. Ces cellules ont été précédemment décrites comme à l'origine d'arythmies spontanées associées à des DADs. Ces dernières sont expliquées par une diminution du potentiel membranaire de repos associée à une augmentation de la durée de repolarisation. Dans cette nouvelle étude, ils n'ont pu observer, par des études de Patch-clamp, aucune modification de la densité comme de l'activité pour le courant sodique. Par des approches d'immunofluorescence, de modestes modifications de la localisation de Nav1.5 ont été néanmoins observées. Associées à ces résultats, de légères altérations d'expression membranaire de la connexine 43 et 40 ont été décrites avec l'absence d'une latéralisation évidente à 5 jours post IDM. De plus, ils ont aussi montré un remodelage important au niveau des desmosomes avec les diffusions de la desmoplakine et de la desmoglénine 2, associées à des augmentations de la plakophiline 2 (PKP2) et de la desmoglobine au niveau des disques intercalaires des cellules isolées à partir des fibres de Purkinje sous endocardiques de la zone infarctée. Par une approche de co-marquage au niveau de ces mêmes cellules, l'expression membranaire de Nav1.5 était retrouvée au niveau des zones exprimant le plus abondamment la PKP2, soit au niveau des disques intercalaires (Dun et al., 2013). En effet, la PKP2 a été montrée comme très relevant lors d'études portant sur les troubles de conduction pour plusieurs raisons : 1) en 2007, la baisse transitoire par shRNA de la PKP2 a été associée à une baisse de l'expression totale et une redistribution intracellulaire de la connexine 43 conduisant à un défaut de couplage sur des cardiomyocytes néonataux de rats (Oxford et al., 2007) ; 2) en 2009, la PKP2 a été décrite comme interagissant et étant colocalisée avec Nav1.5 au niveau des cardiomyocytes chez la souris. De plus, cette baisse d'expression transitoire a été aussi associée à une réduction du courant sodique dans les cardiomyocytes adultes et à une baisse de la conduction liée à des activités de réentrées spontanées dans des monocouches de cardiomyocytes néonataux de rat (Sato et al. 2009). Plus récemment, il a été décrit, par immunofluorescence, des désorganisations pour Nav1.5 et la connexine 43 dans une grande majorité des tissus provenant de patients décédés et présentant une cardiomyopathie arythmogène associée à des mutations sur la PKP2. Ces observations suggèrent un lien entre ces trois entités (Noorman et al., 2013). En conséquences, les auteurs concluent en proposant que le ralentissement de la conduction observée serait lié plutôt à une altération du courant  $I_{K1}$ . Ainsi

les arythmies pourraient ne pas être directement associées à une dysfonction de Nav1.5 au niveau des fibres de Purkinje sous endocardiques de la zone bordant l'infarctus (Dun et al., 2013).

En conclusion, à la vue des nombreux éléments développés précédemment, il semble ressortir que les cellules, dans le contexte de l'infarctus du myocarde en phase aiguë, puissent présenter des mécanismes compensateurs qui pourraient maintenir, comme la PKP2 au niveau des disques intercalaires, ou tenter de rétablir, comme l'ankyrine G au niveau des membranes latérales, l'expression de Nav1.5. Ces observations soulignent de manière indirecte le rôle primordial de Nav1.5 pour les cellules dans le maintien et la stabilité de leur activité électrique.

Maintenant, si nous extrapolons à partir des résultats obtenus sur les remodelages décrits chez le chien, dont l'existence et la cinétique d'apparition nécessiteraient d'être confirmées chez la souris, la réduction de Nav1.5 chez les animaux KOM pourrait avoir plusieurs conséquences.

Dans un premier temps, la baisse préalable d'activité du canal pourrait perturber l'activité électrique des fibres de Purkinje des animaux déficients en accentuant les mécanismes à l'origine de la réduction d'amplitude et d'augmentation de la durée de repolarisation observées sous ischémie chez des animaux sauvages, et ainsi favoriser la genèse de DADs pouvant être à l'origine des extrasystoles ventriculaires observées.

Dans un deuxième temps, même si cette source est moins focalisée, les réductions préalables de l'expression et d'activité de Nav1.5, au niveau de la zone épicaudique bordant l'infarctus, pourrait avoir pour conséquences : 1) soit une augmentation des phénomènes de réentrée en accentuant le bloc fonctionnel unidirectionnel généré au niveau de la zone par une synergie de cette perte préalable chez les KOM avec la diminution de l'expression de Nav1.5 induite par l'infarctus; 2) soit une précocité dans l'apparition des phénomènes de réentrée au niveau de la zone épicaudique. Il faut cependant noter que les autres remodelages ioniques impliqués dans la génération de circuits de réentrée chez le chien ne seront peut-être pas tous présents ou à maturité à des périodes plus précoces.

Dans un dernier temps, il apparaît de plus en plus évident qu'au delà de son activité de canal ionique, la présence physique de Nav1.5 va avoir un ou des rôles sur la physiologie du cardiomyocyte. Dans notre équipe, en lien avec l'étude du modèle Scn5a<sup>+/-</sup> au cours du vieillissement, le traitement chronique d'animaux sauvages jusqu'à 60 semaines avec la flécaïnide, un inhibiteur des canaux sodiques, a clairement montré une élévation de la durée du QRS sans recruter les voies de signalisation et induire la fibrose observées chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>. Ainsi, la réduction du courant sodique à elle seule ne suffit pas pour expliquer le phénotype observé chez les animaux invalidés à l'état hétérozygote. L'absence physique de Nav1.5 à la membrane est donc déterminante dans le développement du phénotype des animaux et peut en partie expliquer la différence de pénétrance entre les individus KOM et KOS. Depuis quelques années, des parutions dressent le constat que Nav1.5 interagit avec de nombreuses protéines partenaires avec des notions de pools de canaux Nav1.5 en fonction de la localisation au niveau du cardiomyocyte et des protéines partenaires en cause, dont

l'ankyrine G ou la SAP97 en autres (Petitprez et al., 2011 ; Shy et al., 2012). De plus, des interactions ont aussi été décrites entre le canal Nav1.5 et des protéines intégrées dans différents types de jonction principalement au niveau des disques intercalaires, comme la connexine 43 pour les jonctions communicantes (Rhett et al., 2012), ou la plakophiline 2 en lien avec les desmosomes (Sato et al., 2009). De manière intéressante, des interactions existent entre l'Ankyrine G, Nav1.5, la connexine 43 et la plakophiline 2 (Sato et al., 2011). Donc, à la vue de tous ces éléments, on peut aussi envisager que la perte d'expression de Nav1.5 chez les animaux KOM puisse avoir un impact sur ces interactions ou les stœchiométries de ces différentes protéines au niveau des disques intercalaires avec des répercussions potentielles sur la conduction.

### **Maintien et accentuation du défaut de conduction chez les animaux KOM 48 heures après l'infarctus du myocarde**

Secondairement à l'évaluation des arythmies ventriculaires, nous avons étudié l'état de la conduction chez ce même modèle. La durée du QRS est augmentée à 24 heures post IDM et tend légèrement à revenir vers des valeurs de base à 48 heures. Ces observations pourraient être concordantes avec le suivi réalisée par Gerhmann et ses collaborateurs qui montrent des valeurs élevées de la durée du QRS à 3 heures après l'infarctus qui revient vers des valeurs normales à 4 et 14 jours après l'infarctus (Gerhmann et al., 2001). Néanmoins, la différence de durée du QRS entre les souris WT et KOM est conservée puis augmentée à 24 et 48 heures après l'infarctus. Ainsi, il semble que l'infarctus accentue les troubles de la conduction initialement présents chez les animaux KOM. Pour essayer d'identifier des causes, nous avons investigué les expressions transcriptomiques de la connexine 43 et de Nav1.5, deux des trois composantes majeures de la conduction. Une diminution de l'expression de la connexine 43 a été observée par rapport à la condition contrôle, diminution qui est significativement plus importante chez les animaux KOM en comparaison avec les sauvages. Pour l'expression de Scn5a, la seule différence significative observée est une réduction chez les KOM infarciés par rapport aux sauvages.

Au niveau de la littérature, les seules données d'expression et de localisation existantes à 24 et 48 heures post IDM ont été réalisées chez le chien, principalement au niveau de la zone bordant l'infarctus, zone où une baisse de l'expression de 25% de Nav1.5 apparaît à 48 heures au niveau du myocarde sous épocardique bordant l'infarctus, sans modification au niveau de la zone non infarciée (Dun et al., 2013). A ce jour, chez la souris, les expressions de l'ARNm et de la protéine Nav1.5 ont été seulement étudiées et décrites comme étant réduites à 7 jours, au niveau de la zone bordant l'infarctus (Cai et al., 2014).

Pour l'évolution de l'expression de la connexine 43 au cours de la phase aiguë, aucune donnée n'est disponible sur son niveau d'expression au temps de notre étude. En revanche, elle a été fortement étudiée sur d'autres aspects. L'utilisation du modèle d'inactivation à l'état hétérozygote pour la connexine 43 (Cx43<sup>+/-</sup>) n'a montré aucune différence d'incidence d'arythmies à 3 et 6 jours après

l'IDM (Betsuyaku et al., 2004). Néanmoins, il semblerait que la taille de l'infarctus soit diminuée à 8 jours et 10 semaines chez les animaux Cx43<sup>+/-</sup> (Kanno et al. 2003). Cependant, à l'opposé, une étude chez le rat montre qu'un traitement avec le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), drogue capable d'augmenter l'expression de la connexine 43, est associée à des diminutions du nombre d'extrasystoles au cours des 24 premières heures ainsi que de la taille de l'infarctus (Baldo et al., 2008). Chez le chien, il a été montré une augmentation de densité de la connexine 43 au niveau des membranes latérales des cellules du myocarde se situant ainsi au centre du circuit responsable des réentrées et tachycardies ventriculaires induites par stimulation programmée à 5 jours après l'infarctus (Cabo et al., 2006). Plus récemment, à 24 heures post IDM chez la souris, une latéralisation de la connexine 43 au niveau des cardiomyocytes de la lésion de l'infarctus a été décrite (Duffy et al., 2012). De plus, dans le contexte d'ischémie, une étude a montré que la déphosphorylation de la connexine 43 conduisait à son internalisation responsable d'un découplage des cardiomyocytes dans ces conditions (Beardslee et al., 2000).

Concernant les résultats négatifs sur les troubles arythmiques du modèle Cx43<sup>+/-</sup> lors de la phase aiguë, contrairement à notre situation, il a été montré que la conduction commençait à être atteinte seulement au niveau du ventricule droit lorsque le taux d'expression de la connexine 43 était de l'ordre de 10% du niveau basal. Ceci met en évidence la nécessité d'une diminution d'expression drastique pour pouvoir commencer à identifier des effets sur la conduction. Tandis que seulement 50% de baisse de Nav1.5 présente des impacts sur la conduction au niveau du ventricule gauche et droit (Stein et al., 2011). Cependant, il ne peut être exclu que l'invalidation à l'état hétérozygote pour la connexine 43, étant présente dès la naissance, soit à l'origine de la mise en place de systèmes de compensation qui ne « reflètent » peut-être pas les effets observés lors d'une diminution de la connexine 43 dans des conditions physiopathologiques comme l'infarctus du myocarde. De manière intéressante, le même groupe a montré qu'une baisse inductible de l'expression de la connexine 43 inférieure à 5% permettait d'identifier deux populations d'animaux selon l'induction possible de TV sur cœur isolé et perfusé. La population qui présentait une possibilité d'induction de TV avait des défauts d'expression de connexine 43 plus sévères avec une association de zone déplétée en connexine 43 et en Nav1.5 (Jansen et al. 2012).

Dans notre situation, les régulations transcriptomiques observées pourraient expliquer l'état de la conduction à 48 heures observée chez nos animaux. Cependant, pour expliquer cette différence et pour apporter des réponses sur les causes possibles à l'origine du développement des troubles du rythme au cours des premières 24 heures, il serait nécessaire d'investiguer les expressions et les localisations de Nav1.5 et de la connexine 43 à différents temps (6, 12, 24 ou 48 heures). En effet, comme les investigations précédentes ont été réalisées sur la totalité du cœur gauche, il va être important à l'avenir de distinguer la zone infarctée de la zone saine aux différents temps choisis. Cependant, la précocité des délais de ces mécanismes lors de la mise en place de la cicatrice myocardique rend cette approche délicate, d'où notre approche globale en première intention.

### **La perte d'expression de Nav1.5 est associée à un profil pro inflammatoire**

L'infarctus du myocarde va être associée à une réponse inflammatoire qualifiée de stérile. Cette dernière, nécessaire pour la mise en place cicatrisation, peut s'avérer être inadaptée et/ou délétère si elle n'est pas correctement régulée. En réponse à la lésion myocardique causée par l'ischémie, les molécules libérées par les cellules nécrosées ou à *minima* stressées ainsi que les débris de la matrice extracellulaire vont être identifiés comme autant de signaux de dangers ou DAMPs (Danger Associated Molecular Domain) par les récepteurs de l'immunité innée, dont les TLR (Toll-like Receptor) les récepteurs les plus caractérisés et étudiés. Ils sont à l'origine de l'induction des voies de signalisation conduisant à la synthèse de cytokines, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, et l'IL-1 $\beta$ , 3 cytokines pro-inflammatoires communément associées au processus de remodelage faisant suite à un IDM (Frangiogannis et al., 2012 ; Sandanger et al., 2013). Ces cytokines sont très rapidement synthétisées et sécrétés au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (Pudil et al., 1999). L'étude de l'expression de ces cytokines nous a révélé l'existence d'un profil plutôt pro inflammatoire majoré chez les animaux KOM infarciés. En effet, 48 heures après l'IDM, nous avons mis en évidence un tendance à l'augmentation d'expression de l'interleukine 6 et une élévation significative de l'expression de l'interleukine-1 $\beta$  chez les animaux KOM. En revanche et de manière suspecte, aucune élévation du TNF- $\alpha$  n'a été observée dans nos conditions expérimentales.

A ce jour, nous ne pouvons pas expliquer l'absence d'expression de la cytokine TNF- $\alpha$  qui normalement voit son expression augmenter de concert avec les 2 autres cytokines précédemment citées. N'étant pas augmentée dans nos deux populations d'animaux, il semble que nous ne nous situons pas à un temps où son expression transcriptionnelle soit élevée. En fonction des modèles, cette dernière est décrite comme augmentée à 3 jours chez la souris (Gao et al., 2010) ou bien à une semaine chez le rat (Yue et al., 1998). Or, je rappelle que nous sommes dans notre étude à 48 heures post-IDM.

L'IL-6, comme les 2 autres cytokines, est une molécule pro inflammatoire exprimée et sécrété au cours de la phase aiguë de l'infarctus. Il a été montré que son expression transcriptionnelle était stimulée par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  dans des cardiomyocytes en culture et retrouvée au niveau de la zone bordant l'infarctus (Gwechenberger et al., 1999). Une étude utilisant le modèle IL6<sup>-/-</sup>, n'a observé aucune modification de la survie ou de la sévérité du remodelage en phase aiguë et chronique après l'IDM. Ces observations suggèrent selon les auteurs une compensation par d'autres membres de la famille de l'IL-6 (Fuchs et al., 2003). Plus récemment, l'utilisation curative d'un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-6 chez la souris, a montré des améliorations du remodelage comme de la fonction à 7 et 28 jours, sans modification néanmoins du taux de rupture avec le groupe placebo post-IDM (Kobara et al., 2010). Donc il semble que cette cytokine est un rôle majeur dans le remodelage post ischémique sans présenter de réelle implication sur le phénomène de rupture cardiaque à proprement parlé.

Etant la plus significativement augmentée chez les animaux KOM, la discussion portant sur l'IL-1 $\beta$  va être développée en détail, même si les 2 autres cytokines restent très importantes. A la vue de la littérature, l'IL-1 $\beta$  offre sous différents aspects de nombreuses perspectives en lien avec l'augmentation des troubles du rythme observée dans les premières 24 heures et le remodelage cardiaque des animaux au delà des 48 heures post IDM.

### **L'interleukine 1 beta : une cytokine clé associée aux remodelages au cours la phase aiguë et chronique post-IDM**

L'IL-1 $\beta$  est probablement le plus important signal d'amplification de l'inflammation à la vue de sa capacité à induire la sécrétion d'autres cytokines. La libération de l'IL-1 $\beta$  est hautement régulée *via* la réalisation de 2 étapes en série : 1) un signal initial pour stimuler la synthèse du précurseur de l'IL-1 $\beta$ , 2) un signal secondaire pour activer l'IL-1 $\beta$  par un clivage protéolytique du précurseur générant la forme active. Le second signal va nécessiter le recrutement et l'activation d'un complexe multi protéique, souvent nommé l'inflammasome, regroupant notamment l'ASC-1 (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain type 1) et surtout la caspase 1 qui va être en mesure de cliver le précurseur de l'IL-1 $\beta$  (Sandanger et al., 2013).

En 2011, Mezzaroma et ses collaborateurs ont pu, par marquage en immunofluorescence de l'ASC-1, établir une distribution cellulaire de l'inflammasome, au cours de la phase de l'IDM dans la zone granuleuse et bordant l'infarctus chez la souris. A 3 jours post IDM, l'expression est trouvée majoritairement dans les leukocytes, puis dans les fibroblastes et enfin exprimée en quantité identique dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. En revanche, à 7 jours post IDM, l'expression la plus élevée est décrite dans les cardiomyocytes, alors qu'elle décroît chez les fibroblastes, les cellules endothéliales et les leukocytes. Les auteurs n'ont observé aucune élévation significative au niveau du myocarde non infarcié (Mezzaroma et al., 2011). Des études, réalisées à partir de modèle d'ischémie/reperfusion (I/R), ont montré que l'activation de l'inflammasome dans les fibroblastes semble être primordiale pour les apparitions des lésions d'I/R (Kawaguchi et al., 2011). De plus, les expressions en ARNm codant pour des éléments de l'inflammasome et des cytokines, comme l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-18, sont significativement plus importantes dans les cellules non cardiomyocytaires de cœur infarciés de 7 jours par I/R (Sandanger et al., 2013).

De nombreuses études *in vitro* mettent en évidence que le traitement de fibroblastes cardiaques en culture avec du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$  est en mesure de stimuler la migration (Brown et al., 2007 ; Mitchell et al., 2006), l'expression et l'activité des MMPs (Siwik et al., 2000 ; Xie et al., 2004 ; Brown et al., 2007), ainsi que l'expression du récepteur à l'angiotensine de type 1 (Gurantz et al., 2005), dont l'expression est modulée au cours du remodelage post-infarctus. Paradoxalement, l'IL-1 $\beta$  a des effets controversés sur la prolifération des fibroblastes bien qu'étant décrit comme capable de réduire la différenciation de ces derniers en myofibroblastes (Turner et al., 2014).

En 2012, Baum et ses collaborateurs ont montré que l'IL-1 $\beta$  était fortement exprimée au niveau de la zone épicaudique bordant un infarctus du myocarde de 5 jours chez le chien. Dans cette étude, les auteurs ont observés respectivement que le traitement avec de l'IL-1 $\beta$  d'astrocytes ou d'une lignée de cellules rénales de chien, culture capable de former des jonctions communicantes, conduisait à une internalisation de la connexine 43. De plus, toujours à partir de la zone épicaudique bordant l'infarctus à 5 jours, ils ont pu constater, *via* une approche d'immunofluorescence, la présence d'une expression hétérogène de la connexine 43 avec des zones ne présentant quasiment aucun marquage, zone où se situent des myofibroblastes positifs pour l' $\alpha$ -SMA. Inversement, ils ont également observés des zones avec un fort signal pour la connexine en absence de myofibroblastes. Contrairement aux études *in vitro*, ils montrent, *in situ*, que les myofibroblastes ne forment aucune interaction avec les cardiomyocytes adjacents. Par des approches de simulations bioinformatiques, ils ont émis l'hypothèse que la présence de clusters myofibroblastiques représenterait une des sources arythmogènes post infarctus *via* la sécrétion d'interleukine 1 $\beta$  conduisant localement à des découplages intercellulaires, avec une réorganisation de l'expression membranaire de la connexine 43, associée à une baisse de la conduction et la formation de bloc (Baum et al. 2012). Ainsi, l'expression de la connexine 43 semble être absente des zones en présence de myofibroblastes. Cependant, d'autres études décrivent que : 1) le niveau d'expression de la connexine 43 dans les fibroblastes cardiaques pourrait influencer les capacités couplage intercellulaire et de prolifération des fibroblastes (Zhang et al. 2008), 2) une augmentation de l'expression de la connexine 43 dans les cultures de myofibroblastes murins isolés de la zone infarctée ou non serait associée à une augmentation du couplage intercellulaire par rapport à des animaux contrôles (Zhang et al., 2010). La connexine 43 a également été décrite comme contribuant à la voie du TGF- $\beta$  dans la différenciation de fibroblastes néonataux cardiaques de rat en myofibroblastes (Asazuma-Nakamura et al., 2009). Inversement, une autre étude a décrit que l'IL-1 $\beta$  supprime la différenciation induite par le TGF- $\beta$  des fibroblastes cardiaques de rat adulte en myofibroblastes (Brønnum et al. 2013). A la vue de ces quelques publications, il reste à découvrir les origines de ses divergences. Le passage d'étude *in vivo* à *in vitro*, la coopération et le niveau d'expression de ces cytokines dans un environnement aussi complexe que celui de l'infarctus, l'existence de cinétique complexe et les différences d'espèces utilisées pour ces études sont autant d'éléments de discussion. Toute fois, il semble que l'interleukine 1 $\beta$  puisse avoir des implications sur la conduction cardiaque en modulant l'expression de la connexine 43.

Des stratégies visant la voie de l'IL-1 $\beta$ , par l'utilisation d'anticorps neutralisant la cytokine ou d'anticorps inhibiteur de son récepteur, ont été conduites afin de définir son rôle dans le remodelage cardiaque. Dans une première étude, Hwang et ses collaborateurs ont observé que l'utilisation d'un anticorps d'hamster neutralisant l'IL-1 $\beta$  provoquait une augmentation du taux de rupture cardiaque au cours de la mise en place de la cicatrice myocardique, et accentuait le remodelage cardiaque post-ischémique (Hwang et al., 2001). A l'opposé, Abbate et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation de l'Anakinra, un anticorps recombinant humain dirigé contre le récepteur de l'IL-1 $\beta$ , était associé à

une amélioration de la survie, une réduction de l'apoptose au niveau de la zone bordante et une amélioration du remodelage ventriculaire à 7 jours post IDM (Abbate et al. 2008). Dans une étude plus récente, en utilisant cette fois-ci un anticorps génétiquement modifié et dirigé contre l'IL-1 $\beta$ , le même groupe a montré que la déplétion sérique en IL-1 $\beta$  conduisait aux mêmes résultats à 7 jours que l'inhibition du récepteur sur le remodelage cardiaque et contrairement à l'étude de Hwang en 2001, améliorait aussi le remodelage cardiaque à 2 et 4 semaines post IDM avec une réduction de la dilatation et une augmentation de la fraction de raccourcissement par rapport au groupe placebo (Abbate et al., 2010). Dans une approche de modèle physiopathologique chez la souris, il a été montré que la production d'IL-1 $\beta$  pouvait être induite principalement dans les fibroblastes en réponse au stretch. Cette augmentation interviendrait dans la mise en place d'une hypertrophie compensatrice induite *via* un modèle de surcharge de pression par rétrécissement aortique (Honsho et al., 2009). Chez l'homme, la réalisation d'un suivi longitudinal à 1 an du dosage sérique de nombreuses cytokines, et l'étude de la structure/fonction par IRM, a montré, chez 42 patients présentant un premier infarctus reperfusé, que le niveau d'IL-1 $\beta$  mesuré après la prise en charge s'avère être un facteur prédictif potentiel fortement associé à la dysfonction cardiaque et à la masse du ventricule gauche non infarcté (Ørn et al., 2012).

Au travers de ces différentes études, l'IL-1 $\beta$  semble être fortement associée aux remodelages structuraux et fonctionnels du ventricule gauche. Elle pourrait être une source arythmogène, au cours de ces phases aiguë ou chronique post IDM. Dans notre étude, les animaux KOM infarctés présentent une augmentation significative de l'expression de l'IL-1 $\beta$  à 48 heures post IDM. Ainsi, de nombreuses pistes pourront être explorées : 1) il sera tout d'abord nécessaire de confirmer l'expression protéique et la sécrétion effective d'IL-1 $\beta$  à 48 heures ; 2) d'autres investigations devront être réalisées à différents temps, autres que 48 heures, afin de définir la cinétique d'expression de l'IL-1 $\beta$  et le contexte inflammatoire des animaux KOM ; 3) il sera aussi intéressant, le cas échéant, d'identifier le ou les type(s) cellulaire(s) responsable(s) de cette augmentation d'expression pour l'IL-1 $\beta$  ; et 4) étudier les effets de ce profil inflammatoire sur l'expression et la location de la connexine 43 dans notre modèle qui pourrait être une des causes responsables de l'apparition des troubles du rythme au cours des 24 premières heures, mais encore des effets sur le remodelage cardiaque post ischémique après 48 heures.

#### **Remodelage de la matrice extracellulaire à 48 heures**

Connaissant les capacités de notre modèle d'invalidation à développer de la fibrose avec le vieillissement, nous avons étudié l'expression transcriptomique d'un certain nombre de protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC).

En effet, lors de cette période, une réorganisation de la MEC, afin de rendre la zone ischémisée accessible, est indispensable. Elle permet d'épurer cette zone en la rendant accessible aux macrophages et neutrophiles, et activer tous les mécanismes nécessaires à la mise en place de la cicatrice myocardique. Comme il le sera abordé plus tard, cette réorganisation peut s'avérer être

critique lorsqu'elle n'est pas finement régulée pouvant contribuer au développement d'une rupture cardiaque.

En accord avec ce processus, nous avons pu enregistrer une augmentation significative de l'expression de la MMP-9 et son inhibiteur TIMP-1 à 48 heures post IDM, sans aucune différence observée entre les animaux sauvages et KOM. Ces données d'expression sont en accord avec les données rapportées dans la littérature (Gao et al., 2010). Ainsi, l'expression de l'ARNm codant pour TIMP-1 est décrite comme augmentée au cours des 3 premiers jours. Cependant, l'expression protéique semble s'élever plus tardivement à partir de 2 semaines (Vanhoutte et al., 2006). Maintenant, concernant certains acteurs impliqués dans la synthèse de la matrice de collagène, nous n'avons pas observé de différence pour l'expression en ARNm codant pour le TGF- $\beta$ 1, et une tendance à la baisse de celles des ARNm codant pour les pro-collagènes Ia1 et IIIa1. Ceci est concordant avec les quelques résultats publiés au niveau de la phase aiguë de l'infarctus (Yue et al., 1998 ; Curdy et al., 2011).

A l'avenir, il sera nécessaire d'étudier d'autres temps post IDM et d'élargir le panel d'investigations en s'intéressant à l'expression protéique et plus exactement à l'activité de la MMP-9 ou la MMP-2 majoritairement décrite comme intervenant dans les remodelages de la MEC. Il faudra travailler aussi sur l'expression de tous les inhibiteurs des MMPs, comme TIMP-1 à TIMP-4. Le cas échéant, en fonction de la survie des animaux et l'évaluation de la balance entre synthèse et dégradation, d'autres voies, comme la régulation de la formation et de la stabilisation des fibres de collagène, pourront être explorées. En effet, il a été décrit que des défauts de ces voies pouvaient conduire à des altérations dans la maturation de la cicatrice myocardique (Lopez et al., 2010).

Comme évoqué précédemment, les cytokines pro inflammatoires peuvent stimuler les expressions transcriptionnelles des MMP-2 et 9 et pourraient être responsables d'une augmentation de leur activité observable par zymographie. Une élévation significative de l'expression de l'IL-1 $\beta$  a été reportée chez les animaux KOM, sans effet apparent sur la transcription de la MMP-9. Cependant nous sommes peut-être dans une phase intermédiaire, où l'expression des cytokines n'a pas encore été en mesure de réguler les activités promotrices du gène MMP-9 d'où la nécessité d'investiguer à d'autres temps pour clarifier la situation sur les niveaux d'expression des interleukines et des MMPs, et leurs impacts potentiels sur la structure et la fonction du cœur.

### **Rupture cardiaque et remodelage chronique lié à l'insuffisance cardiaque**

Au cours de nos travaux, nous avons rencontré de très grandes difficultés à dépasser le stade de la « phase inflammatoire » chez nos animaux opérés afin d'étudier le remodelage chronique après l'induction de l'IDM. En effet, au cours de nos premières séries, seulement 30 à 40% des animaux sauvages et KOM survivaient après le 7<sup>ème</sup> jour. La totalité des décès constaté entre 3 et 7 jours est due à la mise en place d'une rupture cardiaque.

Chez l'homme, l'incidence de cette rupture a fortement été réduite suite à la mise en place des techniques de reperfusion et une prise en charge thérapeutique dédiée. Ne touchant que 1 à 3% des patients étant dans la phase aigüe de l'infarctus, cette complication pourrait néanmoins être sous estimée (Gao et al., 2012). La souris, contrairement à d'autres, est une espèce où la rupture cardiaque se développe classiquement au cours de la phase aigüe de l'infarctus du myocarde. C'est pourquoi, elle est le modèle d'étude retenu pour de nombreuses publications visant à comprendre les mécanismes responsables de cette complication post IDM. La rupture cardiaque va varier, en terme d'incidence et de délai, en fonction de nombreux facteurs : l'âge (Yang et al., 2008), le sexe (Gao et al., 2005 ; Fang et al., 2007), l'espèce, la souche de souris utilisée (Gao et al., 2005 ; van den Borne et al., 2009), le niveau d'inflammation, l'expression et l'activité des métalloprotéinases (Tao et al., 2004), les propriétés des collagènes (Fang et al., 2007; Fang et al., 2008) et la taille de l'infarctus (Gao et al., 2010). Plus particulièrement, en 2010, Gao et ses collaborateurs ont réalisées une étude comparative entre des souris mâles de fonds génétiques Sv129 et C57Bl/6. Dans ces travaux, ils ont pu mettre en évidence plusieurs éléments : 1) une apparition plus précoce du phénomène de rupture cardiaque chez les animaux de fond Sv129 avec une augmentation d'un facteur 2 de l'incidence au cours des 7 premiers jours suite à l'IDM, 2) la rupture cardiaque apparaît seulement pour des tailles d'infarctus de l'ordre de 40-45% du ventricule gauche, 3) à 48 heures, malgré une faible incidence de rupture cardiaque en comparaison avec la souche Sv129, les souris C57Bl/6 présentent un remodelage et dysfonction ventriculaires plus sévères par échocardiographie expliquant une incidence d'insuffisance cardiaque aigüe plus élevée pour des tailles d'infarctus comparables, et 4) la différence d'incidence de rupture cardiaque entre les deux souches est liée au développement d'une inflammation plus sévère en réponse à l'IDM chez les animaux Sv129 (Gao et al., 2010).

Nous avons pu observer que le fond génétique sv129, sur lequel est stabilisé notre modèle d'inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A, représente la souche murine où l'incidence de rupture cardiaque est largement plus élevée en comparaison à d'autres fonds classiquement utilisés pour des projets de recherche comme le fond C57Bl/6 (van den Borne et al., 2009). Comme, il avait été précédemment décrit des variations de phénotype pour une même mutation entre deux fonds génétiques (Remme et al., 2009), il a été décidé au sein de mon équipe de dériver chacun de nos modèles murins sur deux fonds génétiques en parallèle : le fond Sv129 en lien avec notre modèle canonique *Scn5a<sup>+/-</sup>*, et le fond génétique C57Bl/6, très largement utilisé pour les modèles murins en recherche cardiovasculaires.

La dérivation et la stabilisation du modèle *Scn5a<sup>+/-</sup>* sur le fond C57Bl/6 vient d'être finalisée et va donc être disponible afin de réaliser des expérimentations d'IDM. Au cours de la dérivation, dès la première génération, malgré une conservation de toutes les altérations de conduction décrite sur le modèle *Scn5a<sup>+/-</sup>*, il a été observé la perte de la distinction de deux populations d'animaux *Scn5a<sup>+/-</sup>* en terme de durée de QRS et l'absence de fibrose à l'âge de 60 semaines, antérieurement observées sur le fond Sv129 (Figure 39). Ces différences de phénotype entre les deux souches devraient faire

prochainement l'objet de la mise en place d'un nouveau projet d'investigation utilisant la technologie RNASeq afin d'identifier des variations d'expression de gènes permettant d'expliquer ces observations.

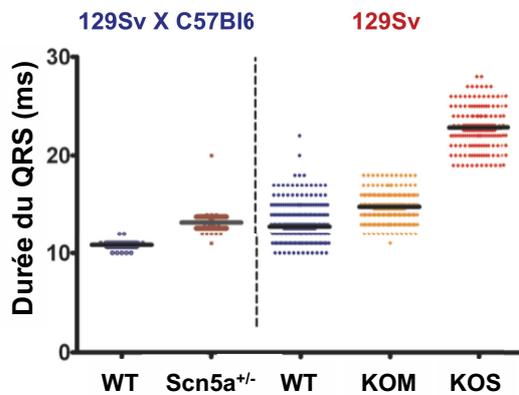


Figure 39: Durées du QRS et dérivation du modèle  $Scn5a^{+/-}$  sur le fond C57Bl/6.

Dans le cadre de notre étude sur les implications du gène SCN5A dans les remodelages ventriculaires post ischémiques, il nous a été impossible d'obtenir des animaux, de fond Sv129, avec des tailles d'infarctus convenables et en nombre suffisant afin de permettre l'étude des remodelages structuraux et fonctionnels observés lors d'une insuffisance cardiaque post ischémique. Les quelques animaux, ayant passés le cap de la phase aiguë, présentaient, comme attendue, des petites tailles d'infarctus réduites avec des répercussions fonctionnelles mineures. Néanmoins, sur la base de ces données préliminaires, il nous a semblés malgré tout observer une tendance chez les animaux  $Scn5a^{+/-}$ . Alors que ces animaux présentaient les mêmes indices de « Wall motion score index », ces derniers semblent présenter des remodelages structuraux et fonctionnels plus développés à 4 semaines post IDM, tout en soulignant le caractère préliminaire de ces données.

A la vue de cette difficulté à obtenir des animaux insuffisants cardiaques sur le fond Sv129, maintenant il sera plus facile de tester notre hypothèse en utilisant le modèle  $Scn5a^{+/-}$  sur le fond stabilisé C57Bl/6. En effet, comme nous avons pu le voir au travers des études sur la rupture cardiaque, l'inflammation et la gestion de la matrice extracellulaire ne sont pas comparables entre nos deux fonds d'intérêt. Cependant, l'induction d'un infarctus du myocarde sur le fond génétique C57Bl/6, qui ne présente pas de modification notable de la matrice extracellulaire dans des conditions de base, pourrait conduire à des modifications dans le développement des remodelages post ischémiques, comme l'hypertrophie, la fibrose, le développement d'arythmies. De plus, il ne peut être exclu la possibilité d'une modification de l'incidence de rupture cardiaque associée à une perte de fonction de Nav1.5, modification non identifiable sur le fond Sv129 à la vue des taux de survie observés. De manière indirecte, intéressante mais schématique, la différence d'expression phénotypique entre les Sv129 et C57Bl/6 en réponse à une perte d'expression de Nav1.5 dans des conditions de base pourrait néanmoins être conceptuellement extrapolable aux porteurs de mutation pour le gène SCN5A, variations de phénotypes classiquement imputables à leurs fonds génétiques. De plus, toujours sur la base du concept, notre approche physiopathologique pourrait suggérer que les

porteurs sains, assimilables au souris C57Bl/6 et se portant convenablement dans des conditions de vie normales, resteraient tout de même une population à risque élevé pour la survenue de complications cardiaques suite à un infarctus.

### **Vieillessement et réponse à l'infarctus du modèle *Scn5a*<sup>+/-</sup> sur le fond Sv129**

Maintenant, il faut aussi prendre en considération que les animaux KOM utilisés sont jeunes, âgés de 12 à 14 semaines pour notre étude. Ces animaux correspondent à un âge de 25 à 30 ans chez l'homme, âge où la proportion d'infarctus du myocarde est relativement faible, et des désordres physiologiques encore instables (dyslipidémie, hypertension, diabète). Cependant, nous avons montré que les animaux KOM présentaient une augmentation de l'expression de SPARC à 30 semaines (Secreted Protein, Acidic an Rich in Cysteine). Cette expression est maintenue et combinée à une augmentation d'expression du CTGF (Connective Tissue Growth Factor) à 45 semaines. Parallèlement, une augmentation significative du récepteur à l'IL-6 a été observée chez les animaux KOM et KOS à 45 semaines.

**SPARC** (Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine) est une protéine exprimée par les fibroblastes, les cellules endothéliales et dans une plus faible proportion par les cardiomyocytes. Elle va être responsable de la régulation des fibres de pro-collagènes après leur synthèse en participant à leur assemblage en fibrilles. Ce dernier représente un 3<sup>ème</sup> niveau dans la régulation du dépôt de collagène, en plus de la synthèse et de la dégradation.

Son expression a été décrite comme augmentée chez le rat suite à une stimulation  $\beta$  adrénergique ainsi que dans le ventricule gauche de patients présentant une hypertrophie. Dans une première étude, Schellings et ses collaborateurs ont montré que 1) SPARC est spécifiquement surexprimé dans la zone infarctée à 3 jours jusqu'à atteindre un plateau entre 7 et 14 jours, 2) l'inactivation de SPARC chez la souris est associée à une augmentation de la mortalité d'un facteur 4 au cours des 14 premiers jours suite à l'infarctus *via* une élévation du nombre de rupture cardiaque et d'insuffisance cardiaque, 3) et que cette augmentation d'incidence de rupture est associée un défaut de la zone de granulation et de maturation des fibres de collagène au niveau de la cicatrice myocardique (Schellings et al., 2008). Plus récemment, McCurdy et ses collaborateurs se sont attachés à définir le rôle précoce de SPARC en se plaçant à 3 jours post IDM, avant l'apparition de la rupture cardiaque. Ils ont montré que : 1) la délétion de SPARC chez la souris conduisait à une amélioration de la fonction cardiaque, non décrite précédemment qui serait potentiellement due à l'utilisation des animaux sur un fond mixte Sv129/C57Bl6 et plus âgés que lors de l'étude de Schellings, et 2) qu'inversement, la délétion de SPARC induirait aussi une perturbation au niveau de l'expression par des fibroblastes, expression pouvant être délétère sur le long terme et responsable en partie des phénomènes de rupture observés par Schellings (McCurdy et al., 2011). A l'opposé, il a été publié, dans un modèle d'infarctus reperfusé chez le rat, que la normalisation des niveaux d'expression des protéines matricellulaires dont SPARC, induite par un traitement au Candesartan ou à l'Omapatrilat

pendant 4 semaines, étaient en partie liées à l'amélioration de la structure et de la fonction des cœurs des animaux traités (Palaniyappan et al., 2013).

Dans notre modèle animal en condition native, l'expression de SPARC est augmentée à partir de 30 semaines chez les animaux KOM. Cette augmentation pourrait conduire, suite à l'infarctus, à des réponses différentes de celles observées chez les animaux jeunes. D'une part, au cours de la phase aiguë, une réduction des phénomènes de rupture cardiaque pourrait avoir lieu avec une augmentation de la maturation des fibres de collagènes au niveau de la zone infarctée, réduction non observée à ce jour chez des animaux plus jeunes qui ne présentent pas plus de rupture cardiaque que les animaux sauvages. D'autre part, si elle est maintenue élevée et différente de celle observée chez les animaux sauvages, l'expression de SPARC pourrait s'avérer délétère sur le remodelage à long terme après l'IDM.

Le **CTGF** (Connective Tissue Growth Factor) ou CCN-2, est une glycoprotéine sécrétée et associée à la matrice extracellulaire. Cette dernière a de multiples effets en fonction du type cellulaire comme la production de matrice, l'adhésion ou la prolifération cellulaire, la croissance, l'apoptose ou encore la survie cellulaire. Une surexpression du CTGF a été décrite au niveau des cardiomyocytes, des fibroblastes ainsi que des myofibroblastes au niveau de la zone infarctée pour la première fois chez le rat (Ohnishi et al., 1998). Cette surexpression a aussi été observée au cours de l'insuffisance cardiaque, d'origine ischémique ou non, dans les modèles expérimentaux ainsi que chez l'homme. Dans un contexte pathologique, son expression tissulaire est souvent associée à la présence de fibrose, dont le lien direct entre les deux phénomènes n'est pas encore établi. Malgré un rôle mal défini de l'augmentation du CTGF au cours de l'insuffisance cardiaque, cette surexpression reflète souvent l'existence d'une fibrose et d'une dysfonction cardiaque (Gravning et al., 2012). Sa surexpression spécifique, au niveau des cardiomyocytes chez la souris, a conduit au développement d'une insuffisance cardiaque au cours du vieillissement sans développement d'une fibrose. De plus, lorsque ce même modèle est placé dans des conditions de surcharge de pression avec une infusion chronique d'angiotensine II, la surexpression du CTGF a été associée à un effet protecteur sur le développement d'une hypertrophie et d'une dysfonction ventriculaire gauche (Panek et al. 2009). En revanche, dans un second modèle de surexpression cardiomyocytaire du CTGF, il a été montré que cette surexpression conduisait cette fois-ci au développement d'une fibrose au niveau du ventricule gauche, et, de manière étonnante, à une réduction de la taille des cardiomyocytes avec le vieillissement. De plus, les auteurs ont montrés des effets cardioprotecteurs de la surexpression du CTGF, au cours d'un protocole d'ischémie ré perfusion, suite à la diminution de la taille de l'infarctus, diminution qui a pu être expliquée par une suractivation de nombreuses voies de signalisation, comme la voie p-Akt ou GSK-3 $\beta$  (Ahmed et al., 2011). Cependant, malgré des tailles identiques d'infarctus après 24 heures d'occlusion permanente, le même laboratoire a montré que la surexpression du CTGF réduisait le remodelage ventriculaire post-IDM. Au cours du remodelage chronique post ischémique, ils ont décrit

l'absence d'hypertrophie, des réductions de la taille de la cicatrice myocardique, de l'inflammation et de l'apoptose. Au cours d'un suivi à 1 an post IDM, les auteurs ont aussi observé que les patients avec une concentration sérique élevée de CTGF présentaient 1) une réduction de la taille de leur infarctus, 2) une meilleure fraction d'éjection et 3) des marqueurs d'inflammation plus faibles en comparaison avec les patients avec une concentration basse de CTGF (Gravning et al. 2012).

Ces quelques données de surexpression du CTGF dans les cardiomyocytes suggèrent des effets cardioprotecteurs pour cette protéine. Ainsi dans notre modèle murin *Scn5a<sup>+/-</sup>*, l'augmentation d'expression du CTGF observée au cours du vieillissement, pourrait avoir des conséquences protectrices potentielles sur les remodelages associés à l'insuffisance cardiaque post ischémique.

Dans l'étude du profil inflammatoire, l'expression transcriptomique de l'**IL-6** tend à augmenter chez les animaux KOM suite à un infarctus du myocarde. Comme évoqué précédemment, cette cytokine semble avoir des répercussions sur le remodelage progressif du cœur avec la mise en place d'une insuffisance cardiaque. Il faut cependant noter qu'au cours du vieillissement une augmentation de l'expression protéique de son récepteur a été observée au niveau du ventricule gauche chez les animaux KOM et KOS. Ainsi, si cette expression était maintenue parallèlement au développement d'un IDM, des animaux *Scn5a<sup>+/-</sup>* plus âgés pourraient développer des remodelages plus importants en réponse à l'IL-6 synthétisée au cours de la phase aiguë et chronique de l'IDM.

#### **Fonctions non canoniques de Nav1.5 et impacts sur le remodelage post IDM**

Comme décrit précédemment, le canal Nav1.5, au delà de son rôle de canal ionique ou physique dans les cellules excitables comme le cardiomyocyte, peut avoir des rôles non canoniques dans des cellules non excitables comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ou les cellules associées à l'inflammation comme les macrophages ou les lymphocytes T.

Pour les cellules endothéliales, une première étude a démontré la présence de courants attribuables à des canaux sodiques voltages dépendants fonctionnels et résistants à la TTX dans les cellules endothéliales de la veine saphène humaine. L'isoforme à l'origine de ce courant n'a cependant pas été identifiée (Gosling et al., 1998). Une autre étude réalisée sur des cellules HUVECs (Human Umbilical Vascular Endothelial Cell) a montré par biologie moléculaire que Nav1.5 semble être la sous-unité la plus représentée dans ces cellules avec Nav1.7. De plus, ces canaux sodiques voltage-dépendant exprimés dans ces cellules sont actifs. Suite à des approches pharmacologiques et des baisses d'expression transitoire par siRNA, il a été observé que les canaux sodiques voltage-dépendant pouvaient moduler la réponse des HUVECs au VEGF. Ainsi, Nav1.5 serait impliqué dans la tubulogénèse, l'adhésion et la prolifération de ces cellules en réponse aux VEGF (Andrikopoulos et al., 2011). D'autres études, réalisées sur des cellules endothéliales primaires ou des modèles animaux, seront nécessaires pour évaluer le rôle de Nav1.5 dans les fonctions avancées par Andrikopoulos et ses collaborateurs. A ce jour, à part le développement d'une fibrose périvasculaire au cours du vieillissement au niveau du myocarde de nos animaux *Scn5a<sup>+/-</sup>*, aucune autre altération du réseau

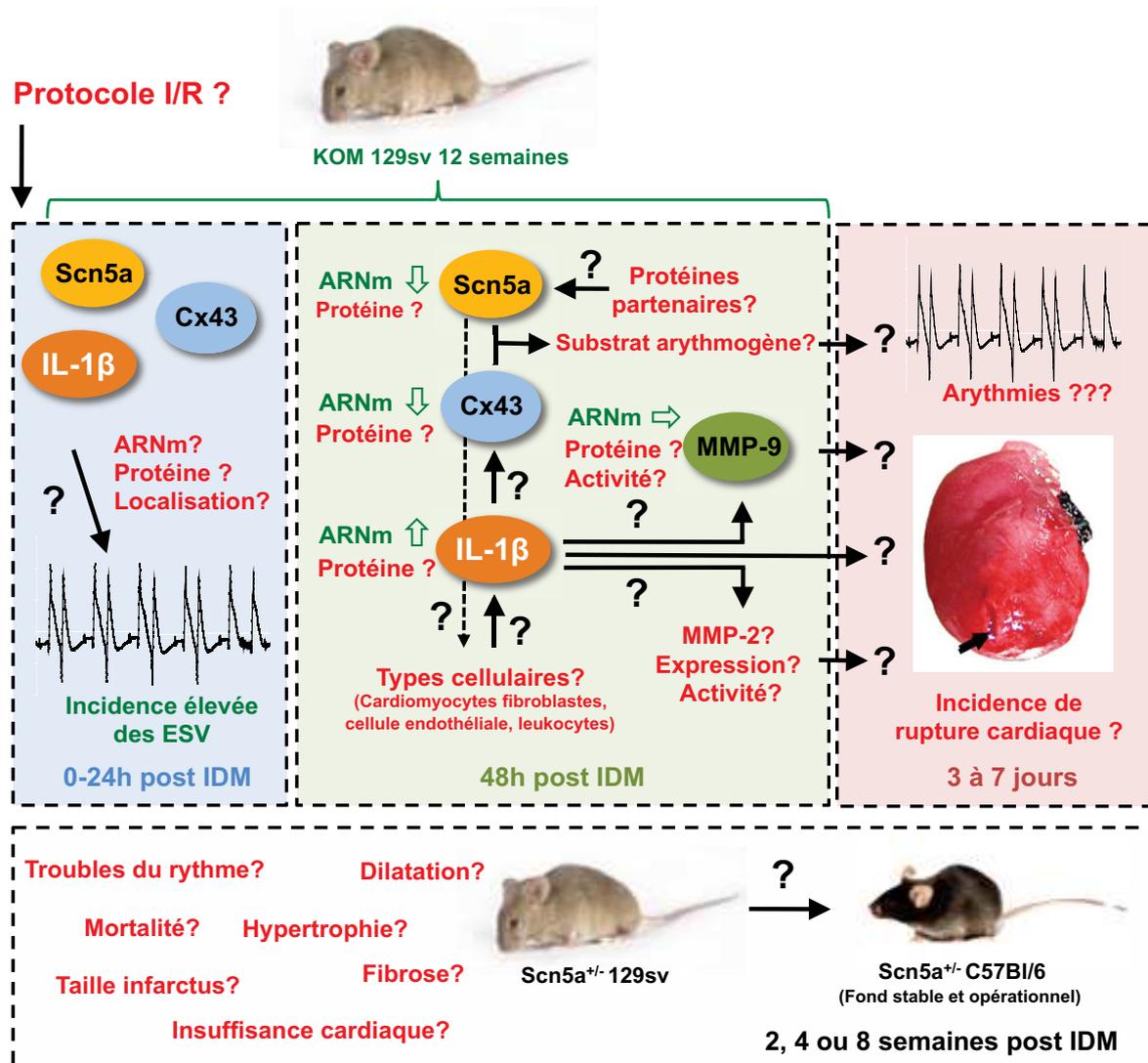
vasculaire n'a été décrite ou identifiée chez des patients et dans notre modèle au cours de son développement et son vieillissement. Cependant, cette étude suggère que des mutations pour le gène SCN5A pourraient avoir un impact sur le comportement des cellules endothéliales vasculaires en réponse au VEGF et participer ainsi à des remodelages positifs ou négatifs du système vasculaire post-IDM.

Pour les cellules musculaires lisses (CML), l'expression de Nav1.5 va dépendre du type de tissus et parfois même des compartiments constituant le tissu. Ceci a été décrit pour les vaisseaux en fonction de l'origine vasculaire ou intestinal des CMLs. Pour le moment, l'ARNm de SCN5A a été retrouvé très faiblement exprimé dans les CMLs de l'artère pulmonaire humaine (Platoshyn et al., 2005 ; Firth et al., 2011). De plus, Bocquet et ses collaborateurs ont montré, par immunomarquage, que l'expression de Nav1.5 était spécifiquement détectable dans la couche musculaire lisse de l'artère fémorale chez le rat. Suite à l'administration d'un bloqueur du courant sodique persistant, ils sont parvenus à prévenir la contraction vasculaire induite par l'hypoxie (Bocquet et al., 2010). En revanche, aucune expression n'a été identifiée dans des CMLs isolées à partir d'artère coronaire humaine (Jo et al., 2004).

Pour les fibroblastes, en 2012, Chatelier et ses collaborateurs ont montré, sur la base d'explants d'oreillettes droites obtenus à partir de patients subissant un pontage aorto-coronarien, une expression *de novo* de Nav1.5 lors de la différenciation des fibroblastes (isolés à partir des explants) en myofibroblastes (Chatelier et al., 2012). Cependant, des travaux réalisés, au sein du laboratoire à partir de fibroblastes issus de cœur de souris sauvages, ont montré une baisse de l'expression de Nav1.5 associée à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. De même, des données préliminaires, réalisées à partir de fibroblastes isolés à partir des cœurs d'animaux *Scn5a<sup>+/-</sup>*, montrent une différenciation myofibroblastique majorée en présence d'une perte d'expression initiale de Nav1.5. Comme décrit auparavant, les fibroblastes vont participer activement aux remodelages observés suite à l'IDM *via* la sécrétion d'agents bioactifs et leur capacité de différenciation en myofibroblastes. Les effets de la perte de fonction de Nav1.5 sur cette population cellulaire dans des conditions basales, mais aussi dans des conditions de stress, restent des enjeux majeurs pour la compréhension de cette différence de cinétique de différenciation myofibroblastiques.

Concernant les cellules associées à l'inflammation, il a été décrit que l'expression de Nav1.5 interviendrait dans la sélection positive des lymphocytes de type CD4<sup>+</sup> au niveau du thymus (Lo et al., 2013). Dans les macrophages, il a été montré que Nav1.5 était exprimé au niveau des lysosomes régulant leur acidification et donc la phagocytose (Carrithers et al., 2005). Cependant, dans une étude comparative sur les différences immunologiques entre l'homme et la souris, il apparaît que Nav1.5 ne semble pas exprimé dans les cellules isolées de la moelle osseuse dont dérivent les macrophages (Mestas et al., 2004).

Toutes ces cellules sont connues pour intervenir dans les remodelages cardiaques associés à l'infarctus du myocarde comme l'angiogenèse, l'inflammation ou la fibrose. Ainsi des mutations du gène SCN5A pourraient très bien, en dehors de leurs effets directs sur les cardiomyocytes, avoir des implications indirectes sur le fonctionnement de ces cellules participant ainsi au phénotype des patients porteurs des mutations et modifier éventuellement les remodelages induits suite à une cardiomyopathie acquise comme l'infarctus du myocarde.



**Figure 40: Perspectives à la suite de mes travaux de thèse.** (Cx43: connexine 43; ESV: ExtraSystole Ventriculaire; IDM: Infarctus Du Myocarde; IL: Interleukine; KOM: souris Scn5a<sup>+/-</sup> de phénotype mineur; I/R: Ischémie/Reperfusion; MMP: MétalloProtéinase Matricielle).

### Conclusions et perspectives

Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence qu'une perte de fonction pour Nav1.5, via l'utilisation d'une approche préclinique utilisant le modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup>, prédisposait les animaux à la survenue de troubles du rythme ventriculaire dans les 24 premières heures après un

infarctus du myocarde. A 48 heures post IDM, les différences de conduction initialement observées entre les animaux sauvages et Scn5a<sup>+/-</sup> de phénotype mineure (KOM) sont conservées, voir légèrement accentuées. Ceci pourrait être lié à des diminutions plus importantes des expressions pour SCN5A ainsi que pour la connexine 43. Parallèlement, un profil pro inflammatoire majoré a été décrit chez les animaux KOM. Les quelques données générées sur le remodelage chronique après l'infarctus laissent à penser que les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> pourraient présenter des remodelages ventriculaires structuraux et fonctionnels plus sévères suite à un infarctus du myocarde. Cette hypothèse, renforcée par nos résultats préliminaires, reste à être néanmoins validée.

Dans un premier temps, il sera nécessaire de confirmer au niveau protéique les différences d'expression mises en évidence au niveau transcriptomique à 48 heures post IDM. Plus précisément, concernant les MMPs, une mesure de leur activité enzymatique par zymographie sera primordiale afin d'évaluer les potentialités de remodelage de la matrice extracellulaire dans chacune de nos conditions expérimentales.

Puis, il nous faudra mettre en place une étude cinétique post infarctus du myocarde. Cette dernière permettra vraisemblablement d'identifier les causes de la survenue des troubles du rythme observée au cours des 24 premières heures. De la même manière, pour des temps plus tardifs dans les remodelages aigu et chronique suite à l'infarctus, nous pourrons rechercher des différences d'incidence dans les survenues de troubles du rythme et de rupture cardiaque au cours de la phase aiguë de l'IDM, vu la très haute incidence de rupture cardiaque liée au fond génétique Sv129 sur lequel est stabilisé notre modèle. Tout reste à faire avec le nouveau modèle Scn5a<sup>+/-</sup> stabilisé sur le fond C57Bl/6.

## **VI- Projet n°2 : Caractérisation de la structure et de la fonction cardiaque d'un nouveau modèle murin exprimant la mutation humaine T220I responsable d'une perte de fonction modérée pour Nav1.5.**

**Equipe 1« Cardiopathies et mort subite» dirigée par le Dr Flavien Charpentier**

### **Contexte**

En parallèle de la poursuite de nos études sur notre modèle murin *Scn5a<sup>+/-</sup>*, mon équipe a entrepris une autre approche afin d'étudier les canalopathies associées à des mutations avec perte de fonction pour le gène *SCN5A*. Celle-ci consiste à étudier les répercussions d'une perte de fonction modérée pour Nav1.5 suite à la génération d'un nouveau modèle murin exprimant une mutation humaine.

Dans le cadre du consortium européen EugTrigTreat, il a pu être généré un nouveau modèle murin pouvant exprimer constitutivement, à l'état hétérozygote ou homozygote, la mutation T220I. Identifiée en 2003 (Benson et al., 2003), cette mutation a subi une caractérisation primaire sur des modèles cellulaires de surexpression hétérologue. Ces études ont montré une perte de fonction modérée pour le courant sodique lors de l'expression de la dite mutation (Gui et al., 2010).

### **Objectifs et contributions aux travaux**

Les objectifs de cette étude ont été de débiter la caractérisation de ce modèle murin nouvellement arrivé dans le laboratoire afin d'évaluer : 1) les effets de la mutation T220I sur l'activité du canal dans des conditions natives et intégrées, et 2) le impact de cette mutation sur la structure et la fonction du cœur.

Dans le cadre de la caractérisation de ce nouveau modèle murin, j'ai participé à : 1) l'évaluation de la structure et de la fonction cardiaque par échocardiographie, 2) l'évaluation de l'activité électrique cardiaque par l'analyse des ECG enregistrés chez les animaux non vigiles, et 3) l'identification et la quantification de la survenue de troubles du rythme par l'enregistrement et l'analyse de l'ECG en télémétrie.

Seuls les résultats dans une période d'âge allant de 12 à 15 semaines seront présentés dans ce manuscrit. Cette tranche d'âge dispose des données les plus abouties à ce jour. De plus, comme nous réalisons le protocole d'IDM à cette période, je me suis tout particulièrement focalisé sur cette tranche d'âge afin d'être en mesure de comparer nos résultats avec ceux obtenus sur le modèle *Scn5a<sup>+/-</sup>*.

## Caractérisation de la structure et de la fonction cardiaque d'un nouveau modèle murin exprimant la mutation humaine T220I responsable d'une perte de fonction modérée pour Nav1.5.

Benoît Jagu<sup>1</sup>, Gilles Toumaniantz<sup>1</sup>, Mickael Derangeon<sup>1</sup>, Cynthia Ore Cerpa<sup>1</sup>, Agnès Hivonnait<sup>1</sup>, Aurore Girardeau<sup>1</sup>, Nadjet Belbachir<sup>1</sup>, Stéphanie Lemarchand<sup>1</sup>, Agnès Carcouet<sup>1</sup>, Isabelle Barô<sup>1</sup>, Flavien Charpentier<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, L'institut du thorax, Nantes, équipe Cardiopathies et mort subite.

**Résumé :** Dans le cadre du consortium européen EugTrigTreat, un nouveau modèle murin exprimant la mutation T220I a été généré afin d'étudier les effets de cette mutation sur l'activité du canal Nav1.5 et ses impacts sur la physiologie cardiaque. **Objectif.** Le premier objectif de cette étude est de caractériser ce nouveau modèle exprimant la mutation T220I. En parallèle, l'impact du fond génétique sur l'expression du phénotype de cette mutation va être pris en considération avec la dérivation de ce nouveau modèle murin sur deux fonds génétiques : C57Bl/6 et Sv129. **Résultats.** A l'âge de 12-15 semaines, les premiers résultats montrent que la mutation T220I conduit à une baisse modérée du courant sodique associée à des modifications mineures de l'ECG sans trouble du rythme apparent et une dysfonction diastolique. Une élévation de l'expression de Nav1.5 a même été observée chez les animaux hétérozygotes pour la mutation T220I (T220I<sup>+/-</sup>) sur les deux fonds étudiés. Seule une élévation de l'expression pour le TGF-β a été mise en évidence chez les animaux T220I<sup>+/-</sup> du fond C57Bl/6. **Conclusions et perspectives.** A l'âge de 12-15 semaines, la mutation T220I conduit à un phénotype cardiaque modéré. A la suite de ces premiers résultats, la caractérisation du modèle se doit d'être complétée à l'âge étudié et ainsi qu'au cours du vieillissement afin d'observer l'évolution des altérations identifiées à 12-15 semaines.

**Mots-clés :** Scn5a, Nav1.5, mutation T220I, ECG, arythmies, échocardiographie, dysfonction diastolique.

### Introduction

La mutation T220I de Nav1.5 a été décrite pour la première fois par Benson et ses collaborateurs en 2003. Elle correspond à la substitution d'une cytosine par une thymine en position 659 de la séquence codante de l'ADN au niveau de l'exon 6 de SCN5A. Cette substitution provoque le remplacement d'une thréonine par une isoleucine en position 220 (T220I) de la séquence protéique au niveau du segment S4 du domaine I de Nav1.5. Historiquement, la mutation a été identifiée chez deux membres d'une famille de petite taille. Cependant, la dysfonction sinusale observée chez le propositus serait plutôt liée à l'expression de la mutation R1623X de Nav1.5 transmise par la mère. Son grand père paternel, lui aussi porteur de la mutation T220I, est en effet asymptomatique. Le père

du propositus n'a malheureusement pas pu être évalué étant décédé. Les études électrophysiologiques réalisées à partir d'un modèle cellulaire de réexpression de type HEK 293 (Human Embryonic Kidney) exprimant la séquence pour SCN5A obtenue par mutagenèse dirigée pour la mutation T220I, ont montré une altération mineure des propriétés d'inactivation pour le canal Nav1.5 (Benson et al., 2003).

La mutation T220I a de nouveau été identifiée dans une autre famille en 2005. Le propositus de cette dernière, décédé d'une insuffisance cardiaque congestive sévère, a été diagnostiqué 13 ans plus tôt, à l'âge de 54 ans, pour une cardiomyopathie dilatée (CMD) associée à une hypertrophie, à une fibrose marquée ainsi qu'à une fibrillation atriale et des blocs atrio-ventriculaires sans origine coronarienne apparente. De plus, aucune tachycardie ventriculaire n'avait été observée lors d'un suivi par Holter au cours de ses 6 jours d'hospitalisation. Sa « petite cousine » a elle aussi été diagnostiquée à l'âge de 55 ans pour une CMD associée à un bloc de broche incomplet avant de décéder 2 ans plus tard d'une insuffisance cardiaque congestive sévère. Les autres porteurs de la mutation dans la famille présentent des fonctions cardiaques proches de la normale. Seul un cas de cardiomégalie a été enregistré chez ces mêmes porteurs (Olson et al., 2005).

Plus récemment, deux publications, portant sur la caractérisation électrophysiologique et l'évaluation des effets potentiels du polymorphisme H558R sur des mutations du gène SCN5A associées à une dysfonction du nœud sinusal, ont montré, à partir d'études réalisées sur des HEK293 et des oocytes de xénope, que la mutation T220I de Nav1.5 pouvait conduire à une diminution de la densité du courant sodique, une hyperpolarisation de l'inactivation et un ralentissement de la sortie de l'inactivation. Cette perte de fonction modérée pour la mutation T220I n'est pas associée à une modification d'expression totale ou membranaire. De plus, le polymorphisme H558R ne module pas les effets de la mutation T220I dans ces conditions expérimentales de réexpression cellulaire (Gui et al., 2010a et 2010b).

Au cours du séquençage des exomes de 192 patients présentant une fibrillation atriale, Olesen et ses collaborateurs ont montré que la mutation T220I a pu être identifiée chez un patient avec un ECG normal à l'inclusion et un phénotype paroxystique (Olesen et al., 2012).

Enfin, en 2013, dans une étude portée sur l'identification de mutations associées au syndrome du QT long dans des cas de morts intra-utérines non élucidées, la mutation T220I a été identifiée chez un des 91 fœtus inclus (Crotti et al., 2013).

Dans le cadre du consortium « EugTrigTreat », un nouveau modèle murin a donc été développé afin d'exprimer la mutation T220I à l'état hétérozygote ou homozygote de façon constitutive. Contrairement aux modèles cellulaires de ré-expression jusqu'à présent utilisés pour la caractérisation de la mutation, cette approche va permettre d'étudier les effets et les conséquences de cette dernière dans un modèle plus intégré et plus relevant en comparaison de la situation humaine.

Nos premiers travaux ont débuté *via* la caractérisation de ce nouveau modèle afin d'identifier et comprendre les effets éventuels de la mutation T220I, et ses conséquences potentielles sur la physiologie cardiaque.

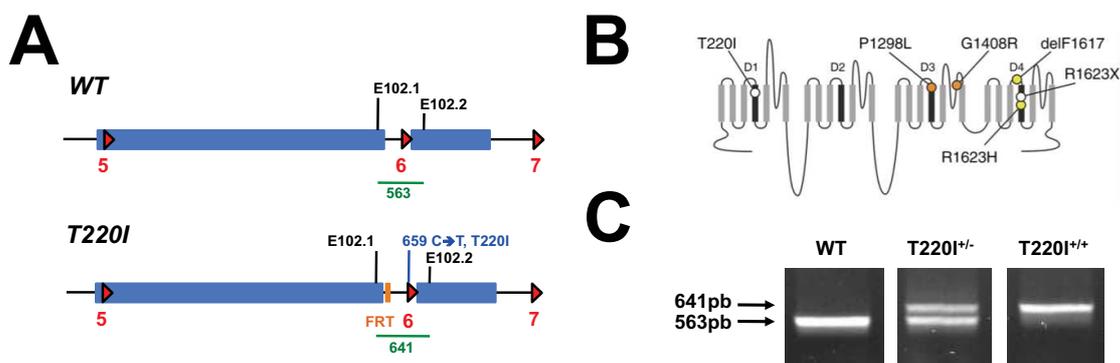
## Matériels et méthodes

### Animaux

Les animaux sauvages (WT), hétérozygotes ( $T220I^{+/-}$ ) ou homozygotes ( $T220I^{+/+}$ ) pour la mutation T220I, étudiés au cours de cette caractérisation, sont âgées de 12 à 15 semaines. Ils ont été dérivés sur une ou deux générations sur le fond génétique C57Bl/6 (C57) ou Sv129 (Sv). Tous les animaux, utilisés pour les expériences de cette étude, ont été hébergés dans une animalerie à température contrôlée (22°C) avec des cycles jour/nuit de 12 heures, où l'eau et l'alimentation sont fournies *ad libitum*. A ce jour, les dérivations se poursuivent afin de générer des fonds stables.

### PCR de génotypage

A partir de biopsies de queue, l'ADN génomique de chaque animal a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction et de purification de l'ADN génomique (Macherey-Nagel). Suite au dosage de l'ADN et l'établissement d'une concentration à 100ng/μl, une PCR a été réalisée avec les amorces sens 102.1 (5'-TGTTCCGTCCTAGAGTAGTTG-3') et anti-sens 102.2 (5'-TGCGTAAGGCTGAGACATTG-3'). La réaction peut donner un amplicon de 563 paires de base dans le cas d'un allèle sauvage, soit un amplicon de 641 paires de base dans le cas d'un allèle exprimant la mutation T220I. Les deux amplicons sont très clairement identifiables par un dépôt et une migration dans un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'Ethydium afin de déterminer le génotype de chaque animal (Figure 41).



**Figure 41: Allèles et génotypage des animaux.** A, Représentation schématique des allèles WT (en haut) et T220I (en bas) de SCN5A. E102.1 et E102.2 sont les deux amorces utilisées pour la PCR de génotypage avec en vert la taille de l'amplicon attendu par allèle. B, Représentation schématique de Nav1.5 avec la position de mutations dont la mutation T220I. C, Résultats typiques de PCR de génotypage pour des animaux WT,  $T220I^{+/-}$  et  $T220I^{+/+}$ . ( $T220I^{+/-}$  et  $T220I^{+/+}$ : respectivement hétérozygote et homozygotes pour l'allèle exprimant la mutation T220I. FRT: site de recombinaison par la flipase).

**Isolement de cardiomyocytes adultes en vue de la technique du Patch-clamp**

A partir d'animaux C57Bl/6 WT et T220I<sup>+/+</sup> âgés de 6-7 semaines, les cardiomyocytes ont été isolés à l'aide d'une solution de perfusion (en mM : NaCl, 135 ; KCl, 4 ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 ; MgCl<sub>2</sub>, 1,2 ; HEPES, 10 ; Glucose, 1; pH=7,4 ajusté avec du NaOH) contenant un mélange de Collagénase II (Worthington, 350 U/mg) et Protéase type XIV (Sigma, 4,7 U/mg) préalablement bullée avec un mélange de 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> et maintenue à 37°C. Cette solution a été perfusée à débit constant de manière rétrograde au niveau de l'aorte des cœurs isolés. Suite à la digestion enzymatique, une dissociation mécanique du tissu, une inactivation des enzymes, une filtration des cellules et une remontée calcique progressive ont été effectuées afin d'obtenir des cardiomyocytes isolés et viables pour les expérimentations ultérieures. Les cellules sont maintenues à 37°C dans la solution de perfusion initiale supplémentée en Ca<sup>2+</sup> à 1mM.

La technique du Patch-Clamp a été utilisée dans sa configuration cellule entière afin de mesurer le courant sodique voltage dépendant enregistré à partir des cardiomyocytes isolés le jour même. La densité de courant a été mesurée au pic d'un courant généré par la réalisation d'un protocole de saut de potentiel unique de -120mV à -20mV pendant 50ms, avant d'être normalisée sur la capacitance de la cellule. Des protocoles d'activation et d'inactivation *via* la réalisation de série de sauts de potentiels avec des incréments de 5mV, entre -120 et +40mV, ont été conduits afin d'évaluer les effets potentiels de la mutation T220I sur les paramètres biophysiques d'activation et d'inactivation du canal.

**Echocardiographie**

Pour la procédure d'acquisition et d'analyse de la structure et de la fonction cardiaque par échocardiographie chez les animaux WT, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup>, vous pouvez vous référer à la partie matériel et méthodes du projet 1.

**ECG de surface**

Une anesthésie soit par une injection d'Etomidate avec une injection par la voie intrapéritonéale (IP) (15mg/kg), soit par voie gazeuse à l'isoflurane (Induction, 4% à 1L/min ; Maintien à 1,5%, 0,4L/min) a été menée en fonction des expérimentations. La température corporelle de l'animal est toujours contrôlée et maintenue à 37±0,5°C par l'utilisation d'un tapis chauffant régulé par une sonde anale (Harvard Apparatus). Un ECG de surface à 6 dérivation (DI, DII, DIII, aVF, AVL et aVR) est enregistré à l'aide d'un amplificateur et d'un convertisseur analogique - numérique (IOX 1.585, EMKA Technologies). Pour l'étude de l'évaluation de la réserve de conduction chez les animaux, une injection intrapéritonéale d'Ajmaline à 20mg/kg, un inhibiteur des canaux sodiques voltage dépendant, a été réalisée. Avant l'injection, une période contrôle de 5 minutes est enregistrée, puis l'ECG est à nouveau enregistré 10 minutes suite à l'injection.

Pour chaque étude, la fréquence cardiaque, les durées de l'onde P et des intervalles PR, QRS, QT sont analysées sont ensuite mesurées à l'aide du logiciel ECG auto version 3.2.0.2 (EMKA Technologies). La repolarisation étant fortement dépendante du niveau de fréquence cardiaque, l'intervalle QT est corrigé à l'aide de la formule suivante QT:  $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$ . Pour chaque animal, la valeur de chaque paramètre mesuré est représentative de la moyenne d'au moins 10 mesures expérimentales.

### Western Blot

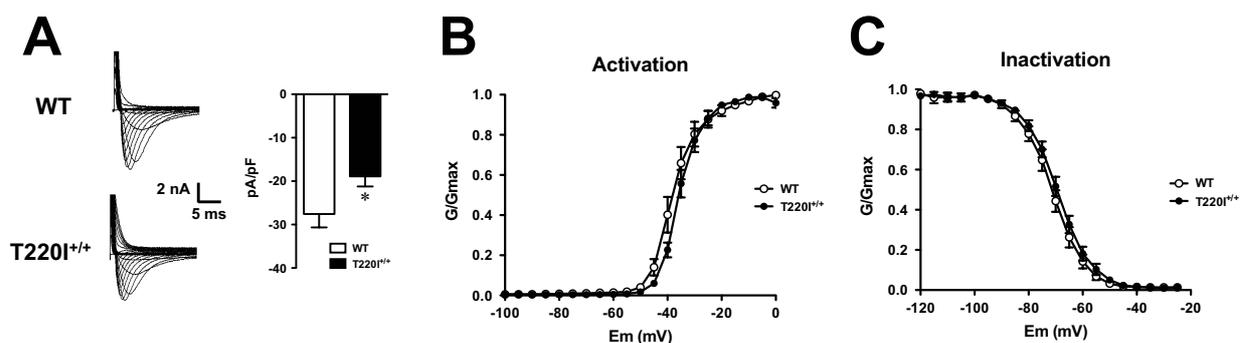
Pour les protocoles expérimentaux concernant l'extraction protéique et la technique du Western Blot sur les cœurs de souris, vous pouvez vous référer à l'article de Mickael Derangeon portant sur la caractérisation des mécanismes moléculaires responsables du développement progressif de la fibrose cardiaque dans le modèle murin *Scn5a*<sup>+/-</sup> (Derangeon et al., page 176 à 205).

### Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM). La normalité et la variance des groupes de données ont été investiguées respectivement par un test de normalité et le test de Fisher. La significativité des différences observées est ensuite calculée le cas échéant avec un test de Student ou de Mann Whitney, en fonction des résultats, sur le logiciel GraphPad version 5.

## Résultats

### Caractérisation électrophysiologique de la mutation T220I à partir de cardiomyocytes isolés de souris adultes



**Figure 42: Caractérisation électrophysiologique de la mutation T220I à partir de cardiomyocytes isolés d'animaux âgés de 6-7 semaines.** A, Traces du courant sodique enregistrées et mesures de courant rapporté à la taille du cardiomyocyte pour une dépolarisation à -20mV chez les animaux WT et T220I<sup>+/+</sup>. B, Courbe d'activation du courant sodique chez les animaux WT et T220I<sup>+/+</sup>. C, Courbe d'inactivation du courant sodique chez les animaux WT et T220I<sup>+/+</sup>. ( $n=7$  cardiomyocytes par condition,  $*p<0,05$  vs WT) ( $G$ : conductance; T220I<sup>+/+</sup>: animaux homozygotes pour l'allèle exprimant la mutation T220I).

Suite à l'isolement des cardiomyocytes de souris adultes âgées de 6 à 7 semaines sur le fond C57Bl/6, les investigations par la technique du Patch-Clamp ont pu mettre en évidence une légère

baisse du courant sodique chez les cardiomyocytes T220I<sup>+/+</sup> (Figure 42A ; WT,  $n=7$ ,  $-27,57\pm 3,09$  pA/pF ; T220I<sup>+/+</sup>,  $n=7$ ,  $-18,90\pm 2,33$  pA/pF ; \* $p<0,05$  vs WT). De plus, sur la base de ces effectifs, les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal Nav1.5 ne semblent pas être modifiées par l'expression de la mutation T220I (Figure 42B et C).

### Caractérisation échocardiographique de la structure et de la fonction cardiaque chez des animaux âgés de 12 à 15 semaines.

Parallèlement à cette approche *in vitro*, une approche échocardiographique a été menée. Aucune modification de fréquence cardiaque n'a été observée entre les animaux WT, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> sur les deux fonds génétiques étudiés. Ceci nous autorise à comparer aisément les groupes au sein du même fond génétique (Table 1).

	C57-WT	C57-T220I <sup>+/-</sup>	C57-T220I <sup>+/+</sup>	Sv-WT	Sv-T220I <sup>+/-</sup>	Sv-T220I <sup>+/+</sup>
n	10	10	10	10	10	10
FC (bpm)	495±15	520±18	485±25	410±15	435±10	430±15
DVGd (mm)	3,85±0,11	3,75±0,15	3,38±0,14*	3,55±0,15	3,80±0,10	3,7±0,15
Septum d (mm)	0,80±0,02	1,02±0,03*	0,94±0,09	1,16±0,07	1,00±0,09	0,9±0,08*
FE (%)	72±3	74±2	73±4	66±3	72±3	63±3
TRIV (ms)	20,5±1,0	34,0±1,0*	36,5±4,0*	33,0±1,2	34,0±1,2	33,8±3,0
E/A (UA)	1,48±0,02	1,22±0,03*	1,24±0,06*	1,75±0,23	1,55±0,22	1,23±0,10*
TDE (ms)	16,00±0,05	19,00±0,05*	19,50±0,05*	20,05±0,06	20,90±0,06	22,00±0,09

**Table 1: Paramètres échocardiographiques du modèle T220I sur le fond C57Bl/6 (à gauche) et Sv129 (à droite) à 12-15 semaines.** (\* $p<0,05$  vs WT respectif)(d: au cours de la diastole; DVGd: Diamètre VG au cours de la diastole; E/A: rapport de l'onde E sur l'onde A; FE: Fraction d'Ejection; FC: Fréquence Cardiaque; TDE: Temps de Décélération de l'onde E; TRIV: Temps de Relaxation IsoVolumétrique).

Le remodelage cardiaque, mesuré à partir d'une incidence parasternale dite en « grand axe » par échocardiographie, semble être dépendant du fond génétique, ainsi que de l'hétérozygotie ou l'homozygotie de la mutation T220I. Une diminution du diamètre de la cavité du ventricule gauche (VG) a été observée chez les animaux C57-T220I<sup>+/+</sup> sans modification de l'épaisseur de paroi du septum, qui est en revanche augmentée chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> (Table 1). Pour le fond Sv129, seule une diminution de l'épaisseur du septum a été décrite chez les animaux Sv-T220I<sup>+/+</sup> (Table 1). Les mêmes variations ont été enregistrées au niveau de la paroi libre du VG. A l'âge de 12-15 semaines, nous n'avons pas observé de différence au niveau de la gravimétrie cardiaque après normalisation du poids des cœurs sur la longueur des tibias (C57-WT,  $n=6$ ,  $8,2\pm 0,9$  mg/mm ; C57-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=6$ ,  $9,7\pm 1,1$  mg/mm ; C57-T220I<sup>+/+</sup>,  $n=6$ ,  $8,8\pm 1,3$  mg/mm ; Sv-WT,  $n=6$ ,  $7,7\pm 0,3$  mg/mm ; Sv-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=6$ ,  $7,8\pm 0,3$  mg/mm ; Sv-T220I<sup>+/+</sup>,  $n=6$ ,  $8,2\pm 0,6$  mg/mm).

La fonction systolique, évaluée par la fraction d'éjection, n'est pas altérée chez les animaux T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> et cela quelque soit le fond génétique étudié. En revanche, nous avons clairement identifié une dysfonction diastolique chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> et C57-T220I<sup>+/+</sup> qui se traduit par une augmentation du temps de relaxation isovolumétrique et une décélération de l'onde E ainsi qu'une

diminution du rapport de l'onde E sur l'onde A. Seule une diminution du rapport E sur A n'a pas été observée chez les animaux Sv-T220I<sup>+/+</sup> (Table 1).

### Caractérisation de l'activité électrocardiographique chez des animaux non vigiles et âgés de 12 à 15 semaines.

	C57-WT	C57-T220I <sup>+/-</sup>	C57-T220I <sup>+/+</sup>	Sv-WT	Sv-T220I <sup>+/-</sup>	Sv-T220I <sup>+/+</sup>
n	19	57	20	16	33	8
RR	132,7±17,8	126,0±2,7	119,6±3,5	125,4±2,6	131,8±3,5	159±13,5
Pdur (ms)	11,2±0,3	12,1±0,5	11,1±0,4	11,9±0,5	12,8±0,5	14,3±0,7
PR (ms)	33,5±0,9	34,4±0,6	34,4±0,6	33,6±0,5	33,2±0,5	36,0±1,5
QRS (ms)	12,0±0,2	11,9±0,2	11,9±0,3	12,6±0,3	12,4±0,3	13,3±0,3
QT (ms)	51,4±1,3	54,0±0,8	53,3±2,2	57,4±1,3	56,4±1,1	56,7±7,4
QTc (ms)	46,6±1,5	48,4±0,8	48,7±1,6	51,4±1,2	49,4±0,9	44,7±4,1

Table 2: Paramètres ECG non vigiles du modèle T220I sur le fond C57Bl/6 (à gauche) et Sv129 (à droite) à 12-15 semaines. (Pdur: durée de l'onde P; QTc= QT/(RR/100)1/2).

Afin d'évaluer les effets de la mutation T220I sur l'activité électrique de notre modèle murin, nous avons enregistré et mesuré les paramètres de l'ECG chez nos animaux. A l'âge de 12-15 semaines, aucune modification notable de la durée de l'onde P, des intervalles PR, QRS, QT et QTc n'a été observée chez les animaux T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> et ce quelque soit le fond génétique. Seule une tendance pour les animaux Sv-T220I<sup>+/+</sup> liée vraisemblablement à la faiblesse de l'effectif a été observée (Table 2).

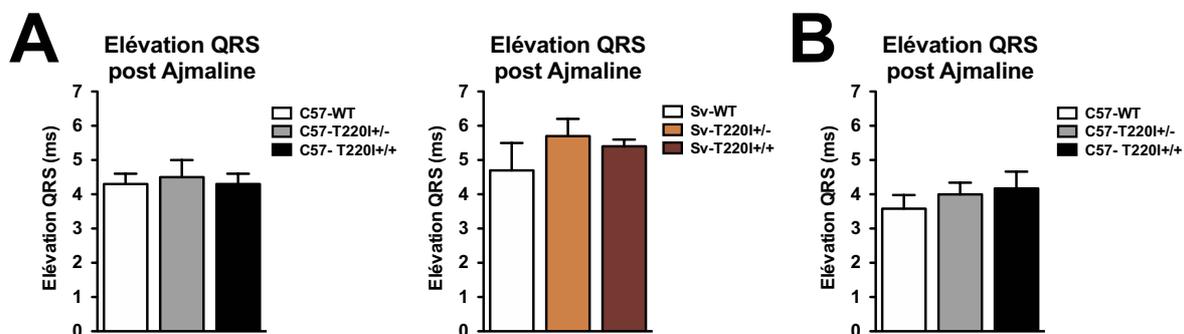


Figure 43: Etude de la réserve de conduction des animaux à 12-15 semaines. A, Elévation de l'intervalle QRS 10 minutes après l'injection d'Ajmaline à 20mg/kg chez des animaux sauvages, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> dérivés sur une à deux générations sur un fond génétique C57Bl/6 (à gauche) et Sv129 (à droite), et anesthésiés sous isoflurane. (n=10 par génotype). B, Elévation de l'intervalle QRS 10 minutes après l'injection d'Ajmaline à 20mg/kg chez des animaux sauvages, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> dérivés sur une à deux générations sur un fond génétique C57Bl/6 et anesthésié sous éthomidate. (n=6 par génotype).

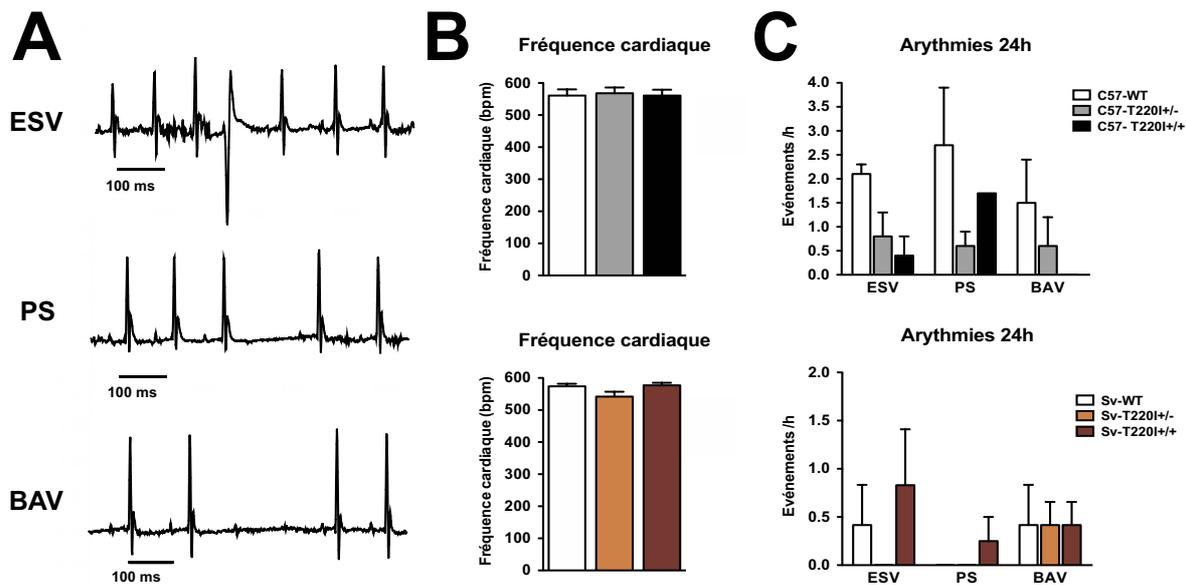
Face à ces premiers résultats, il nous est apparu relevant de pousser un peu plus loin l'étude de l'impact de la mutation T220I au niveau de l'activité électrique globale du cœur. Pour cela, nous avons testé l'état de la réserve de conduction dans notre modèle murin en inhibant les canaux sodiques

voltage dépendant, par l'administration d'Ajmaline, une méthode notamment utilisée en clinique pour étudier la réserve de conduction chez les patients.

La première étude réalisée, sous anesthésie à l'isoflurane, n'a pas montré de différence de réponse à l'Ajmaline au niveau de la réserve de conduction. En effet, l'élévation de la durée du QRS, entre l'enregistrement de base et 10 minutes après l'injection d'Ajmaline, est similaire entre les groupes d'animaux sur le fond C57Bl/6 (Figure 43A à gauche ; C57-WT,  $n=10$ ,  $4,3\pm 0,3$  ms ; C57-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=10$ ,  $4,5\pm 0,5$  ms ; C57-T220I<sup>+/+</sup>,  $n=10$ ,  $4,3\pm 0,3$  ms) ou Sv129 (Figure 3A à droite ; Sv-WT,  $n=10$ ,  $4,7\pm 0,8$  ms ; C57-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=10$ ,  $5,7\pm 0,5$  ms ; C57-T220I<sup>+/+</sup>,  $n=10$ ,  $5,4\pm 0,2$  ms).

Une seconde étude a été menée sur les animaux du fond C57Bl/6 pour rendre compte de l'effet de l'anesthésie sur les résultats en réalisant, cette fois-ci les investigations sous Etomidate, anesthésique auparavant utilisé lors de nos mesures des paramètres ECG dans les conditions de base. Comme les résultats précédemment obtenus sous isoflurane, il n'a pas été observé de modification significative de réponse à l'Ajmaline entre les différents génotypes (Figure 43B ; C57-WT,  $n=6$ ,  $3,58\pm 0,40$  ms ; C57-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=6$ ,  $4,00\pm 0,34$  ms ; C57-T220I<sup>+/+</sup>,  $n=6$ ,  $4,17\pm 0,49$  ms).

#### Caractérisation par télémétrie des incidences de la survenue de troubles du rythme chez des animaux âgés de 12 à 15 semaines.



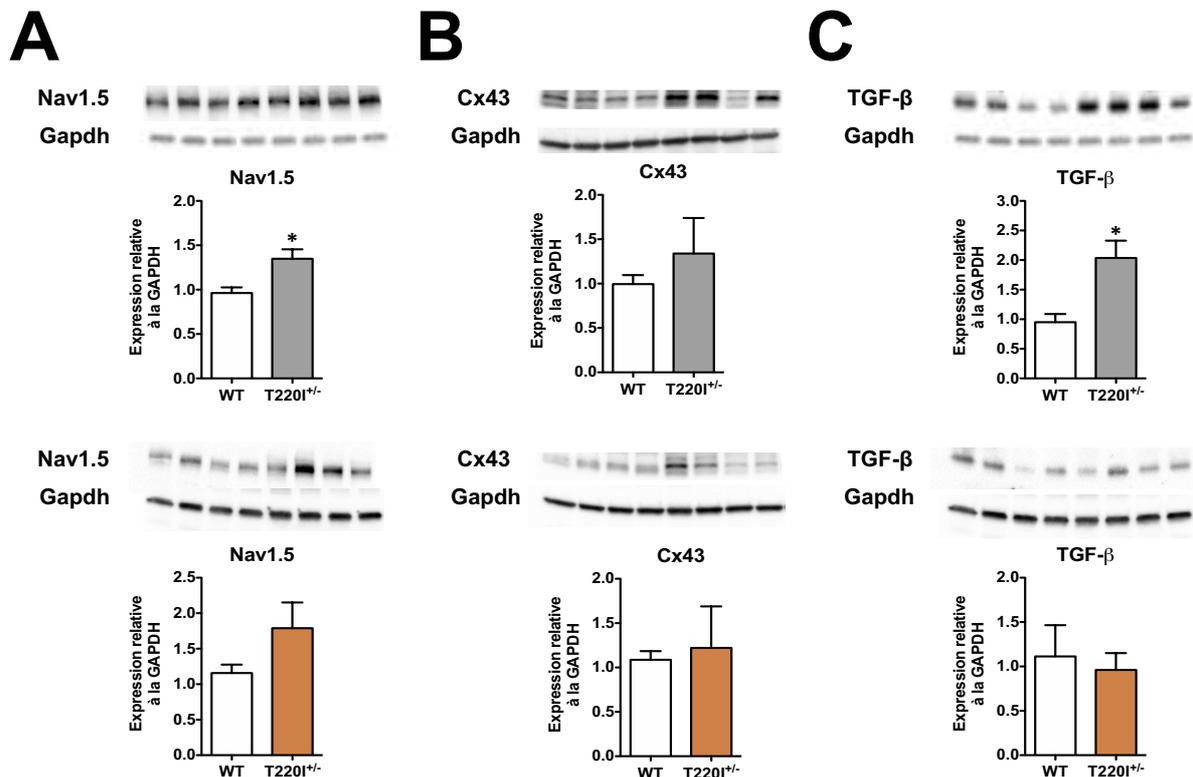
**Figure 44: Télémétrie ECG à 12-15 semaines.** A, Tracés ECG représentatifs d'extrasystoles ventriculaires, de pauses sinusales et de blocs auriculo ventriculaires (BAV) observés. B et C, Fréquence cardiaque et quantification du nombre d'événements d'ESV, de PS et de BAVs au cours de 24h d'enregistrement de l'ECG chez des animaux sauvages, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> âgés de 12-15 semaines, respectivement sur un fond génétique C57Bl/6 et Sv129 dérivés sur un niveau de première et seconde génération. ( $n=4$  par génotype)(BAV: Bloc Auriculo-Ventriculaire; ESV: Extrasystole Ventriculaire; PS: Pause Sinusale).

Comme pour l'échocardiographie ou l'ECG non vigile, la fréquence cardiaque, évaluée à partir de l'enregistrement ECG par télémétrie, n'est pas différente quelque soit le fond ou le génotype

(Figure 44B ; C57-WT,  $n=4$ ,  $561\pm 19$  bpm ; C57- T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $568\pm 18$  bpm ; C57- T220I<sup>+/+</sup>,  $n=4$ ,  $561\pm 18$  bpm ; Sv-WT,  $n=4$ ,  $574\pm 8$  bpm ; Sv-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $542\pm 15$  bpm ; Sv-T220I<sup>+/+</sup>,  $n=4$ ,  $577\pm 8$  bpm). Au cours de l'enregistrement de l'ECG par télémétrie sous 24 heures en continu, aucune différence dans la survenue de troubles du rythme ventriculaire, de pause sinusale et de bloc auriculo-ventriculaire (Figure 44A) n'a été observée entre les animaux WT, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> à l'âge de 12-15 semaines sur les deux fonds génétiques étudiés (Figure 44C).

### Etude des expressions protéiques de Nav1.5, de la connexine 43 et du TGF- $\beta$ chez des animaux âgés de 12 à 15 semaines.

L'étude des expressions protéiques par western blot a montré une augmentation significative de l'expression de Nav1.5 chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> (Figure 45A ; C57-WT,  $n=4$ ,  $0,96\pm 0,06$  ; C57- T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $1,35\pm 0,10$  ;  $*p<0,05$  vs WT), et chez les Sv-T220I<sup>+/-</sup>, une tendance à être augmentée comme leur homologue sur le fond C57Bl/6 (Figure 45A ; Sv-WT,  $n=4$ ,  $1,16\pm 0,12$  ; Sv-T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $1,79\pm 0,36$  ;  $p=0,20$ ).



**Figure 45: Etudes protéiques à 12-15 semaines.** A,B et C, Expressions protéiques de Nav1.5, de la connexine 43 et du TGF- $\beta$  rapportées sur l'expression de la GAPDH chez des animaux sauvages, T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> âgés de 12-15 semaines sur un fond génétique C57Bl/6 (en haut) et Sv129 (en bas) dérivés sur un niveau de première et seconde génération. ( $*p<0,05$  vs WT respectif,  $n=4$  par génotype, résultats représentatif de 3 expériences) (Cx43: Connexine 43; TGF: Transforming Growth Factor).

En ce qui concerne la connexine 43, aucune modification notable n'a été observée entre les animaux WT et T220I<sup>+/-</sup> sur les deux fonds génétiques étudiés (Figure 45B ; C57-WT,  $n=4$ ,

$0,99\pm 0,10$  ; C57- T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $1,34\pm 0,40$  ; Sv-WT,  $n=4$ ,  $1,08\pm 0,10$  ; Sv- T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $1,79\pm 0,36$ ). En revanche, une augmentation significative d'un facteur 2 du TGF- $\beta$  a été mesurée chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> (Figure 45C ; C57-WT,  $n=4$ ,  $0,95\pm 0,14$  ; C57- T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $2,04\pm 0,29$  ; \* $p<0,05$  vs WT) par rapport à leurs WT respectifs, qui n'a pas été retrouvé sur le fond Sv129 (Figure 45C ; Sv-WT,  $n=4$ ,  $1,11\pm 0,35$  ; Sv- T220I<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $0,96\pm 0,19$ ).

## Discussion

Pour la première fois dans un modèle intégré, nos données préliminaires semblent indiquer l'existence d'une perte modérée de la densité du courant sodique au niveau de cardiomyocytes isolés de souris homozygotes pour la mutation T220I, sans modification des propriétés d'activation et d'inactivation du canal. Ces dernières observations ne corroborent pas avec les résultats observés au niveau des systèmes de ré-expression utilisés pour caractériser les effets de cette mutation sur le courant sodique. Il était décrit une baisse de la densité du courant associée à une hyperpolarisation et un ralentissement de la sortie de l'inactivation (Gui et al., 2010a ; Gui et al., 2010b). Nos études électrophysiologiques doivent être poursuivies afin de confirmer et compléter la caractérisation de la mutation T220I sur le courant sodique à partir de cardiomyocytes isolés.

Concernant la structure du cœur, les remodelages observés sont très hétérogènes: 1) les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> présentent seulement une augmentation de l'épaisseur du septum, 2) les animaux C57-T220I<sup>+/+</sup> présentent eux une baisse du diamètre de leur cavité ventriculaire gauche sans modification apparente de leurs épaisseurs de paroi, et 3) les animaux Sv-T220I<sup>+/+</sup> présentent un amincissement de la paroi du septum sans pour autant observer de dilatation. De plus, la gravimétrie cardiaque n'est aucunement modifiée. Ainsi, les situations de remodelage décrites ici pour les animaux ne sont pas en adéquation avec les 3 types de remodelages pathologiques consensus : le remodelage concentrique, les hypertrophies excentrique ou concentrique. Olson et ses collaborateurs ont décrit qu'en dehors des deux personnes décédées présentant un phénotype sévère associée à une cardiomyopathie dilatée et une insuffisance cardiaque, les autres membres porteurs de la mutation ont soit une cardiomégalie isolée, soit une fonction cardiaque proche de la normale (Olson et al., 2005). Ces observations montrent que la mutation T220I peut être associée à des phénotypes extrêmes allant d'un simple dilatation sans atteinte fonctionnelle, à un remodelage cardiaque plus sévère associé à une hypertrophie, une dilatation et une fibrose cardiaque.

En étudiant la fonction cardiaque évaluée par échocardiographie, nous avons pu observer aucune dysfonction systolique en présence de la mutation T220I sur les fonds génétiques C57Bl/6 et Sv129. En revanche, nous avons identifié très distinctement une dysfonction diastolique chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> et C57-T220I<sup>+/+</sup>, et seulement une atteinte du rapport des ondes E sur A chez les animaux Sv-T220I<sup>+/+</sup>. A ce jour, aucune dysfonction diastolique n'a été décrite chez les patients porteurs de la mutation T220I. Cette dysfonction est souvent le résultat d'une modification de la

compliance du cœur avec le développement d'une fibrose, ou fait suite à une altération de l'homéostasie calcique. Récemment, il a été décrit des dysfonctions diastoliques gauche et droite chez des patients porteurs de la mutation 1795insD pour le gène SCN5A, responsable d'un syndrome de chevauchement, présentant un syndrome du QT long de type 3 (Hummel et al., 2013) qui est souvent associé à des altérations de l'homéostasie calcique. En revanche, au cours de notre caractérisation du modèle Scn5a<sup>+/-</sup>, aucune dysfonction diastolique n'a jamais été identifiée chez ces animaux, même à l'âge où la fibrose est observée (Derangeon et al., 2014). Ainsi, il semble que les implications d'altération pour Nav1.5 dans le développement d'une dysfonction diastolique restent à être définies et ne doivent pas résulter de la présence d'une seule fibrose.

Au niveau de l'activité électrique, aucune modification des paramètres de l'ECG, en condition de base ou sous Ajmaline, ainsi qu'aucune différence d'incidence des troubles du rythme n'a pu être observée dans notre modèle exprimant la mutation T220I sur les deux fonds génétiques étudiés. Comme pour le remodelage structural, il peut être fait le constat que seuls les deux individus décédés, dans l'étude de Olson et ses collaborateurs en 2005, présentent des troubles comme une fibrillation atriale, des blocs de branches ou auriculo ventriculaires, ainsi que des altérations sinusales. En dehors de ces deux individus, une seule personne porteuse de la mutation T220I a été associée avec le développement d'une fibrillation atriale (Olesen et al., 2012). Cependant, des données préliminaires de stimulation endocavitaire, que j'ai pu effectuer, montrent une augmentation de la période réfractaire effective ventriculaire chez les animaux T220I<sup>+/-</sup>. Celle-ci pourrait générer un bloc fonctionnel de la conduction avec des conséquences protectrices ou délétères lors de l'induction de troubles du rythme en présence de la mutation T220I.

Au niveau protéique, une augmentation significative de l'expression de Nav1.5 chez les souris C57-T220I<sup>+/-</sup> et une tendance à l'élévation chez les souris C57-T220I<sup>+/-</sup> ont été observées. Ces augmentations de l'expression protéique Nav1.5 pourraient être une cause suffisante pour expliquer l'absence d'effet majeur de cette mutation. Par la suite, il serait intéressant : 1) d'évaluer l'expression membranaire de Nav1.5 entre les différents génotypes, et 2) d'identifier le type de régulation responsable de ces élévations d'expression pour Nav1.5.

L'expression de la connexine 43 n'est pas modifiée suggérant une absence de défaut de conduction chez les animaux hétérozygotes à l'âge de 12-15 semaines.

En revanche, une augmentation significative de l'expression du TGF-β a été identifiée chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup> et non sur le fond Sv129. Cette observation ouvre une piste sur le développement potentiel d'un remodelage cardiaque majoré chez les animaux C57-T220I<sup>+/-</sup>. Il sera nécessaire, à l'avenir, d'investiguer à des âges plus avancés la présence éventuelle d'un remodelage du myocarde chez ces animaux.

A partir de ces résultats et observations réalisés sur notre modèle murin exprimant la mutation T220I, plusieurs éléments peuvent être discutés:

1) Les différences de sévérité et de réponse en fonction du fond génétique, que nous observons dans ce modèle, sont déjà des événements rapportés, et notamment dans un autre modèle murin de mutation pour le gène SCN5A sur deux autres fonds génétiques (FVB/N et 129P2) (Remme et al., 2009). De plus de nombreux papiers décrivent des différences entre les fonds génétiques notamment au niveau de l'homéostasie calcique (Roman et al., 2013), de la croissance du cœur (Kiper et al., 2013) et des réponses à l'induction d'une hypertrophie (Roman et al., 2013).

2) L'augmentation de l'expression pour Nav1.5 observée chez les animaux T220I<sup>+/-</sup> devra être étudiée chez les animaux T220I<sup>+/+</sup> et pourrait s'avérer être une limite à l'identification d'un phénotype dans notre modèle, la faiblesse des effectifs ne permettant pas cette prise en compte de ces animaux à la rédaction de ce manuscrit.

3) Nos investigations ont porté sur des animaux jeunes de 12 à 15 semaines, tandis que les phénotypes sévères rapportés sont décrits chez des patients âgés de plus de 50 ans. Il serait ainsi intéressant de rechercher si une proportion d'animaux peuvent potentiellement présenter à terme un ou des phénotype(s) plus marqué(s) avec le vieillissement.

4) Les différences de phénotypes observées chez l'homme pourraient être le résultat d'une variation de facteurs génétiques ou de conditions environnementales. Dans nos conditions expérimentales, à part une variabilité génétique liée à la dérivation de notre modèle murin vers des fonds purs, les animaux sont volontairement soumis aux mêmes conditions de vie et ne semblent pas présenter de différence notable de remodelage. Il pourrait alors y avoir un intérêt à modifier les conditions de vie de nos animaux en les plaçant dans des conditions dites sous contraintes, comme celles observées lors d'une hypertension ou un diabète, connues pour modifier la physiologie cardiaque.

Donc, à terme, la caractérisation du modèle murin exprimant la mutation T220I devra être poursuivie au cours du vieillissement, et le cas échéant, dans des conditions pathologiques. A l'opposé du modèle Scn5a<sup>+/-</sup>, ce nouveau modèle pourrait montrer que seule une perte de fonction même modérée, et non une perte d'expression, de la protéine Nav1.5 pourrait engendrer des conséquences sur la physiologie cardiaque des patients porteurs de la mutation, dans des conditions basales ou en présence de facteurs de risque cardiovasculaires.

## **VII- Projet n°3 : Expression et fonction du canal Nav1.5 dans le poumon chez la souris.**

**Projet de collaboration avec l'équipe 2 « Signalisation et hypertension artérielle » dirigée par le Dr Gervaise Loirand et l'équipe 4 « Pathologies bronchiques et allergies » dirigée par le Pr Antoine Magnan de l'institut du thorax.**

### **Contexte**

Dans le cadre de l'insuffisance cardiaque, le poumon est un organe remodelé au cours de la phase décompensée de cette pathologie. C'est pourquoi, en lien direct avec mon second objectif de sujet de doctorat portant sur l'impact d'une perte de fonction pour Nav1.5 au cours du remodelage post ischémique, il m'a paru intéressant et primordial d'identifier l'expression potentielle du canal Nav1.5 dans le poumon chez la souris. Si elle est avérée avec une implication fonctionnelle, l'expression de Nav1.5 pourrait avoir des conséquences annexes dans le décours de l'insuffisance cardiaque, notamment chez les patients porteurs de mutations pour le gène SCN5A.

Des données préliminaires obtenues au niveau transcriptionnel ont conduit à réaliser une étude à part entière sur la base de ce tissu. Cette étude a fait l'objet de la mise en place de collaborations avec deux équipes de mon unité afin de parfaire la caractérisation et évaluer l'implication du canal Nav1.5 dans la physiologie respiratoire.

### **Objectifs et contributions des collaborations au projet**

Les objectifs de ce projet ont été de montrer, en plaçant dans des conditions d'âge en adéquation avec le développement de pathologies respiratoires associées à des maladies cardiovasculaires, 1) l'expression effective et 2) les implications de Nav1.5 dans la fonction pulmonaire chez la souris.

Au cours de ce projet, j'ai pu réaliser l'ensemble des travaux sur les expressions transcriptionnelle et protéique dans le poumon chez des souris sauvages dans des conditions basales et physiopathologiques.

Toutes les investigations de réactivité bronchique *ex vivo* chez les animaux transgéniques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe « Signalisation et hypertension artérielle ».

Toutes les investigations d'évaluation de la fonction respiratoire *in vivo* chez les animaux transgéniques ont été réalisées en partenariat avec l'équipe « Pathologies Bronchiques et allergies ».

## Expression et fonction du canal Nav1.5 dans le poumon chez la souris.

Benoît Jagu<sup>1</sup>, Vincent Sauzeau<sup>2</sup>, David Lair<sup>3</sup>, Andréa Fonteneau<sup>1</sup>, Chrystelle Cario-Toumaniantz<sup>2</sup>, Marie-Aude Cheminant<sup>3</sup>, Stéphanie Lemarchand<sup>1</sup>, Antoine Magnan<sup>3</sup>, Gervaise Loirand<sup>2</sup>, Flavien Charpentier<sup>1</sup>, Gilles Toumaniantz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, L'institut du thorax, Nantes, équipe Cardiopathies et mort subite.

<sup>2</sup> Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, L'institut du thorax, Nantes, équipe Signalisation et hypertension artérielle.

<sup>3</sup> Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, L'institut du thorax, Nantes, équipe Pathologies bronchiques et allergies.

**Résumé :** À ce jour, peu de données sont disponibles sur l'expression et la fonction des canaux sodiques voltages dépendants Nav1.5 dans la sphère pulmonaire notamment chez la souris, espèce largement utilisée pour le développement de modèles transgéniques et expérimentaux dans les domaines cardiovasculaire et pulmonaire. **Objectifs.** Cette étude vise à caractériser l'expression de l'ARNm codant pour la protéine Nav1.5 et évaluer l'impact du canal sodique sur la fonction du poumon. **Résultats.** Les expressions du gène SCN5A et de sa protéine Nav1.5 ont été identifiées dans le poumon chez la souris, et *in vitro* au niveau des cellules musculaires lisses respiratoires. A l'aide de nos modèles transgéniques murins, nous avons pu observer qu'une diminution de l'expression et/ou de l'activité du canal sodique Nav1.5 réduisent la réactivité bronchique *ex vivo* et *in vivo* de manière significative. D'autre part, l'expression de SCN5A semble être modulée dans des conditions physiopathologiques où la structure et la fonction du poumon peuvent être modifiées. **Conclusions et perspectives.** La protéine Nav1.5 est exprimée au niveau du poumon chez la souris. Sa perte d'expression et/ou de fonction semblent engendrer une diminution de la réactivité bronchique. Cependant, il reste encore à poursuivre et comprendre les implications de Nav1.5 dans les remodelages structural et fonctionnel du poumon dans des processus physiopathologiques comme l'insuffisance cardiaque d'origine post-ischémique.

**Mots clés :** SCN5A, Nav1.5, poumon, bronches, cellules musculaires lisses, contraction, pléthysmographie, physiopathologie.

### Introduction

Le poumon est un organe invaginé qui va être responsable de l'échange des gaz vitaux participant au maintien des fonctions de l'organisme. De nombreuses pathologies aiguës ou chroniques propres au poumon sont décrites comme les pneumopathies, la tuberculose ou l'asthme. Dans le cadre de pathologies cardiovasculaires, l'hypertension pulmonaire post capillaire induite par une insuffisance cardiaque gauche est associée à un remodelage alvéolo-capillaire aigu et protecteur du poumon afin de réduire l'œdème pulmonaire induit par l'élévation de pressions dans les veines

pulmonaires. De manière chronique, au niveau du parenchyme pulmonaire, ce remodelage va progressivement devenir inadapté participant à l'entretien de l'hypertension pulmonaire et provoquant un défaut de compliance et une altération de fonction pulmonaire, aussi nommé syndrome pulmonaire restrictif (Azarbar et al., 2014). Un remodelage de la paroi musculaire des vaisseaux a aussi été décrit comme participant à l'hypertension pulmonaire associée à l'insuffisance cardiaque gauche chronique (Delgado et al., 2007). Au fil du temps, une insuffisance cardiaque droite va se développer associée avec la mise en place d'une hypertension pulmonaire dite pré-capillaire résultant de remodelages pulmonaires. Cela va conduire aux symptômes d'une insuffisance cardiaque congestive et chronique comme un œdème au niveau des membres inférieurs avec des impacts majeurs sur la morbi-mortalité (Azarbar et al., 2014).

A ce jour, de nombreux canaux ioniques et transporteurs ont été décrits dans les poumons au niveau des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses (CMLs) des voies aériennes et des vaisseaux sanguins. Notamment, l'implication des canaux ioniques et de l'homéostasie calcique dans la contraction des CMLs des voies aériennes a été très bien développée dans la revue de Hirota et ses collaborateurs (Hirota et al., 2007).

Les canaux sodiques voltage-dépendant sont classiquement associés à des cellules excitables comme les neurones, les cellules du muscle squelettiques et les cardiomyocytes avec des rôles dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action. Cependant, depuis quelques années, l'expression de ces canaux est aussi retrouvée au niveau de cellules non excitables comme les fibroblastes (Chatelier et al. 2012), les cellules endothéliales vasculaires (Gosling et al., 1998 ; Andrikoupoulos et al., 2011), les cellules musculaires lisses de l'intestin et des vaisseaux (Plastoshyn et al., 2005 ; Strege et al., 2007 ; Fort et al., 2009 ; Firth et al., 2011 ; Bradley et al. 2013) ou les cellules cancéreuses (Fraser et al., 2005 ; Onganer et al., 2005 ; House et al., 2010).

Dans le contexte du poumon, le canal sodique voltage dépendant Nav1.5, historiquement majoritaire au niveau du cœur, a été retrouvé comme étant faiblement exprimé dans les CMLS isolées à partir d'artères pulmonaires humaines en culture (Plastoshyn et al., 2005 ; Firth et al., 2011) et des CMLS de bronches fraîchement isolées chez le lapin (Bradley et al. 2013). Cependant, cette expression est non retrouvée lorsqu'elles sont mises en culture chez l'homme (Jo et al., 2004). Plus récemment, Bradley et ses collaborateurs identifient un courant sodique voltage dépendant résistant à la tétrodotoxine (TTX) corroborant l'expression d'isoformes fonctionnels de Nav1.5 dans les CMLS de bronches chez le lapin (Bradley et al. 2013).

A ce jour, aucune donnée n'existe chez la souris qui est pourtant une espèce très largement utilisée dans des études sur l'asthme, le cancer ou des modèles expérimentaux de pathologies pulmonaires ou cardiovasculaires. C'est pourquoi, les objectifs de nos travaux sont de caractériser les expressions du gène SCN5A et de la protéine Nav1.5 dans l'appareil pulmonaire chez la souris dans

des conditions physiologiques, puis d'évaluer les implications potentielles de ce dernier sur la fonction pulmonaire à l'aide de nos modèles murins présentant à une perte d'expression et/ou de fonction pour Nav1.5.

## Matériel et méthodes

### Statut sanitaire et Animaux

Toutes les expérimentations *in vivo* et *ex vivo* de cette étude ont été réalisées à l'UTE (Unité Thérapeutique Expérimentale), structure agréée par le ministère de l'agriculture, et à l'Institut du thorax, Inserm UMR1087 - CNRS UMR6291. Les procédures expérimentales ont été approuvées par la rédaction d'une saisine soumise et validée par le ministère de l'agriculture et de la recherche, puis par le CREEA (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale - Pays de la Loire).

Des souris mâles et femelles de 35-40 semaines de fond génétique Sv129, invalidées à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A (*Scn5a*<sup>+/-</sup>) ou exprimant à la mutation T220I de Nav1.5 à l'état hétérozygote ou homozygote (T220I<sup>+/-</sup> ou T220I<sup>+/+</sup>), ont été utilisées pour les expérimentations *in vivo* et *ex vivo*. Seuls des animaux sauvages ont été utilisés pour les caractérisations transcriptomiques et biochimiques.

### Culture cellulaire

Les cellules musculaires lisses primaires de poumon ont été isolées à partir de la trachée et des bronches primaires de souris sauvages de fond Sv129. Une fois le tissu nettoyé manuellement, la couche de muscle lisse a été dissociée à l'aide de la collagénase II (1mg/mL, Worthington) à 37°C sous agitation pendant une heure. Les cellules ont été ensuite cultivées en présence de milieu DMEM (Gibco ; Invitrogen) supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de pénicilline and 100 µg/mL de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a été changé toutes les 72 heures. Après le 2<sup>ème</sup> passage, les cellules ont été utilisées pour la réalisation des expérimentations d'expression transcriptomique.

### Evaluation de la réactivité des bronches *ex vivo*

Les bronches primaires de souris ont été coupées en plusieurs anneaux de 2mm de large. Ces anneaux ont été montés sur un myographe isométrique (Danish Myo Technology) contenant une solution de Krebs-Henseleit (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> et 11 mM glucose). Une pré-tension de 0,5 mN a été appliquée et maintenue pendant tout le protocole. A partir de doses croissantes, une courbe dose-réponse a été construite en réponse au KCl et à la méthacholine par rapport au niveau de base de chaque animal. L'enregistreur de chaque chambre du myographe est connecté à un transducteur lui-même associé à un convertisseur en données numériques (MacLab/4e, AD Instruments). Les enregistrements ont été analysés en utilisant le logiciel LabChart v7(AD Instruments).

### **Evaluation non invasive de la fonction pulmonaire par la pléthysmographie**

Une mesure de la capacité respiratoire a été effectuée sur des souris vigiles et non contraintes. Les souris ont été placées dans une chambre de pléthysmographie (Emka technologies) et reçues des inhalations par aérosol de doses croissantes de Métacholine (Mch) diluée dans du NaCl 0,9% (0, 5, 10, 20, 30 et 40 mg/ml). Les variations de volume et de pression liées aux mouvements respiratoires ont été mesurées par des capteurs de pression au niveau de la chambre. Après leur amplification, les signaux ont été enregistrés et analysés à l'aide du logiciel Iox 2.4 (Emka Technologies). Les variations des volumes expiratoire et inspiratoire ont permis de calculer un index fonctionnel, la  $P_{enh}$ . Afin de s'affranchir d'une hétérogénéité entre les souris, la  $P_{enh}$  pour chaque dose de Métacholine est rapportée à la  $P_{enh}$  de base de chaque animal:  $P_{enh}/P_{enh}(0)$ .

### **Western Blot**

Pour les protocoles expérimentaux concernant l'extraction protéique et l'étude de l'expression de Nav1.5 par Western blot, à partir des poumons et des cœurs de souris, vous pouvez vous référer à l'article de Mickael Derangeon sur la caractérisation des mécanismes moléculaires responsable du développement progressif de la fibrose cardiaque dans le modèle murin *Scn5a<sup>+/-</sup>* (Derangeon et al. , page 176 à 205).

### **Quantification ARNm**

Pour les protocoles expérimentaux d'extraction et la purification des ARN totaux issus des cultures cellulaires et des tissus, ainsi que des amorces et la méthode la quantification de l'expression de SCN5A par rapport à la HPRT, vous pouvez vous référer à la partie matériel et méthodes du premier projet (page 111 et 112).

### **Analyses statistiques**

Tous les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM). La normalité et la variance des groupes de données ont été investiguées respectivement par un test de normalité et le test de Fisher. La significativité des différences observées est ensuite évaluée le cas échéant avec un test de Student ou de Mann Whitney, en fonction des résultats, sur le logiciel GraphPad version 5.

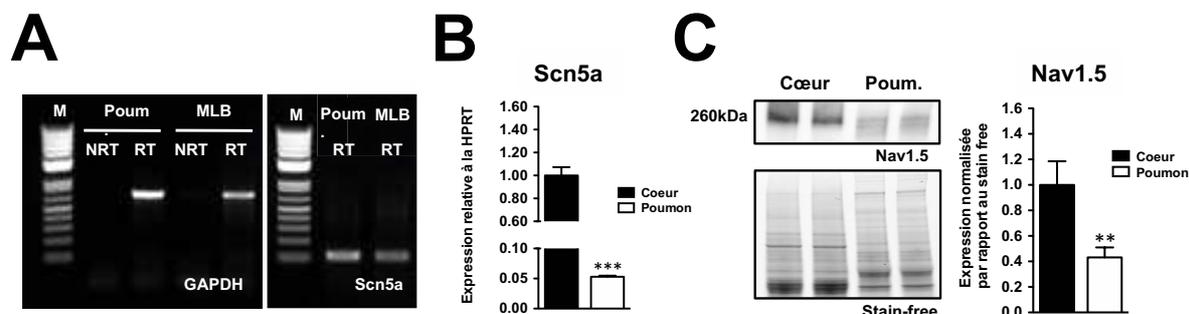
## **Résultats**

### **Caractérisation de l'expression de SCN5A et de Nav1.5 dans le poumon chez la souris**

A partir de banques d'ADN complémentaires générées à partir d'ARN totaux extraits de poumons et de cellules musculaires lisses de bronches d'animaux sauvages âgés de 35-40 semaines, nous avons identifié l'expression du transcrit pour le gène SCN5A respectivement dans ces deux tissus (Figure 46A). Nous avons aussi montrée par PCR quantitative que l'expression de SCN5A, relative à celle de la HPRT (Hypoxanthine guanine Phospho-RibosylTransferase) est 20 fois plus faible dans les

poumons que l'expression cardiaque du gène SCN5A (Figure 46B; Cœur,  $n=5$ ,  $1,000\pm0,072$ ; Poumon,  $n=5$ ,  $0,053\pm0,002$ ;  $***p<0,001$  vs cœur).

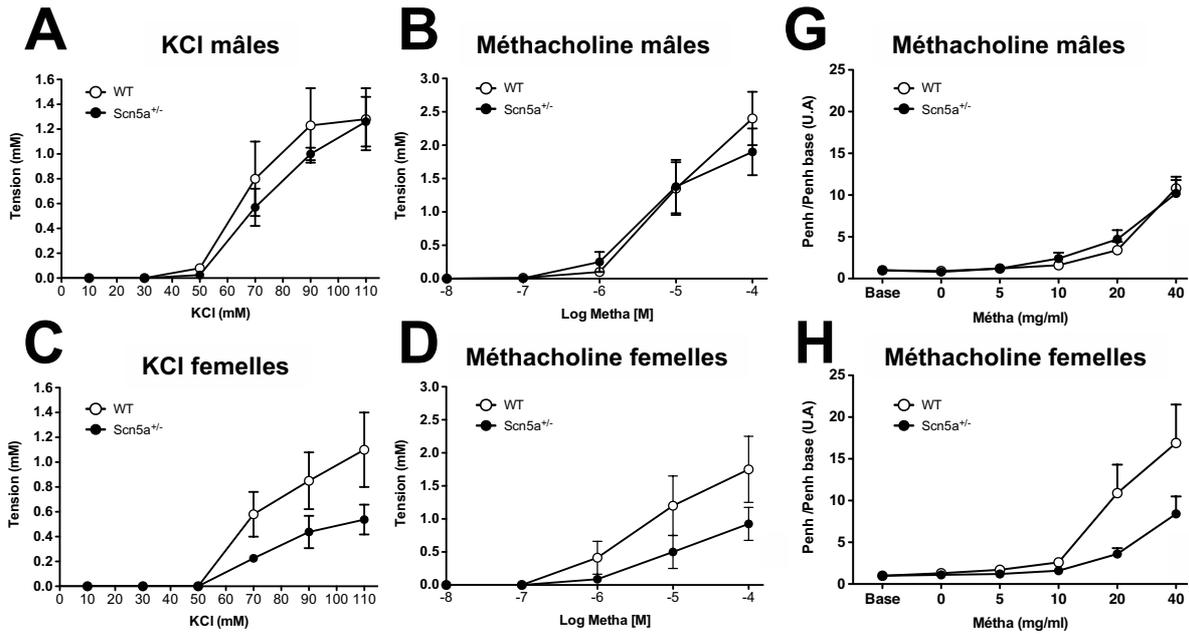
Puis, par western blot, nous avons quantifié l'expression protéique de Nav1.5 au même âge en utilisant l'approche Stain-free de BioRad technologies: l'expression de Nav1.5 est diminuée de plus de la moitié par rapport à l'expression dans le cœur (Figure 46C; Cœur,  $n=5$ ,  $1,00\pm0,12$ ; Poumon,  $n=5$ ,  $0,43\pm0,07$ ;  $**p<0,01$  vs cœur).



**Figure 46: Caractérisation des expressions de Scn5a et Nav1.5 dans la sphère pulmonaire chez la souris âgée de 35 à 40 semaines.** A, Validation des préparations de RT par PCR ciblant la GAPDH et caractérisation de l'expression de Scn5a à partir d'ADNc de cellules musculaires lisses de bronches primaires (MLB). B, Identification et quantification de l'ARNm Scn5a dans les poumons par rapport au cœur. C, Quantification protéique de Nav1.5 dans les poumons par rapport au cœur. A gauche, une illustration représentative d'un western blot pour Nav1.5 et du marquage Stain-free associé. ( $n=5$  par condition,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$  vs cœur; M: Marqueur; MLB: cellules musculaires lisses de bronche primaire de souris; NRT: Non Réverse Transcrit; Poum.: Poumons; RT: Réverse Transcrit).

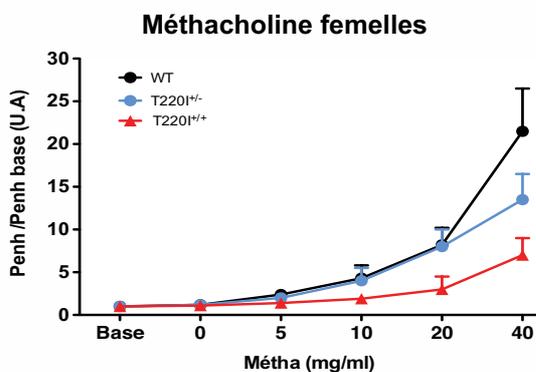
### Rôle de Nav1.5 dans la fonction du poumon chez la souris

A partir d'études *ex vivo* de réactivité bronchique dans des cuves à organes isolés, nous avons observé chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> âgés de 35-40 semaines : 1) que les sujets mâles ne présentent pas de différence de réponse au KCl (Figure 47A à 110mM; Mâles-WT,  $n=4$ ,  $1,28\pm0,25$  mN; Mâles-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=5$ ,  $1,26\pm0,21$  mN; NS) et à la méthacholine (Figure 47B à 10<sup>-4</sup> M; WT-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=4$ ,  $2,42\pm0,41$  mN; Mâles-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=5$ ,  $1,89\pm0,35$  mN; NS), et 2) qu'au contraire, les sujets femelles développent une baisse de la contraction des bronches en réponse au KCl (Figure 47C à 110mM; Femelles-WT,  $n=4$ ,  $1,28\pm0,25$  mN; Femelles-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=5$ ,  $1,26\pm0,21$  mN;  $*p<0,05$ ) ou à la méthacholine (Figure 47D à 10<sup>-4</sup> M; Femelles-WT,  $n=4$ ,  $1,75\pm0,53$  mN; Femelles-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=5$ ,  $0,92\pm0,26$  mN;  $*p<0,05$  vs WT) par rapport aux femelles sauvages. Cette différence sexuelle au niveau de la réactivité bronchique chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup> est retrouvée lorsque la fonction pulmonaire est évaluée par pléthysmographie avec la nébulisation de doses croissantes de méthacholine (Figure 47E à 40mg/ml; Mâles-WT,  $n=6$ , Penh à 10,8±1,4 mN; Mâles-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=7$ , Penh à 10,2±1,6 mN; NS) (Figure 47F à 40mg/ml; Femelles-WT,  $n=7$ , Penh à 16,9±4,6 mN; Femelles-Scn5a<sup>+/-</sup>,  $n=7$ , Penh à 8,4±2,1 mN;  $*p<0,05$  vs WT) en comparaison avec leurs homologues sauvages.



**Figure 47: Nav1.5 et fonction respiratoire: modèle Scn5a<sup>+/-</sup>.** Evaluation *ex vivo* de la réactivité bronchique en réponse au KCl (A et C) et à la méthacholine (B et D) sur des anneaux de bronches provenant de souris mâles (A et B) ou femelles (C et D) WT et Scn5a<sup>+/-</sup>. Evaluation *in vivo* de la fonction pulmonaire par pléthysmographie en réponse à des doses croissantes de Méthacholine chez des animaux d'animaux mâles et femelles (G et H) sauvages ou Scn5a<sup>+/-</sup>. Toutes les investigations ont été réalisées à l'âge de 35-40 semaines. (\**p*<0,05 vs WT respectif, n=4-5 par condition).

Dans un second modèle murin exprimant cette fois-ci la mutation humaine T220I à l'état hétérozygote ou homozygote, des données préliminaires de pléthysmographie ont été réalisées. Comme pour les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>, les réponses sous méthacholine sont significativement plus faibles chez les femelles T220I<sup>+/-</sup> par rapport aux sauvages. En revanche, les femelles T220I<sup>+/-</sup> présentent plutôt un profil intermédiaire entre ces deux phénotypes extrêmes (Figure 48 à 40mg/ml; Femelles-WT, n=7, Penh à 21,5±5,3 mN; Femelles- T220I<sup>+/-</sup>, n=7, Penh à 13,5±3,5 mN; Femelles- T220I<sup>+/+</sup>, n=7, Penh à 7,2±2,6 mN; \**p*<0,05 vs WT), profil similaire aux animaux invalidés à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A.

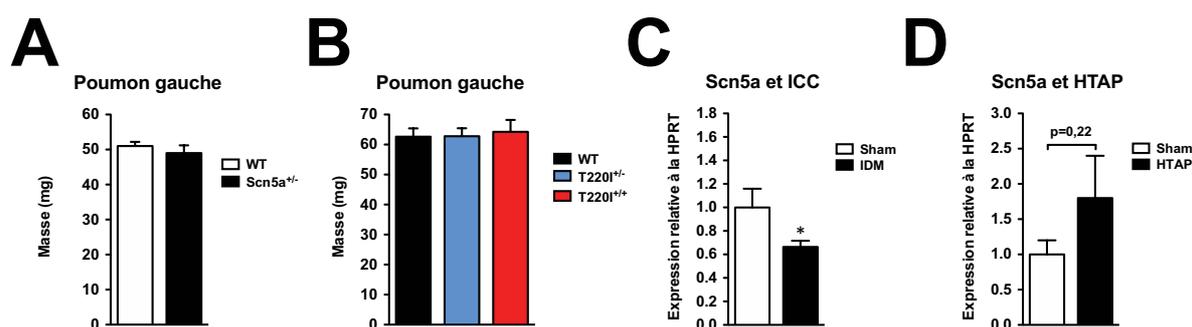


**Figure 48: Nav1.5 et fonction respiratoire: modèle murin SCN5A T220I.** Evaluation *in vivo* de la fonction pulmonaire par pléthysmographie en réponse à des doses croissantes de Méthacholine chez des souris femelles sauvages, hétérozygotes (T220I<sup>+/-</sup>) ou homozygotes (T220I<sup>+/+</sup>) pour la mutation T220I. Les investigations ont été réalisées à l'âge de 35-40 semaines. (\**p*<0,05 vs WT respectif, n=6-7 par condition; Métha: Méthacholine).

### Implications de SCN5A dans le remodelage pulmonaire

Dans des conditions basales, l'altération de l'expression et/ou de l'activité de Nav1.5 ne modifient pas la gravimétrie des poumons, plus particulièrement du poumon gauche, comme observée chez les animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> (Figure 49A ; WT, n=10, 51,1±1,2 mg ; *Scn5a*<sup>+/-</sup>, n=10, 49,2±2,2 mg ; NS) ou les animaux T220I<sup>+/-</sup> ou T220I<sup>+/+</sup> (Figure 49B ; WT, n=10, 62,6±2,8 mg ; T220I<sup>+/-</sup>, n=10, 62,8±2,6 mg ; T220I<sup>+/+</sup>, n=10, 64,3±3,9 mg ; NS).

Cependant, dans des conditions physiopathologiques connues pour être associées avec un remodelage pulmonaire, nous avons pu observer des modifications de l'expression transcriptionnelle du gène SCN5A. Dans le cadre de la phase compensée de l'insuffisance cardiaque suite à un infarctus du myocarde chez des souris sauvages où les poumons ne présentent pas une augmentation de leur gravimétrie normalisée sur la longueur du tibia, nous avons pu mettre en évidence une baisse de l'expression du gène SCN5A (Figure 49C ; Sham, n=5, 1,00±0,16 ; IDM, n=5, 0,66±0,05 ; \*p<0,05). A l'inverse, une tendance à l'augmentation de l'expression des ARNm de SCN5A a été observée dans les poumons de rats présentant une hypertension artérielle pulmonaire d'origine hypoxique (Figure 49D ; Sham, n=5, 1,00±0,20 ; HTAP, n=5, 1,80±0,60 ; p=0,22).



**Figure 49: SCN5A et remodelage pulmonaire.** A et B, Poids du poumon gauche respectivement dans le modèle murin d'inactivation hétérozygote pour le gène SCN5A et le modèle murin d'expression hétérozygote ou homozygote de la mutation T220I humaine pour Nav1.5 à l'âge de 35-40 semaines. n=10 par condition. C et D, Expression du gène SCN5A dans les poumons d'animaux sauvages, respectivement, au cours de l'insuffisance cardiaque compensée à 6 semaines post infarctus du myocarde chez la souris et de l'hypertension artérielle pulmonaire d'origine hypoxique chez le rat. (n=5 par condition, \*p<0,05 vs Sham)(HTAP: HyperTension Artérielle Pulmonaire; ICC: Insuffisance Cardiaque Compensée; Sham: contrôle de la procédure de l'infarctus du myocarde ou de l'HTAP. T220I<sup>+/-</sup> ou T220I<sup>+/+</sup>: animaux hétérozygotes ou homozygotes pour la mutation T220I).

### Discussion

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois les expressions du gène SCN5A et de sa protéine associée Nav1.5 dans le poumon chez la souris. Ces expressions sont localisées à minima au niveau des cellules musculaires lisses des bronches chez la souris. En effet, nos essais d'immunohistochimie se sont avérés non concluants à ce jour à cause d'un fort bruit de fond

généralisé par le manque de spécificité des immuns sérums dirigés contre Nav1.5. Avec l'utilisation des modèles transgéniques murins *Scn5a<sup>+/-</sup>* et exprimant la mutation humaine T220I de Nav1.5, nous avons pu montrer chez des souris femelles que la baisse d'expression ou une altération de la fonction du canal Nav1.5 provoquait une baisse de la bronchoconstriction en réponse à des stimulations au KCl ou à la méthacholine. Enfin dans des situations physiopathologiques pour les poumons, comme l'insuffisance cardiaque gauche ou l'hypertension artérielle pulmonaire, nous avons observé des variations de l'expression pour le gène *SCN5A* suggérant un rôle potentiel de ce canal dans ces processus physiopathologiques.

A partir de la littérature, l'expression de l'ARN messager de *SCN5A* dans les poumons et particulièrement dans les cellules musculaires de bronches n'est pas consensuelle. Nous démontrons pour la première fois chez la souris l'expression de l'ARNm dans les poumons et les CMLs de bronches en culture. En adéquation avec ses résultats, récemment, Bradley et ses collaborateurs ont identifié, chez le lapin, l'expression de 8 isoformes de canaux sodiques voltage-dépendant au niveau des bronches et plus spécifiquement de Nav1.2 et Nav1.5 dans des CMLs de bronches fraîchement isolés (Bradley et al., 2013). Quelques études menées sur des CMLs isolées de bronches humaines n'ont pas permis l'identification d'une expression de *SCN5A* mais une expression majoritaire de *SCN9A* codant pour le canal Nav1.7 responsable du courant sodique observé dans ces cellules (Jo et al., 2004), même courant modulable par la dexaméthasone (Nakajima et al., 2008). Ces résultats non consensuels peuvent être expliqués 1) soit simplement par des différences inter-espèces dans l'expression de Nav1.5 dans les CMLs de bronches qui ne sont pas improbables à la vue des nombreuses différences déjà observées sur la structure du gène *SCN5A* et l'expression de variants d'épissages en fonction des espèces, ou 2) soit par une modification d'expression lors de la mise en culture des CMLs en fonction des études avec des investigations réalisées sur des cellules fraîchement isolées ou des cellules ayant déjà subies de 3 à 7 passages. En effet il a été montré, notamment au niveau de CMLs issues de bronche humaine, l'apparition progressive d'un courant sodique au cours de la mise en culture (Snetkov et al., 1996). Cette éventuelle variation d'expression de Nav1.5 en fonction des conditions de culture doit d'ailleurs être prise en compte dans nos cultures cellulaires primaires, d'où l'importance des expériences d'immunohistochimie à venir.

Au niveau de la fonctionnalité du canal Nav1.5 dans les poumons, le potentiel de membrane des CMLs de bronches peut varier physiologiquement entre -70 et -30mV (Hirota et al., 2007), fenêtre de potentiel où Nav1.5 pourrait avoir un rôle à jouer. Bradley et ses collaborateurs ont pu montrer l'existence d'un courant sodique sensible au voltage et résistant à la TTX dans leurs CMLs de bronches fraîchement isolées qu'ils corrèlent avec la présence de Nav1.5 à la vue de leur résultat d'expression sur des isoformes de canaux sodiques voltage-dépendant au niveau transcriptionnel (Bradley et al. 2013). Dans notre étude, aucune investigation électrophysiologique n'a été réalisée pour établir l'existence d'un courant sodique voltage-dépendant résistant à la TTX chez la souris. En

revanche à partir de nos modèles murins transgéniques, chez des femelles, nous avons pu observer qu'une baisse de l'expression ou une altération de l'activité de Nav1.5 provoquait une baisse de la réactivité bronchique *ex vivo* et de la fonction respiratoire *in vivo* en réponse à une stimulation bronchoconstrictrice à la méthacholine. La faiblesse de différence de réponse chez les mâles peut être liée la grande difficulté expérimentale, classiquement reconnue, de montrer des différences de réactivité bronchique chez les animaux mâles par rapport aux femelles. Systématiquement se sont des populations femelles qui sont explorées dans la bibliographie. Néanmoins la possibilité d'une différence de réponse inter sexuelle n'est pas à exclure et reste à définir à ce jour. Dans tous les cas, le canal Nav1.5 semble pouvoir jouer un rôle fonctionnel au niveau pulmonaire.

De manière intéressante, l'expression à l'état homozygote de la mutation T220I a un impact plus important que la perte de 50% de la protéine Nav1.5. Cette observation pourrait être expliquée dans le second cas par l'absence de nécessité de la présence de 100% du pool de canaux Nav1.5 à la membrane pour assurer les effets associés à celui-ci, ou dans le premier cas, par une atteinte de la totalité des canaux liée à l'expression à l'état homozygote de la mutation ayant alors un impact sur la contractilité des bronches. Cependant, à ce jour, aucun élément ne nous permet de comprendre précisément la mécanistique de Nav1.5 sur l'activité contractile des bronches. C'est pourquoi, il pourrait être intéressant de poursuivre nos investigations sur l'impact du canal sodique, soit par des activations ou des inhibitions pharmacologiques comme pour l'étude de la fonction des canaux KCNQ1 dans les CMLs de bronches (Brueggeman et al., 2014 ; Evseev et al. 2013), soit en poursuivant les études sur nos modèles murins. Des mesures du potentiel de membrane des cellules musculaires lisses isolées dans des conditions basales ou stimulés au KCl ou méthacholine pourraient être envisagées comme dans le cas de Bradley et ses collaborateurs. Ces derniers ont ainsi décrit une augmentation de la durée du potentiel d'action enregistré à partir de CMLs de bronches suite à l'application de vératridine, un activateur des canaux sodiques voltage-dépendant (Bradley et al. 2013).

Dans la littérature, aucune étude ne décrit un lien entre des modifications de Nav1.5 et un remodelage de la structure pulmonaire. Malgré l'absence de variation des poids pulmonaires entre nos deux modèles transgéniques par rapport aux animaux contrôles dans des conditions de base, il n'est pas impossible que le canal Nav1.5 ait un rôle à jouer sur la fonction et sur le remodelage de ces tissus dans des conditions physiopathologiques. En effet, nous avons pu montrer que l'expression de SCN5A est modifiée dans les poumons au cours de l'insuffisance cardiaque compensée et l'hypertension artérielle pulmonaire. Or, dans le cadre de l'hypertension pulmonaire post capillaire associée à l'insuffisance cardiaque gauche, il est classiquement reconnu qu'une activation et différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sont responsables d'une déposition inadaptée d'éléments de la matrice extracellulaire ayant pour conséquence un épaissement du parenchyme alvéolaire responsable d'un syndrome restrictif pulmonaire, participant à l'hypertension pulmonaire (Azarbar et al. 2014). En

2012, Chatelier et ses collaborateurs ont décrit une augmentation de l'expression de SCN5A associée à l'apparition d'un courant sodique voltage dépendant au cours de la différenciation de fibroblastes atriaux humains en myofibroblastes (Chatelier et al. 2012). A l'inverse, des données préliminaires obtenues dans notre équipe semblent montrer que 1) la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes soit associée à une baisse de l'expression de Nav1.5 et 2) les fibroblastes issus de cœurs animaux *Scn5a<sup>+/-</sup>* se différencient plus rapidement en myofibroblastes comparés à des animaux sauvages. A la vue de ces informations, il n'est pas impossible que des mutations de SCN5A puissent avoir un impact sur le remodelage pulmonaire en modifiant la différenciation et le comportement des myofibroblastes au niveau des poumons.

Maintenant, si nous prenons en considération les résultats observés sur l'effet d'une perte de fonction de Nav1.5 suite à un infarctus du myocarde au niveau cardiaque, au delà d'une augmentation du risque d'arythmies et du remodelage cardiaque, les patients porteurs de mutations dites avec perte de fonction pour Nav1.5 pourraient présenter des modifications dans la sévérité du remodelage pulmonaire résultant de l'insuffisance cardiaque gauche, dont les effets délétères ou protecteurs restent à définir.

En conclusion, nous avons pu caractériser une expression du gène SCN5A et de sa protéine Nav1.5 dans les poumons chez la souris, ainsi qu'un rôle dans la fonction pulmonaire par une approche utilisant des animaux transgéniques avec une perte de fonction de Nav1.5. Parallèlement, il semblerait que le canal Nav1.5 soit soumis à des régulations dans les poumons, notamment au niveau transcriptionnel, dans des situations physiopathologiques comme l'insuffisance cardiaque compensée post-ischémique ou l'hypertension artérielle pulmonaire.

En perspectives, la caractérisation de Nav1.5 dans le poumon devra être poursuivie en confirmant au niveau protéique et histologique l'expression du canal au niveau des cellules musculaires lisses des voies aériennes et d'autres compartiments pulmonaires. Les données préliminaires obtenues en pléthysmographie seront à compléter par des données *ex vivo* sur la réactivité des bronches pour le modèle murin T220I. De plus, des études plus poussées pourront être réalisées sur les régulations, et les conséquences fonctionnelles et/ou structurales de Nav1.5 dans le poumon dans des conditions physiopathologiques. A terme, ces résultats pourraient suggérer que les patients porteurs de mutations pour le gène SCN5A puissent développer un phénotype pulmonaire différent de celui observé chez des sujets non porteurs de mutations, avec des conséquences synergiques potentielles avec leur phénotype cardiaque.

## **VIII- Projet n°4 - Caractérisation d'une cardiomyopathie dans un modèle murin d'invalidation pour le gène Bcl2 : un modèle animal pour la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip**

**Projet conduit en collaboration avec l'équipe 3 « Investigations moléculaires des dyslipidémies » dirigée par le professeur Cariou de L'institut du thorax**

### **Contexte**

Xavier Prieur, chercheur et membre de l'équipe « Investigations moléculaires des dyslipidémies », travaille sur la caractérisation d'un modèle murin pour la lipodystrophie de Berardinelli-Seip (BSCL), pathologie associée à des troubles métaboliques sévères. Ces troubles s'accompagnent de signes cliniques cardiovasculaires. Ce modèle animal a fait l'objet d'une publication pour sa caractérisation métabolique (Prieur et al., 2013). Cette équipe continue à étudier les répercussions énergétiques de l'absence de la seipine. La suite de ce travail s'est naturellement orientée vers des investigations cardiaques *via* l'établissement d'un profil métabolique des cœurs chez les souris déficientes en seipine afin d'identifier d'éventuels signes de lipotoxicité cardiovasculaire et/ou de signes en faveur d'un remodelage cardiaque comme décrits chez les patients.

### **Objectifs et contributions**

Ces animaux invalidés ont montré des modifications importantes de leur métabolisme lipidique ainsi qu'un stress oxydant augmenté au niveau cardiaque. Parallèlement, des données de gravimétrie (hypertrophie) observées chez les animaux déficients en seipine ont fini de justifier l'importance d'une étude des aspects cardiovasculaires pour ce modèle. C'est pourquoi, Xavier Prieur a désiré collaborer avec notre équipe afin de mener une caractérisation cardiaque structurale et fonctionnelle chez les souris déficientes en seipine.

Dans les travaux présentés par la suite, la part de mon travail a consisté en la réalisation des investigations de biologie moléculaire, d'électrocardiographie et d'échocardiographie sur ce modèle murin pour la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip.

## Caractérisation d'une cardiomyopathie dans un modèle murin d'invalidation pour le gène Bsc12 : un modèle animal pour la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip

Xavier Prieur<sup>1</sup>, Benoît Jagu<sup>2</sup>, Gilles Toumaniantz<sup>2</sup>, Angela Tesse<sup>3</sup>, Lucile Dollet<sup>1</sup>, Flavien Charpentier<sup>2</sup>, Jocelyne Magré<sup>1</sup>, Bertrand Cariou<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes, équipe Investigations moléculaires des dyslipidémies.

<sup>2</sup>Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes, équipe Cardiopathies et mort subite.

<sup>3</sup>Inserm UMR 1087- CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes, équipe Signalisation et hypertension artérielle.

**Résumé :** La lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) est une maladie rare associée avec, dans certains cas, une mortalité très précoce. L'une des causes de la BSCL est la présence de mutations sur le gène Bsc12 codant pour la seipine. Malgré l'identification de troubles métaboliques, cardiovasculaires et neurologiques, les mécanismes de cette pathologie restent à ce jour encore méconnus. A partir d'un modèle murin déficient en seipine (Bsc12<sup>-/-</sup>), il a pu être montré que ces souris Bsc12<sup>-/-</sup> présentaient une lipodystrophie associée à plusieurs autres troubles métaboliques comme un diabète ou une stéatose hépatique. **Objectifs.** Le but de cette étude est d'identifier si les souris déficientes en seipine présentent des altérations métaboliques, structurales et fonctionnelles au niveau cardiaque. Si tel est le cas, cela nous permettrait de comprendre et d'agir sur la cardiomyopathie du patient BSCL. **Résultats.** En lien avec le phénotype cardiaque observé chez les patients BSCL, nous avons pu montrer pour la première fois qu'une déficience en seipine pouvait être associée à une augmentation de la lipotoxicité cardiaque ainsi que la présence de remodelages moléculaire, structural observé en gravimétrie et échocardiographie, et fonctionnel avec une défaut de repolarisation et une dysfonction diastolique. De plus, le traitement aux thiazolidinediones (TZD) a montré la possibilité d'une réversion partielle du phénotype cardiaque chez les animaux Bsc12<sup>-/-</sup> traités. **Conclusions et perspectives.** Ces résultats montrent pour la première fois qu'une déficience en seipine est associée à une lipotoxicité cardiaque pouvant être à l'origine de remodelages structural comme fonctionnel. Les TZD s'avèrent être un traitement potentiel afin de lutter contre les cardiomyopathies lipotoxiques du sujet présentant une déficience en seipine. La poursuite de la compréhension des rôles de cette protéine et les processus physiopathologiques associés à sa déficience permettraient de mieux appréhender les mécanismes de lipotoxicité et d'étendre la possibilité de traitements au delà du groupe très restreints des patients BSCL.

**Mots-clés :** Seipine, BSCL, lipodystrophie, métabolisme lipidique, remodelage cardiaque, dysfonction diastolique, QT long, thiazolidinediones.

## Introduction

La lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) est une maladie rare caractérisée par une absence généralisée de tissu adipeux dès la naissance. La BSCL constitue l'une des formes sévères et précoces de diabète insulino-résistant. En effet, dès le plus jeune âge, les patients développent une intolérance au glucose, un diabète, ainsi qu'une hypertriglycémie. Ces patients décèdent prématurément après l'adolescence dans la plupart des cas. Les cardiomyopathies sont une des causes de décès chez ces patients. Des cas de développement d'insuffisance cardiaque congestive ont même été décrits avant l'âge de deux ans (Lupsa et al. 2010).

La BSCL est transmise selon un mode autosomique récessif. Elle résulte de l'altération de l'un des deux gènes majeurs impliqués chez environ 95% des patients, AGPAT2 ou BSCL2. Le gène BSCL2, découvert en 2001 comme étant une cause de la lipodystrophie (Magré et al. 2001), code pour une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique, la "seipine". La fonction de cette protéine ainsi que ses implications dans la physiopathologie de la BSCL sont encore mal comprises. Toutefois, l'absence de tissu adipeux est présumée être l'origine des perturbations métaboliques et fonctionnelles suite à un mécanisme de lipotoxicité associé à un stockage ectopique des lipides dans les muscles, le foie, le pancréas ou encore le cœur. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement spécifique pour la BSCL. Afin d'étudier les mécanismes de cette pathologie, un modèle murin KO pour le gène BSCL2, souris *Bscl2<sup>-/-</sup>*, a été développé et caractérisé principalement sur le plan métabolique (Prieur et al., 2013).

Les objectifs de cette étude sont de caractériser le remodelage cardiaque sur le plan transcriptomique, électrocardiographique et échocardiographique afin de mieux appréhender la fonction cardiaque des animaux *Bscl2<sup>-/-</sup>*, et de mieux comprendre les mécanismes responsables des cardiomyopathies observées chez les patients atteints de lipodystrophie de Berardinelli-Seip. Dans un dernier temps, il sera présenté les résultats préliminaires obtenus suite à un traitement avec une molécule de la famille des thiazolidinediones (TZD), traitement qui semble reverser partiellement le phénotype pathologique observé chez les animaux déficients en seipine.

## Matériels et méthodes

### Animaux

Toutes les souris mâles de fond pur C57Bl/6 sauvages et *Bscl2<sup>-/-</sup>* utilisées pour les expériences de cette étude ont été hébergées dans une animalerie à température contrôlée (22°C) avec des cycles jour/nuit de 12 heures. L'eau et l'alimentation sont fournies *ad libitum*. Pour les expériences avec le traitement aux TZD, les souris ont été nourries avec une alimentation supplémentée en TZD à une dose de 300mg/kg/jour.

### **Mesure du métabolisme des lipides *in vivo*, extraction et quantification des lipides et histologie hépatique**

Pour les détails, se référer à la publication de Prieur et ses collaborateurs (Prieur et al., 2013).

#### **Mesure du stress oxydant**

Des cœurs de souris sauvages et  $Bscl2^{-/-}$ , disséqués et congelés à l'isopentane, ont été inclus dans du Tissu-Tek® OCT™ et coupés par Cryostat. Les coupes ont été marquées par immunofluorescence au DHE (DiHydroEthidium) afin d'identifier la présence d'ions superoxydes ou à l'aide d'un anticorps dirigé contre les résidus nitrés des protéines. L'intensité du signal a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. Des expériences de western blot ont été faites à partir d'extraits protéiques de cœur de souris sauvages et  $Bscl2^{-/-}$  afin de quantifier les niveaux de carbonylation des protéines.

#### **Analyse par PCR quantitative**

Pour les protocoles expérimentaux d'extraction, la purification des ARN totaux, et la méthode la quantification, vous pouvez vous référer à la partie matériels et méthodes du premier projet (page 111 à 112) et à la publication de Prieur et ses collaborateurs (Prieur et al., 2013).

#### **ECG de surface**

Pour la procédure d'enregistrement et d'analyse de l'ECG de surface chez les animaux WT et sauvages et  $Bscl2^{-/-}$ , vous pouvez vous référer à la partie matériels et méthodes du projet 2.

#### **Echocardiographie**

Pour la procédure d'acquisition et d'analyse de la structure et de la fonction cardiaque par échocardiographie chez les animaux WT et sauvages et  $Bscl2^{-/-}$ , vous pouvez vous référer à la partie matériels et méthodes du projet 1 et 2.

#### **Analyses statistiques**

Tous les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les tests statistiques ont été réalisés à partir du logiciel GraphPad Prism5. A la vue des effectifs en présence dans cette étude, des tests de Mann Whitney ont été choisis pour évaluer la significativité des différences observées. Les valeurs sont jugées significatives quand la valeur de p est au minimum inférieure ou égale à 0,05.

## **Résultats**

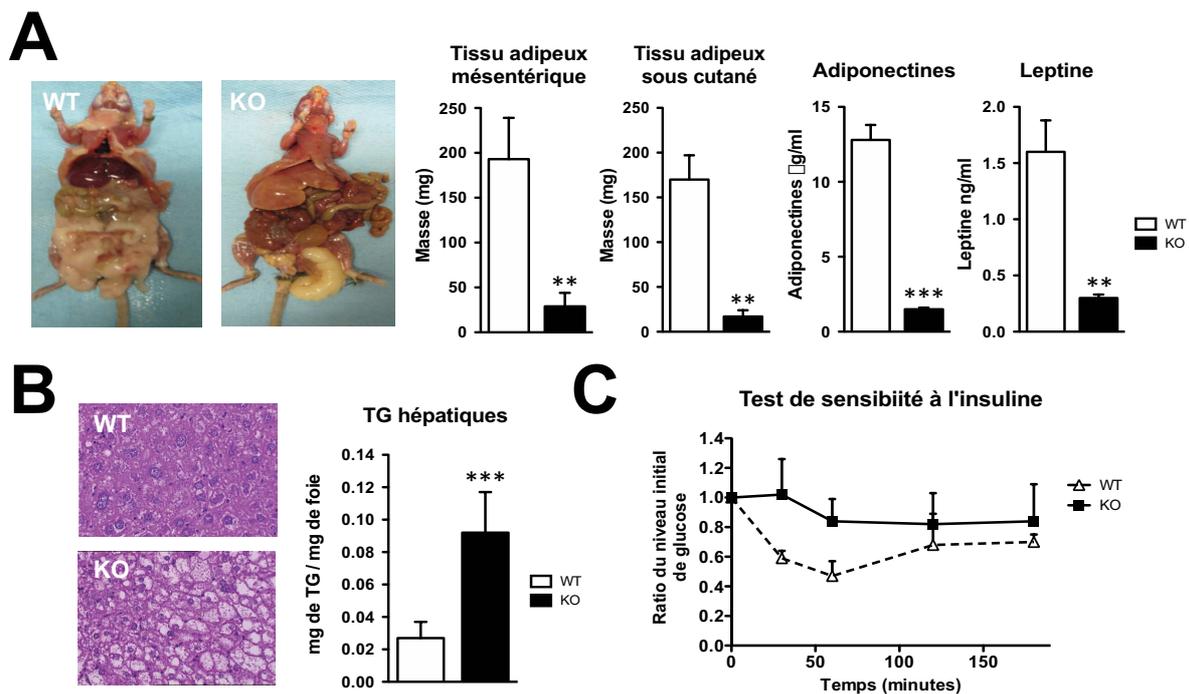
### **Caractérisation initiale du modèle $Bscl2^{-/-}$**

Prieur et ses collaborateurs ont mis en évidence une quasi absence de tissus adipeux mésentérique et sous cutané (*Figure 50A* ; WT,  $n=6$ ,  $195,6 \pm 46,2$  mg ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $29,2 \pm 15,2$  mg ;  $**p < 0,01$  vs WT) chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$  à l'âge de 3 mois. Il a été aussi montré que cette quasi absence de tissu adipeux sous cutané (*Figure 50A* ; WT,  $n=6$ ,  $176,1 \pm 27,5$  mg ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $17,2 \pm 7,1$

mg ;  $**p < 0,01$  vs WT) était corrélée avec une réduction des niveaux plasmatiques des adiponectines (Figure 50A ; WT,  $n=6$ ,  $12,8 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $1,5 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  ;  $***p < 0,001$  vs WT) et de la leptine (Figure 50A ; WT,  $n=6$ ,  $1,63 \pm 0,28 \text{ ng/ml}$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $0,310,03 \pm \text{ ng/ml}$  ;  $**p < 0,01$  vs WT), des hormones produites et secrétées par le tissu adipeux (Prieur et al., 2013).

Une stéatose a également été mise en évidence *via* des augmentations de la gravimétrie pour le foie (*données non fournies*), de la coloration histologique et la quantification des triglycérides présents dans le foie des animaux  $Bscl2^{-/-}$  (Figure 50B ; WT,  $n=6$ ,  $0,027 \pm 0,011$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $0,092 \pm 0,025$  ;  $***p < 0,001$  vs WT). Une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, non montrées ici, ainsi qu'une insulino-résistance (Figure 50C à 60 minutes ; WT,  $n=6$ ,  $0,47 \pm 0,11$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $0,84 \pm 0,15$  ;  $**p < 0,01$  vs WT) sont aussi observées chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ . Contrairement aux patients ayant une hypertriglycéridémie, les animaux  $Bscl2^{-/-}$  développent une hypotriglycéridémie (Prieur et al., 2013).

Malgré cette dernière composante, à l'âge de 3 mois, les souris  $Bscl2^{-/-}$  présentent de nombreuses caractéristiques métaboliques retrouvées chez les patients comme la lipodystrophie et un diabète insulino-résistant sévère (Prieur et al., 2013).

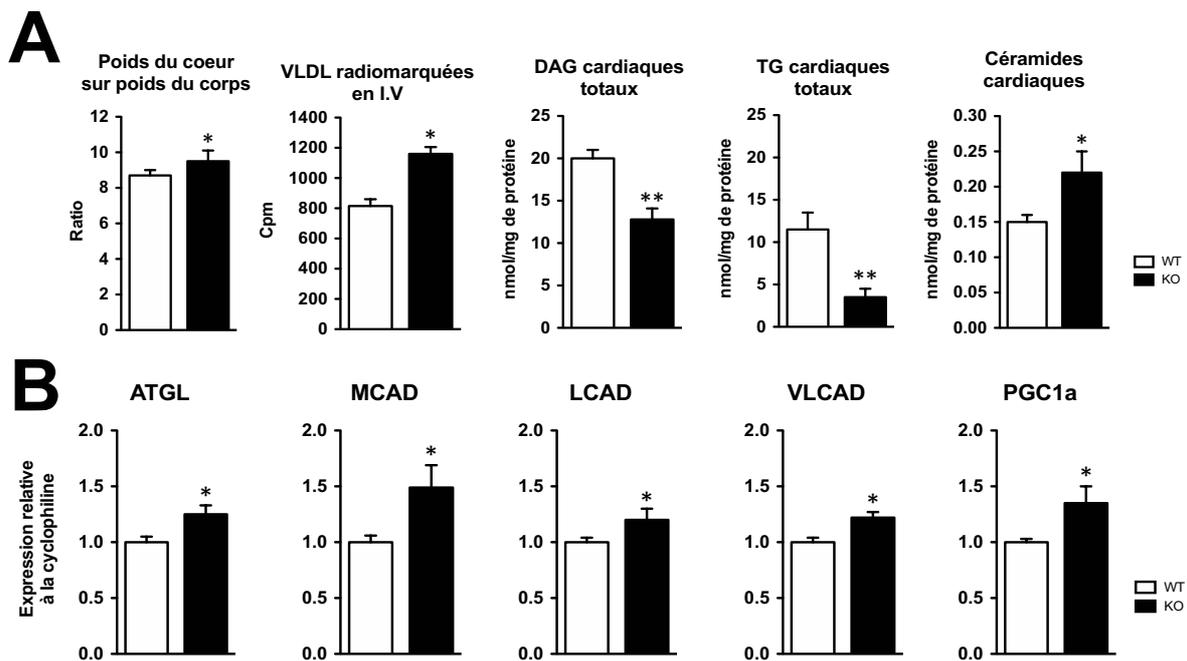


**Figure 50: Caractérisations de la lipodystrophie et des troubles métaboliques associés chez des souris sauvages et KO  $Bscl2$  âgées de 3 mois.** A, Illustrations d'un animal sauvage et KO  $Bscl2$  associées aux données gravimétriques des tissus adipeux mésentérique et sous cutané. Mesure des niveaux plasmatiques des adiponectines et de la leptine. B, Coupes histologiques de foie colorées à l'hématoxyline et à l'éosine associées aux mesures des triglycérides présents dans le foie. C, Test de sensibilité à l'insuline après 6 heures de jeun (mâles,  $n=6$  par génotype;  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  vs WT) (TG: Triglycérides).

### Phénotype métabolique cardiaque des animaux $Bscl2^{-/-}$

Dans un premier temps, la gravimétrie du cœur, par l'évaluation du rapport du poids du cœur sur le poids du corps de l'animal, a été trouvée augmentée chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$  à l'âge de 3 mois (Figure 51A ; WT,  $n=6$ ,  $9,72\pm 0,31$  mg/g ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $9,55\pm 0,62$  mg/g ;  $*p<0,05$  vs WT).

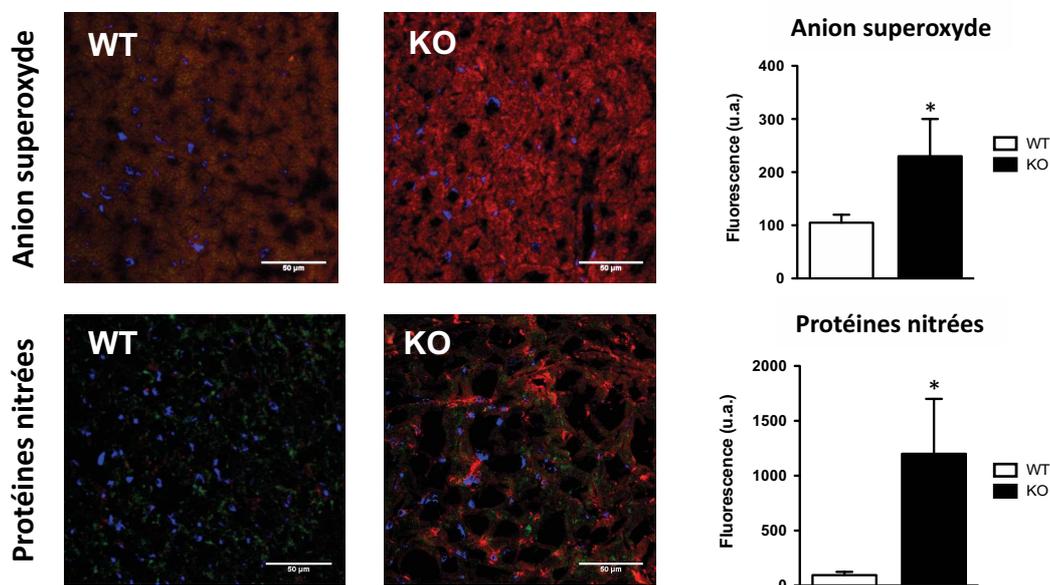
Une augmentation de la captation des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) radiomarquées (Figure 51B ; WT,  $n=5$ ,  $817\pm 4$  cpm ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $1163\pm 46$  cpm ;  $*p<0,05$  vs WT) et paradoxalement une diminution du diacylglycérol (DAG) (Figure 2A ; WT,  $n=5$ ,  $19,95\pm 1,12$  mg/g ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $12,82\pm 1,33$  mg/g ;  $**p<0,01$  vs WT) et des triglycérides (TG) (Figure 51A ; WT,  $n=5$ ,  $11,6\pm 2,1$  mg/g ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $3,5\pm 0,8$  mg/g ;  $**p<0,01$  vs WT) ont été observées, par Prieur et ses collaborateurs, chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ . De plus, les expressions de gènes impliqués dans le catabolisme lipidiques ont été retrouvées augmentées chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$  à l'âge de 3 mois : l'ATGL (Figure 51B : WT,  $n=5$ ,  $1,00\pm 0,05$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=5$ ,  $1,25\pm 0,08$  ;  $*p<0,05$  vs WT), un acteur clé de la lipolyse cardiaque, dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras : la MCAD (Figure 51B : WT,  $n=5$ ,  $1,00\pm 0,06$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=5$ ,  $1,49\pm 0,18$  ;  $*p<0,05$  vs WT), la LCAD (Figure 51B : WT,  $n=5$ ,  $1,00\pm 0,04$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=5$ ,  $1,21\pm 0,09$  ;  $*p<0,05$  vs WT), la VLCAD (Figure 51B : WT,  $n=5$ ,  $1,00\pm 0,04$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=5$ ,  $1,22\pm 0,05$  ;  $*p<0,05$  vs WT) et la PGC1 $\alpha$  (Figure 51B : WT,  $n=5$ ,  $1,00\pm 0,03$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=5$ ,  $1,35\pm 0,15$  ;  $*p<0,05$  vs WT).



**Figure 51: Caractérisations de la gravimétrie et du métabolisme lipidique cardiaques chez des souris âgées de 3 mois.** A, Gravimétrie cardiaque associée à la quantification de la captation des VLDL par le cœur et analyses de différentes espèces lipidiques. B, Quantification par qPCR du niveau d'expression de gènes impliqués dans le catabolisme cardiaque des lipides (*mâles*,  $n=5-6$  par génotype ;  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  vs WT)(ATGL: Adipose Triglycérides Lipase ; DAG: DiAcyl-Glycérol; LCAD: Long Chain Acyl CoA Déhydrogénase; MCAD: Medium chain acyl CoA déhydrogénase; PGC1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; TG: Triglycérides; VLCAD: Very long chain acyl-CoA déhydrogénase).

Une augmentation des céramides, une cardiotoxine impliquée dans les cardiomyopathies lipotoxiques (Park et al. 2008), souvent associée à des situations de stress oxydant, a été décrite chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$  (Figure 51A : WT,  $n=5$ ,  $0,15\pm0,01$  mg/g ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=6$ ,  $0,22\pm0,03$  mg/g ;  $*p<0,05$  vs WT).

A la vue de ces résultats, il a été émis l'hypothèse que la production des espèces réactives de l'oxygène (ORE), à l'origine du stress oxydant, pourrait être augmentée chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ . En effet par microscopie confocale, une augmentation du stress oxydant a pu être observée qui se traduit par une élévation de la présence d'ions superoxydes, marqués au DHE, au niveau des myocards des animaux  $Bscl2^{-/-}$  par rapport aux animaux sauvages (Figure 52 en haut ; WT,  $n=3$ ,  $105\pm16$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=4$ ,  $232\pm72$  ;  $*p<0,05$  vs WT).



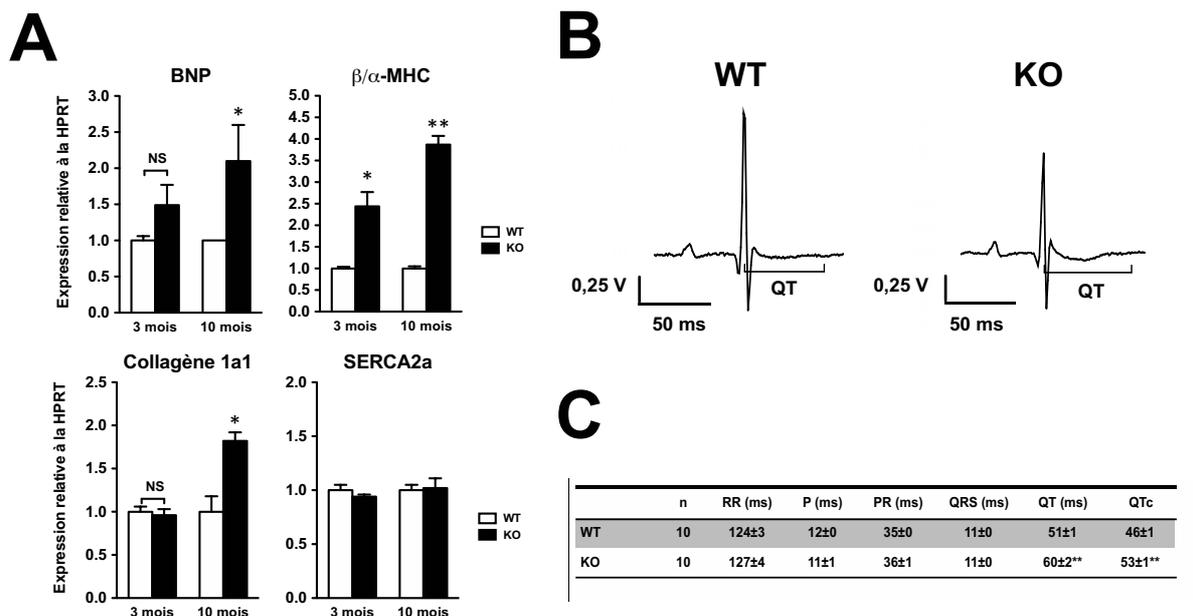
**Figure 52: Stress oxydant cardiaque et déficience en seipine.** Mise en évidence d'un stress oxydant en microscopie confocale à partir de coupes de cœurs congelés d'animaux WT et KO  $Bscl2$  (KO) via un marquage des anions superoxydes au DHE. **En bas**, Identification en microscopie confocale du marquage des protéines nitrées chez les animaux sauvages et KO. Les noyaux ont été colorés au DAPI, et la fluorescence a été quantifiée grâce au logiciel Image J (mâles,  $n=3-4$  par génotype,  $*p<0,05$  vs WT) (DHE: DiHydroEthidium).

Les conséquences biochimiques de ce stress oxydant ont été identifiées d'une part par microscopie confocale via une augmentation des protéines nitrées (Figure 52 en bas ; WT,  $n=3$ ,  $95\pm32$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=4$ ,  $1207\pm509$  ;  $*p<0,05$  vs WT) et d'autre part, par western blot, via une augmentation des protéines carbonylées chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$  (non montrée ici).

#### Phénotype de la structure et de la fonction cardiaque des animaux $Bscl2^{-/-}$

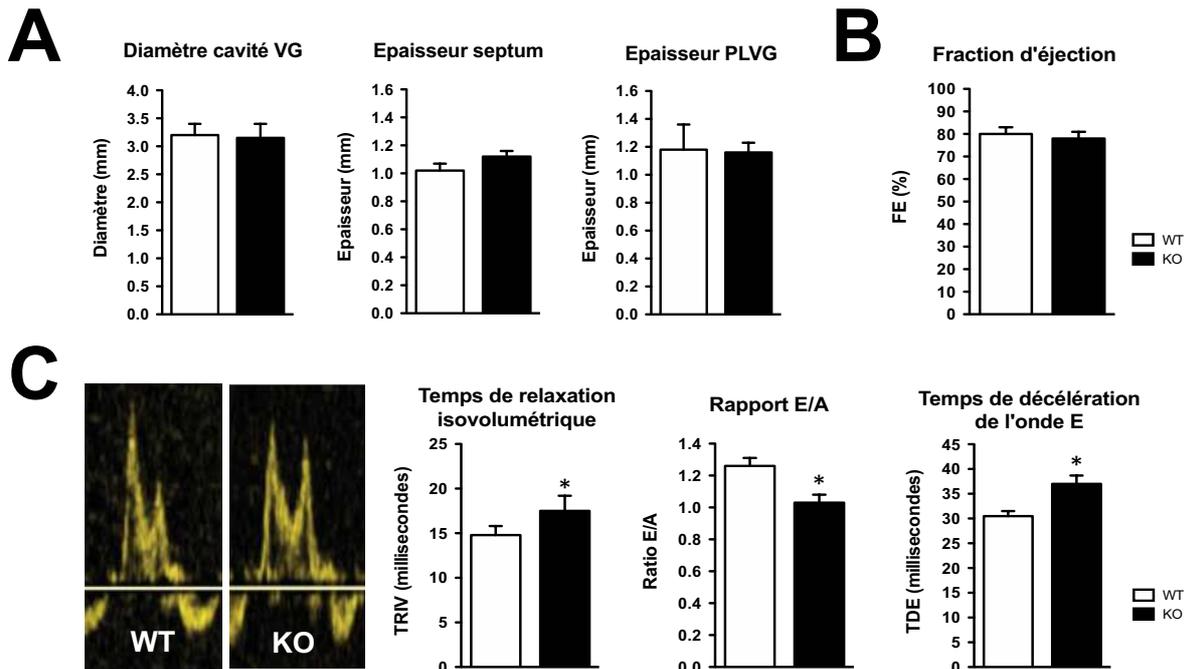
Suite aux données métaboliques présentées ci-dessus, des évaluations structurale et fonctionnelle du cœur seront avérées être nécessaires afin d'établir les conséquences cardiaques d'une déficience en seipine.

J'ai alors mené une étude prospective par PCR quantitative de l'expression de marqueurs décrits comme étant associés à un remodelage cardiaque. Ainsi à l'âge de 3 mois, aucune modification de l'expression, au niveau transcriptionnel, n'a été observée pour le BNP (« Brain Natriuretic Peptide ») (Figure 53A ; WT,  $n=6$ ,  $1,00\pm 0,06$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=7$ ,  $1,49\pm 0,28$  ; NS), le collagène 1a1 (Figure 53A ; WT,  $n=6$ ,  $1,00\pm 0,07$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=7$ ,  $0,96\pm 0,07$  ; NS) et la pompe SERCA2a (Figure 53A ; WT,  $n=6$ ,  $1,00\pm 0,05$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=7$ ,  $0,94\pm 0,02$  ; NS). Seul le rapport de l'isoforme  $\beta$  sur l'isoforme  $\alpha$  des chaînes lourdes de la myosine (MHC) est significativement augmenté chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ , suggérant l'initiation d'un remodelage cardiaque (Figure 53A ; WT,  $n=6$ ,  $1,00\pm 0,06$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=7$ ,  $1,49\pm 0,28$  ;  $*p<0,05$  vs WT). A contrario, à l'âge de 10 mois, parallèlement au maintien d'une élévation du rapport  $\beta/\alpha$ -MHC (Figure 53A ; WT,  $n=4$ ,  $1,00\pm 0,05$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=4$ ,  $3,87\pm 0,20$  ;  $**p<0,01$  vs WT), j'ai pu observer, à cet âge, une augmentation de l'expression des gènes codant pour le collagène 1a1 (Figure 53A ; WT,  $n=4$ ,  $1,00\pm 0,18$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=4$ ,  $1,82\pm 0,10$  ;  $*p<0,05$  vs WT) et le BNP (Figure 53A ; WT,  $n=4$ ,  $1,00\pm 0,00$  ;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=4$ ,  $2,10\pm 0,50$  ;  $*p<0,05$  vs WT), suggérant une mise en place d'un remodelage cardiaque. Néanmoins, aucune modification de l'expression de la pompe SERCA2a n'est détectée à ce stade.



**Figure 53: Niveaux d'expression de gènes cibles potentiellement impliqués dans un remodelage cardiaque et caractérisation électrocardiographique chez des souris non vigiles.** A, Expression du BNP, du rapport de l'expression de la  $\beta$  et  $\alpha$ -MHC, du collagène 1a1 et de SERCA2a à 3 et 10 mois. B, Tracés représentatifs de la dérivation DI de l'ECG d'un animal WT et KO à 3 mois sous anesthésie. C, Table des paramètres ECG mesurés chez les animaux WT et KO ( $n=4-7$  pour l'expression de gène et  $n=10$  pour l'ECG par génotype;  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  vs WT)(BNP: Brain Natriuretic Peptide; MHC: Myosin Heavy Chain; SERCA2a: Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase isoforme 2a).

Dans un deuxième temps, j'ai effectué une caractérisation de l'activité électrique cardiaque par l'enregistrement et l'analyse électrocardiographique réalisés chez des animaux non vigiles. Cette étude a permis de mettre en évidence une élévation des intervalles QT (Figure 53B ; WT,  $n=10$ ,  $51\pm 1$  ms;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=10$ ,  $60\pm 2$  ms ;  $**p<0,01$  vs WT) comme QT corrigé par rapport à la fréquence cardiaque (QTc) (Figure 53B ; WT,  $n=10$ ,  $46\pm 1$  ms;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=10$ ,  $53\pm 1$  ms ;  $**p<0,01$  vs WT) chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ . Ces résultats sont concordants avec les quelques cas décrits d'allongements de l'intervalle QT observés chez les patients atteints de la BSCL. A ce jour, aucune donnée ECG n'étant encore disponible à l'âge de 10 mois pour ce modèle, ceci reste à être réalisé.



**Figure 54: Caractérisations échocardiographiques structurales et fonctionnelles chez des souris âgées de 3 mois.** **A**, Marqueurs de remodelage du VG: diamètre, épaisseur de la paroi du septum et de la paroi libre du VG en diastole. **B**, Fonction systolique: fraction d'éjection du VG. **C**, Fonction diastolique du VG: Illustrations d'un flux mitral d'animaux sauvages et KO  $Bscl2$ . Le temps de relaxation isovolumétrique, le rapport entre l'onde E et A et le temps de décélération de l'onde E du flux mitral sont montrés ici ( $n=10$  par génotype,  $*p<0,05$  vs WT) (VG: Ventricule Gauche; PLVG: Paroi libre du VG; TDE: Temps de décélération de l'onde E; TRIV: Temps de relaxation isovolumétrique).

Puis, des investigations par échocardiographie réalisées à l'âge de 3 mois ont permis de mettre en évidence :

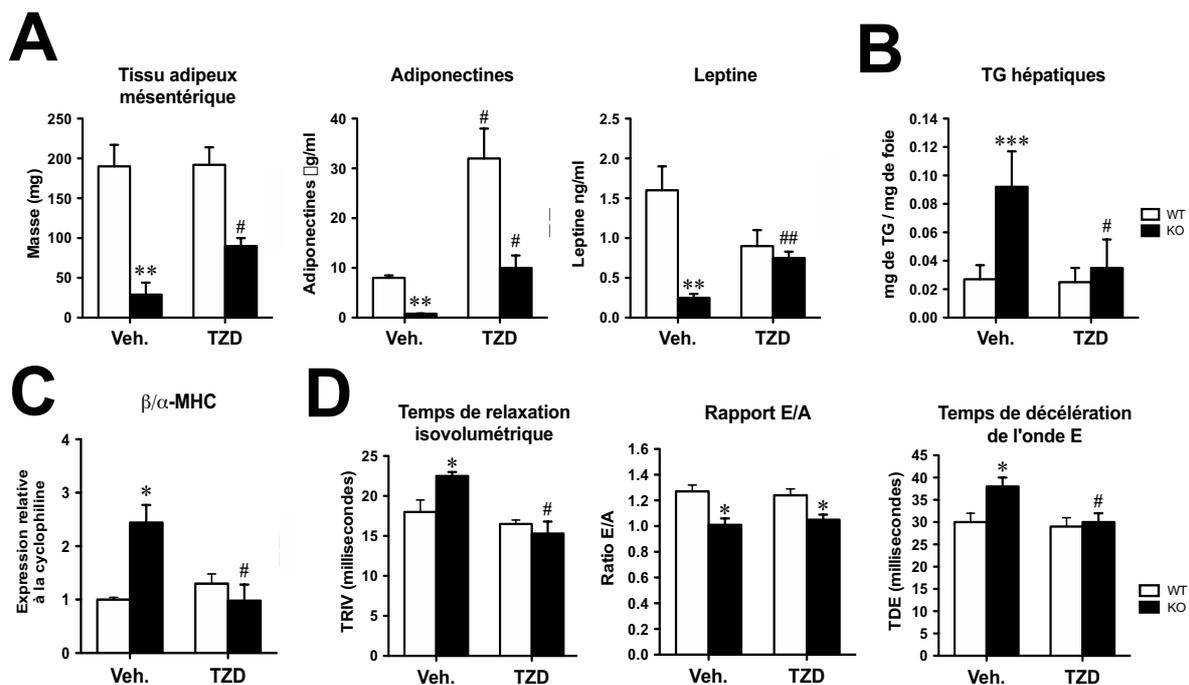
- une absence de remodelage structural en terme de modifications d'épaisseur de parois septale (Figure 54A ; WT,  $n=10$ ,  $1,03\pm 0,06$  mm;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=10$ ,  $1,12\pm 0,04$  ms ; NS) et libre (Figure 54A ; WT,  $n=10$ ,  $1,18\pm 0,18$  mm;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=10$ ,  $1,16\pm 0,07$  ms ; NS), ainsi que du diamètre de la cavité du VG (Figure 54A ; WT,  $n=10$ ,  $3,22\pm 0,23$  mm;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=10$ ,  $3,15\pm 0,29$  ms ; NS);

- une absence d'une dysfonction systolique (Figure 54B ; WT,  $n=10$ ,  $79\pm 3$  %;  $Bscl2^{-/-}$ ,  $n=10$ ,  $78\pm 2$  % ; NS);

- la présence d'une dysfonction diastolique avec des modifications du temps de relaxation isovolumétrique (Figure 54C ; WT,  $n=10$ ,  $14,8\pm 1,1$  ms ; Bsc12<sup>-/-</sup>,  $n=10$ ,  $17,5\pm 1,9$  % ; \* $p<0,05$  vs WT), du rapport de l'onde E sur A (Figure 54C ; WT,  $n=10$ ,  $1,26\pm 0,05$  ; Bsc12<sup>-/-</sup>,  $n=10$ ,  $1,03\pm 0,05$  ; \* $p<0,05$  vs WT) et du temps de décélération de l'onde E chez les animaux Bsc12<sup>-/-</sup> (Figure 54C ; WT,  $n=10$ ,  $30,6\pm 1,2$  ms ; Bsc12<sup>-/-</sup>,  $n=10$ ,  $37,2\pm 1,8$  ms ; \* $p<0,05$  vs WT).

### Effet des thiazolidinediones (TZD) sur les phénotypes métabolique et cardiaque des animaux déficients en seipine.

Précédemment, il a été décrit que la déficience en seipine altérait la différenciation adipocytaire de fibroblastes embryonnaires de souris. Dans la même expérience, ils avaient mis en évidence que l'activation pharmacologique du récepteur PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) par son ligand synthétique, la pioglitazone (TZD), rétablissait la capacité de différenciation adipocytaire des fibroblastes provenant d'embryons d'animaux Bsc12<sup>-/-</sup> (Prieur et al., 2013). Sur la base de cette expérience préliminaire des souris sauvages et Bsc12<sup>-/-</sup> âgées de 3 semaines, ont été traitées avec la pioglitazone pendant 9 semaines.



**Figure 55: Evaluations des effets d'un traitement de 9 semaines aux thiazolidinediones (TZD) sur les phénotypes métabolique et cardiaque d'animaux KO Bsc12.** **A**, Profil métabolique: évaluation de la masse du tissu adipeux mésentérique associée aux niveaux de sécrétion des adiponectines et de la leptine. **B**, Effet sur la stéatose hépatique. **C**, Quantification du rapport d'expression entre les gènes  $\beta$  et  $\alpha$ -MHC. **D**, Fonction diastolique: évaluation du rapport entre l'onde E et A, du temps de relaxation isovolumétrique, et du temps de décélération de l'onde E. (mâles,  $n=6-8$  par génotype; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  vs WT. # $p<0,05$ , ### $p<0,01$  vs Veh)(MHC: Myosin Heavy Chain; VG: Ventricule Gauche; TDE: Temps de décélération de l'onde E; TRIV: Temps de relaxation isovolumétrique; TZD: thiazolidinediones).

Au niveau du phénotype métabolique, le traitement à la TZD a amélioré le phénotype lipodystrophique en augmentant la masse de tissu adipeux mésentérique (*Figure 55A* ; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $192\pm 27$  mg ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $29\pm 14$  mg,  $**p<0,01$  vs *WT-Veh*; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $193\pm 22$  mg ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $90\pm 9$  mg,  $**p<0,01$  vs *WT-TZD*,  $^{\#}p<0,05$  vs *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*) et sous cutané, ainsi que les taux d'adiponectines (*Figure 55A* ; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $8,0\pm 0,6$   $\mu\text{g/ml}$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $0,81\pm 0,06$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $**p<0,01$  vs *WT-Veh* ; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $32,5\pm 6,2$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $^{\#}p<0,05$  vs *WT-Veh*; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $9,5\pm 2,4$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $**p<0,01$  vs *WT-TZD*,  $^{\#}p<0,05$  vs *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*) et de leptines (*Figure 55A* ; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $1,85\pm 0,31$  ng/ml ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $0,26\pm 0,06$  ng/ml,  $**p<0,01$  vs *WT-Veh*; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $0,93\pm 0,18$  ng/ml ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $0,72\pm 0,05$  ng/ml,  $^{\#\#}p<0,01$  vs *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*). Au niveau hépatique, le traitement améliore également la stéatose en ayant pour effet d'induire une normalisation de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse. Ceci se traduit par une normalisation de l'accumulation de triglycérides au niveau hépatique (*Figure 55B* ; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $0,022\pm 0,011$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $0,092\pm 0,025$ ,  $***p<0,001$  vs *WT-Veh* ; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $0,025\pm 0,012$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $0,035\pm 0,021$  ng/ml,  $^{\#}p<0,05$  vs *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*) (Prieur et al., 2013).

Au niveau du phénotype cardiaque, le traitement normalise totalement l'élévation transcriptomique du rapport  $\beta/\alpha$  des isoformes des MHC (*Figure 55C* ; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $0,022\pm 0,011$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $0,092\pm 0,025$ ,  $***p<0,001$  vs *WT*; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $0,025\pm 0,012$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $0,035\pm 0,021$  ng/ml,  $^{\#}p<0,05$  vs *Veh*).

En ce qui concerne la fonction diastolique, le traitement aux TZDs a permis la normalisation du temps de relaxation isovolumétrique (*Figure 55D*; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $18,1\pm 1,8$  ms ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $22,5\pm 0,4$  ms,  $*p<0,05$  vs *WT-Veh*; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $16,5\pm 0,4$  ms ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $15,3\pm 1,4$  ms,  $^{\#}p<0,05$  vs *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*) et du temps de décélération de l'onde E (*Figure 55D*; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $30,1\pm 2,3$  ms ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $38,4\pm 2,6$  ms,  $*p<0,05$  vs *WT-Veh*; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $29,2\pm 1,91$  ms ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $30,2\pm 2,3$  ms,  $^{\#}p<0,05$  vs *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*), mais n'a pas d'effet sur le rapport de l'onde E sur l'onde A (*Figure 55D*; *WT-Veh*,  $n=9$ ,  $1,27\pm 0,05$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-Veh*,  $n=8$ ,  $1,03\pm 0,04$ ,  $*p<0,05$  vs *WT-Veh*; *WT-TZD*,  $n=9$ ,  $1,24\pm 0,05$  ; *Bscl2<sup>-/-</sup>-TZD*,  $n=6$ ,  $1,05\pm 0,04$ ,  $*p<0,05$  vs *WT-TZD*). Ces données indiquent une réversion partielle de la dysfonction diastolique observée chez les animaux *Bscl2<sup>-/-</sup>* suite au traitement aux TZDs.

## Discussion

Ces données de caractérisation suggèrent que le modèle *Bscl2<sup>-/-</sup>* est un excellent modèle d'étude de la lipotoxicité présentant de nombreux points communs au niveau métabolique comme cardiaque avec les profils des patients atteints de la BSCL.

Au niveau du métabolisme lipidique cardiaque, la déficience en seipine conduit à une situation métabolique unique combinant une augmentation de la captation des VLDL associée à une augmentation du catabolisme lipidique. A ce jour, contrairement aux individus obèses, la présence de dépôts ectopiques de tissu adipeux n'est pas clairement décrite dans le myocarde des patients

lipodystrophiques et pourrait s'avérer être une cause potentielle de lipotoxicité cardiaque (Lupsa et al., 2010).

Suite à la caractérisation du modèle animal, la déficience en seipine semble être associée à une augmentation du stress oxydant cardiaque ayant pour conséquences des élévations de la nitration ainsi que de la carbonylation de protéines, pouvant modifier leur fonction. Le développement d'un stress oxydant est souvent associé avec un remodelage cardiaque, généralement hypertrophique (Burgoyne et al., 2012).

Au niveau de l'activité électrocardiographique, la déficience en seipine est associée à une altération de la repolarisation qui se traduit par une augmentation des intervalles QT comme QTc chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ , altération retrouvée chez certains patients lipodystrophiques (Lupsa et al., 2010). Des données préliminaires obtenues par un suivi en télémétrie ne montrent pas d'apparition spontanée de trouble du rythme chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ , bien qu'une augmentation de 20% de la repolarisation a été mesurée. Il pourrait s'avérer maintenant intéressant d'étudier une susceptibilité aux troubles du rythme dans des conditions de stress aigu avec notamment l'injection d'isoprénaline par voie intrapéritonéale, voir même lors de conditions de stress chronique, comme celles rencontrées lors d'une hypertension ou d'un infarctus du myocarde.

A la vue de nos premiers résultats, nous avons pu montrer que la déficience en seipine est associée à une dysfonction diastolique sans modification de la fonction systolique, ni structurale. A ce jour, aucune donnée échocardiographique n'a été rapportée pour les patients atteints de la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip. Dans la cardiomyopathie diabétique, qui présente des caractéristiques similaires avec notre modèle, il est classiquement décrit le développement d'une dysfonction diastolique du VG (Galderisi et al. 2006). En revanche, la fonction systolique, comme les épaisseurs de parois ou le diamètre de la cavité ventriculaire gauche ne sont pas altérées lors d'une déficience en seipine. A l'opposé, une augmentation de la gravimétrie cardiaque a été rapportée chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$ , ce qui est concordant avec les cardiomyopathies hypertrophiques décrites chez les patients BSCL (Lupsa et al., 2010). De plus, une augmentation du ratio  $\beta/\alpha$  des isoformes des MHC, un marqueur de remodelage pathologique, a aussi été observée au niveau transcriptomique. Il nous reste ainsi à définir les mécanismes du remodelage cardiaque mis en place chez les animaux  $Bscl2^{-/-}$  qui nous permettront de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques impliqués avec la lipotoxicité induite par la lipodystrophie.

Le traitement avec la pioglitazone s'est avéré être une approche très prometteuse. Par l'activation du tissu adipeux, malgré la quasi absence de ce dernier, ce traitement a pu induire l'expansion de ce tissu cible et conduire à des réversions totales du remodelage transcriptionnel cardiaque avec une normalisation du rapport  $\beta/\alpha$  des isoformes de la MHC, ainsi que de la stéatose hépatique.

Bien qu'aucune investigation électrocardiographique n'ait pu être effectuée à ce jour, les effets du traitement aux TZDs sur la repolarisation cardiaque des animaux déficients en seipine devront être évalués.

Maintenant, l'absence quasi totale du tissu ciblé peut être une des causes de la réversion partielle du phénotype métabolique observé chez les animaux *Bscl2<sup>-/-</sup>*. Parallèlement, la réversion partielle du phénotype cardiaque montre aussi que celui-ci pourrait ne pas être due seulement aux conséquences métaboliques associées à la déficience en seipine, mais être lié également à un rôle intrinsèque de la seipine au niveau cardiaque.

De manière intéressante, il a été récemment décrit une interaction entre la seipine et la pompe  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique SERCA chez la drosophile comme chez l'homme. Parallèlement, une altération de l'activité de la pompe SERCA a été associée à une surcharge calcique intracellulaire au niveau du tissu adipeux en présence de mutants pour la seipine (Bi et al., 2014). Or au niveau cardiaque, des altérations de l'homéostasie calcique sont connues comme étant une des causes de dysfonctions cardiaques systolique et diastolique. Comme nous avons mis en évidence une dysfonction diastolique chez les souris *Bscl2<sup>-/-</sup>*, avec une réversion partielle par le traitement aux TZDs, ces différentes observations suggèrent effectivement un rôle intrinsèque de la seipine au niveau du cœur. Bien que nos études moléculaires aient suggéré l'absence de toute modification d'expression transcriptionnelle pour la pompe SERCA2a, la question est loin d'être close. En effet, il est classiquement reconnu que les études de l'expression protéique de la SERCA2a sont plus pertinentes qu'une investigation transcriptionnelle. De plus, l'expression et les états de phosphorylation de son inhibiteur, le phospholamban, doivent être impérativement investigués afin d'évaluer l'homéostasie calcique cardiaque. Ces investigations protéiques n'ont pu être réalisées à ce jour à la vue des difficultés d'obtention des animaux. Ce travail, qui est en cours, permettra d'établir l'association entre de l'expression cardiaque de la seipine et ses rôles potentiels, notamment son interaction avec la pompe SERCA2a. De plus, les implications potentielles des autres acteurs de l'homéostasie calcique pourront être investigués. Ces résultats permettront d'identifier la ou les causes de la dysfonction diastolique décrites chez les souris *Bscl2<sup>-/-</sup>*.

## **Perspectives**

Enfin, dans un futur proche, de nouvelles investigations ont été programmées afin de caractériser l'ensemble du métabolome cardiaque et avoir, par RNASeq, une vision globale des variations d'expression génique observées chez les animaux *Bscl2<sup>-/-</sup>*. Cela permettra d'identifier des voies de signalisation impliquées et de découvrir des cibles thérapeutiques permettant de traiter les conséquences métaboliques et cardiovasculaires associées à la lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip et plus généralement aux cardiomyopathies associées à des mécanismes de lipotoxicité.

## IX- Discussion générale et conclusions

Mon doctorat s'est placé dans un contexte jusqu'à présent peu étudié de manière formelle avec l'étude d'association de causes congénitales et acquises de cardiomyopathies arythmiques et structurales. Notamment, l'objectif primaire de mes travaux de thèse a été de déterminer l'existence d'une prédisposition génétique à la survenue de troubles du rythme et à une différence éventuelle dans le remodelage cardiaque suite à un infarctus du myocarde chez des patients porteurs de mutations pour le gène SCN5A avec une perte de fonction du canal Nav1.5.

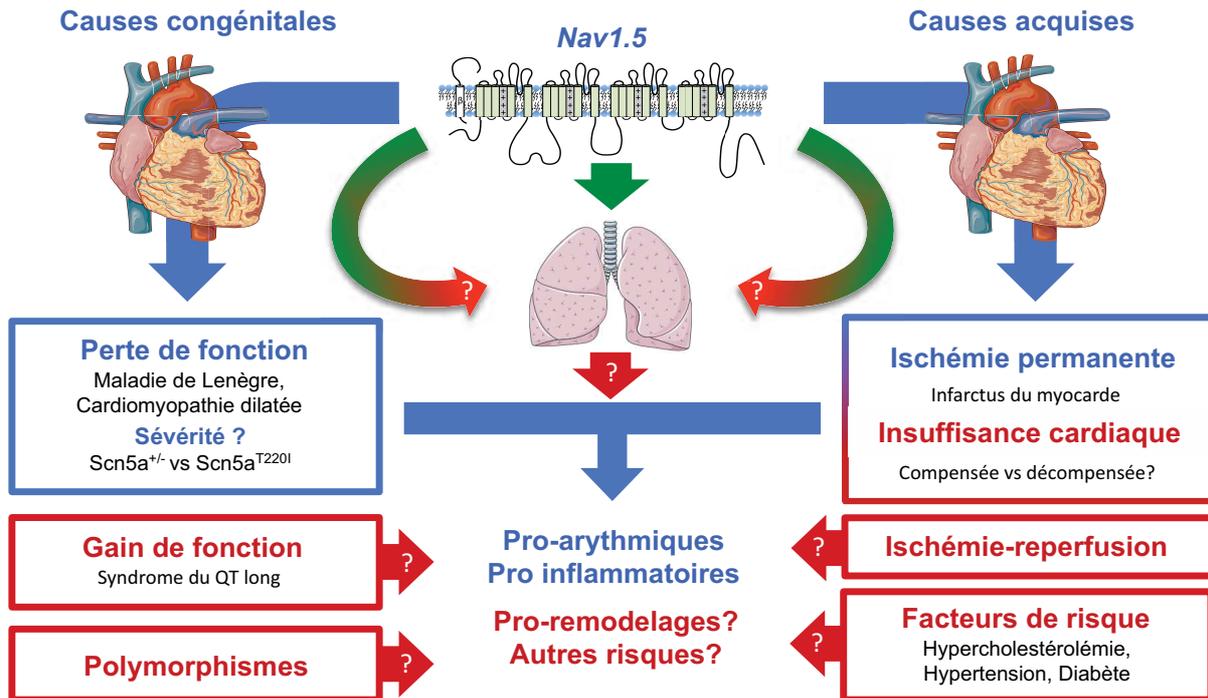


Figure 56: Conclusions et perspectives générales de mon doctorat.

Dans cette optique et au travers de mon travail de synthèse publié en 2013, j'ai pu acquérir, construire et transmettre une approche large et complexe sur la susceptibilité génétique associée au développement de pathologies telles que la mort subite et l'insuffisance cardiaque. Ce travail a permis d'exposer que l'altération de différents mécanismes allant du gène à la fonction pouvait être impliquée par l'expression de mutations ou de polymorphismes sur de nombreux gènes, autres que le gène SCN5A.

A partir d'une approche préclinique à l'aide du modèle murin d'inactivation à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A, j'ai pu mettre en évidence qu'une perte de fonction pour le canal sodique Nav1.5 prédisposait à la survenue de troubles du rythme ventriculaire au cours des 24 premières heures suite à un infarctus du myocarde non reperfusé par ligature permanente de l'artère coronaire descendante gauche. Ces résultats obtenus au cours de la phase aiguë de l'IDM concordent avec les quelques observations décrites chez l'homme notamment avec la mutation G400A

responsable d'une forte perte de fonction de l'activité du canal Nav1.5 dans un modèle cellulaire de réexpression (Hu et al., 2007 ; Oliva et al., 2009).

A 48 heures post-IDM, via le suivi télémétrique, l'altération de la conduction cardiaque décrite, initialement chez les animaux KOM par un élargissement du QRS, est conservée voir augmentée. En association avec ces données fonctionnelles, des diminutions plus importantes d'expression transcriptomique de la connexine 43 et de SCN5A ont été observées chez les animaux KOM après un IDM. Toujours au niveau transcriptomique, j'ai pu mettre en évidence un profil pro-inflammatoire plus important chez ces mêmes animaux. Ces données mettent en évidence l'existence d'un substrat pouvant avoir des conséquences pro-arythmogènes ou favorisant un remodelage cardiaque plus sévère au delà des premières 48 heures étudiées. Un certain nombre de ces données devront être complétées par des études biochimiques pour établir et renforcer la présence d'un tel substrat. La présence de ce profil pro-inflammatoire chez les animaux KOM pourrait être aussi une cause d'augmentation des événements de rupture cardiaque, événement dont l'incidence était dépendante non seulement de la taille de l'infarctus mais aussi du niveau d'inflammation post-IDM.

Les données préliminaires obtenues à 4 semaines post-IDM semblent suggérer la possibilité d'un remodelage plus sévère chez les animaux KOM. De futures investigations devront être réalisées pour valider cette observation au cours des différentes phases de l'insuffisance cardiaque, phases compensée et décompensée. Cependant l'utilisation actuelle de notre modèle murin *Scn5a*<sup>+/-</sup> sous le fond génétique Sv129 s'est avéré être une limite à cette étude. L'utilisation du modèle *Scn5a*<sup>+/-</sup> dérivé sur un fond pur C57Bl/6 est d'ors et déjà envisagé, malgré les différences de phénotypes mises en évidence entre les deux fonds génétiques, afin de réduire les pertes post opératoires dues au fort taux de rupture imputable au fond génétique Sv129.

A ce jour, toutes les données obtenues ont été réalisées à partir de la réalisation d'un infarctus non reperfusé suite à la ligature permanente de l'artère coronaire gauche descendante. Or, avec l'amélioration de la prise en charge hospitalière, de nombreux patients présentant un syndrome coronarien aigu vont être reperfusés à partir des différentes techniques d'interventions percutanées.

Donc, par la suite, il sera nécessaire de mettre en place une étude complémentaire chez les animaux *Scn5a*<sup>+/-</sup> avec la réalisation d'un protocole d'ischémie-reperfusion. Ainsi, nous pourrions avoir une vision plus globale et pertinente des effets d'une perte de fonction de Nav1.5 sur la survenue de troubles du rythme et de remodelages ventriculaires post ischémiques.

A l'opposé du modèle murin *Scn5a*<sup>+/-</sup> présentant des phénotypes clairement identifiables, la caractérisation de notre nouveau modèle murin de surexpression de la mutation humaine T220I a conduit à des difficultés d'études et d'interprétations des effets d'une mutation avec une perte modérée de fonction pour Nav1.5 dans un modèle animal comme la souris.

## *IX- Discussion générale et conclusions*

Les premiers résultats obtenus au niveau cardiaque mettent en évidence 1) une légère baisse du courant sodique chez les animaux T220I<sup>+/+</sup>, 2) une absence d'altération de la conduction cardiaque et 3) la présence d'une dysfonction diastolique chez les animaux T220I<sup>+/-</sup> et T220I<sup>+/+</sup> non renseignée par l'étude des patients porteurs de la mutation. Les études moléculaires semblent suggérer une régulation conduisant des augmentations des expressions de Nav1.5 et du facteur pro-fibrotique TGF- $\beta$ .

La caractérisation des patients présentant les phénotypes les plus sévères en présence de la mutation T220I étaient relativement âgés et ne présentaient pas d'atteinte coronarienne. De plus, les autres membres des familles investigués présentaient peu ou pas d'altération de la fonction et de la structure du cœur. Ces observations précédentes associées à nos résultats peuvent conduire à plusieurs éléments de discussions :

- 1) Comme dans le cas du modèle murin Scn5a<sup>+/-</sup> associé à la maladie de Lenègre, nous pourrions faire face à une pathologie associée à la mutation qui n'apparaît qu'au cours du vieillissement des individus porteurs de la mutation.

- 2) Cependant, le premier ne suffira sûrement pas à expliquer l'absence de phénotype non établi en présence de la mutation, car des membres de la famille de la tranche d'âge ou plus ne présentent pas d'atteinte alors qu'elles sont porteuses de la mutation. Donc, l'existence d'éléments modificateurs comme des polymorphismes ou des facteurs de risque peut être posée. En effet, au delà de l'expression de la mutation T220I pour le canal Nav1.5, la présence de tels éléments modificateurs pourrait conduire à une co association à l'origine du développement de la pathologie.

- 3) Dans la continuité de mon objectif primaire de doctorat, le modèle de surexpression de la mutation T220I pour le canal Nav1.5 pourrait apporter des données complémentaires sur la susceptibilité génétique au développement de troubles du rythme et de remodelages ventriculaires post-IDM. En effet, nous pourrions tester cette susceptibilité génétique de Nav1.5 en fonction de la sévérité de la perte de fonction. Comme décrit dans la publication de Derangeon et ses collaborateurs, la seule inhibition du courant sodique par la flécaïnide ne suffit pas à expliquer le phénotype observé chez les animaux Scn5a<sup>+/-</sup>. Cette dissociation entre activité et expression de Nav1.5 à la membrane des cardiomyocytes pourrait aussi conduire à des différences de réponses suite à un IDM.

- 4) La caractérisation de mutations conduisant à l'expression de phénotype modéré pourrait être difficile voir non concluante lorsqu'elles sont étudiées dans des espèces comme la souris dont la physiologie cardiaque est loin d'être en adéquation avec celle de l'homme. Dans ce cas, nous pourrions faire face à une limite des études de mutations chez la souris. L'avenir de ces études se placera peut-être dans le développement de nouveaux modèles transgéniques vers des espèces dont la physiologie sera plus proche de celle de l'homme, comme le porc.

Les études par pléthysmographie ont permis l'identification de phénotypes pulmonaires clairs et cohérents en fonction de l'hétérozygotie ou de l'homozygotie de la mutation T220I. Ces données montrent l'existence de sévérité de phénotype pour une même mutation en fonction de l'organe étudié.

Ceci met en évidence de nouvelles difficultés et perspectives d'études dans l'expression et la compréhension des phénotypes associées à la présence de mutation.

Malgré son manque de conservation au travers des espèces, nos identifications de l'expression et d'un rôle potentiel de Nav1.5 dans les poumons chez la souris pourraient s'avérer être un aspect intéressant à étudier dans le futur notamment au cours du remodelage post-IDM. Lors des études fonctionnelles, les différences observées entre le modèle murin *Scn5a<sup>+/-</sup>* et le modèle de surexpression de la mutation T220I laissent transparaître, comme au niveau cardiaque, d'une complexité du rôle pulmonaire de Nav1.5 en fonction de son expression à la membrane et de son activité. Dans le cadre du remodelage post-IDM, nous ne disposons d'aucune connaissance et d'aucun élément sur les implications du canal Nav1.5. Néanmoins, il sera intéressant d'étudier l'impact d'une perte de fonction de Nav1.5 et d'identifier les possibilités d'une synergie entre les remodelages cardiaques et pulmonaires suite à un IDM. A terme, une prédisposition génétique au niveau pulmonaire pourrait être mise en évidence et modifier ainsi le décours de l'insuffisance cardiaque chez les patients porteurs de mutations avec perte de fonction pour le gène *SCN5A*, au delà d'une prédisposition uniquement au niveau cardiaque. Cette prédisposition pourrait avoir lieu en présence de mutations avec perte ou gain de fonction pour le canal Nav1.5.

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés seulement à des pertes de fonction pour Nav1.5. Or, des données présentées au cours de l'introduction semblent aussi montrer qu'un gain de fonction pour le canal Nav1.5 puisse aussi conduire suite à un syndrome coronarien sévère à une prédisposition génétique au développement de troubles du rythme et à la mort subite chez des patients porteurs de mutations de *SCN5A*. Il serait aussi intéressant d'étudier l'impact de mutations de *SCN5A* associées à un gain de fonction pour Nav1.5 suite à un infarctus du myocarde. Ces études pourraient conduire à un profil de survenue et de type d'arythmie différent de celui observé lors de mutations avec perte de fonction. Cependant, il pourrait s'avérer primordial d'avoir connaissance des effets de cette classe de mutations pour prendre en charge efficacement les patients porteurs. A terme, comme décrit dans des conditions normales, les différentes altérations de Nav1.5 liées à la présence de mutations pourraient conduire à des différents profils de patients dont la susceptibilité aux troubles du rythme et aux remodelages post IDM pourrait être plus ou moins délétère. De plus, les prises en compte de polymorphismes et de facteurs de risque comme l'hypertension ou le diabète pourraient augmenter la complexité et la sévérité des complications post IDM.

**X- Annexe n°1: Publication de mon travail de synthèse portant sur les différents impacts fonctionnels de variations génétiques associées à l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme et la mort subite cardiaque.**



























## **XI- Annexe n°2: Papier caractérisation *Scn5a*<sup>+/-</sup> Derangeon et al.**

### **Age-dependent development of ventricular fibrosis in the *Scn5a*<sup>+/-</sup> mouse model is triggered by activation of TGF- $\beta$ pathways**

Mickael Derangeon,<sup>1-3\*</sup> Jérôme Montnach,<sup>1-3\*</sup> Cynthia Ore Cerpa,<sup>1-3</sup> Benoît Jagu,<sup>1-3</sup> Gilles Toumaniantz,<sup>1-3</sup> Christopher LH Huang,<sup>4</sup> William H. Colledge,<sup>4</sup> Andrew A Grace,<sup>4</sup> Isabelle Baró,<sup>1-3</sup> Flavien Charpentier<sup>1-3§</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

<sup>2</sup> CNRS, UMR6291, Nantes, F-44000 France

<sup>3</sup> Université de Nantes, Nantes, F-44000 France

<sup>4</sup> the Section of Cardiovascular Biology, Departments of Biochemistry and Physiology, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EG, United Kingdom

§ Address for correspondence:

Flavien CHARPENTIER

l'institut du thorax

Inserm UMR1087, CNRS UMR6291

IRS-UN, 8 quai Moncoussu

44007 Nantes cedex 1, France

E-mail: flavien.charpentier@inserm.fr

Tel. +33 228 08 01 10, Fax. +33 228 08 01 30

\* These authors contributed equally to this work

*En préparation pour soumission à Circulation Research*

#### **Abstract**

**Rationale.** Loss-of-function mutations in *SCN5A*, the gene encoding Nav1.5 Na<sup>+</sup> channel, have been associated with inherited progressive cardiac conduction disease (PCCD). We have previously shown

that *Scn5a* heterozygous knock-out (*Scn5a*<sup>+/-</sup>) mice represent a good model for PCCD. These mice are characterized by ventricular fibrotic remodeling with ageing which exacerbate conduction defects.

**Objective.** Our objectives were to identify the mechanisms linking Nav1.5 decreased expression and ventricular fibrotic remodeling. **Methods and results.** Wild-type and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice were followed from the age of 10 weeks to 60 weeks. Our study shows that myocardial interstitial fibrosis occurred in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice only after the age of 45 weeks. Fibrosis was triggered by the activation of TGF- $\beta$  pathway. Chronic pharmacological inhibition of TGF- $\beta$  receptors with GW 788388 in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice from the age of 45 weeks to the age of 60 weeks prevented the occurrence of fibrosis. Activation of TGF- $\beta$  signaling occurred in parallel with Cx43 remodeling. In order to discriminate the role of decreased Na<sup>+</sup> current from decreased sarcolemmal cell membrane expression of Nav1.5, WT mice were chronically treated with flecainide (50 mg/kg/day) from the age of 6 weeks to the age of 60 weeks. Flecainide treatment did not lead to TGF- $\beta$  pathway activation and fibrosis. **Conclusion.** Our results indicate that myocardial fibrosis secondary to a loss of Nav1.5 is triggered by TGF- $\beta$  signaling pathway and down-regulation of Cx43 expression. Those events are more likely secondary to the decrease in Nav1.5 sarcolemmal expression rather than the decreased Na<sup>+</sup> current *per se*.

**Key words:** Nav1.5, connexin 43, progressive cardiac conduction defects, fibrosis, TGF- $\beta$

## **Introduction**

Progressive Cardiac Conduction Disease (PCCD) is one of the major causes of pacemaker implantation in developed countries.<sup>1</sup> It is a slowly evolving lifespan disease that progressively affects cardiac conduction, leading ultimately to pacemaker implantation to prevent the risk of complete atrioventricular block and Stokes-Adams syncope. The disease was initially attributed to an age-related fibrotic degeneration of atrio-ventricular and/or ventricular conduction system.<sup>2</sup> There is no available pharmacological treatment to prevent the progression of the disease. There is thus a need to understand perfectly the pathophysiological mechanisms of the disease and to identify molecular targets involved in its early phases.

*SCN5A* was the first gene associated to PCCD.<sup>3</sup> Two other genes have also been related to the disease: *SCN1B*, which encodes one of the regulatory  $\beta$ -subunits of Nav1.5,<sup>4</sup> and *TRPM4*, which encodes a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable non selective cation channel.<sup>5,6</sup> Mutations of *SCN5A* gene lead to a loss of function and/or expression of its product, the cardiac sodium channel Nav1.5.<sup>7</sup> Since the haploinsufficiency is present early during development, the disease was thought to result from combined  $\text{Na}^+$  channel dysfunction and aging-related unknown process.<sup>7</sup> To understand the pathophysiology of PCCD, we studied a *Scn5a* heterozygous knockout (*Scn5a*<sup>+/-</sup>) mouse model<sup>8</sup> and showed that this model exhibits an age-related deterioration in conduction partly due to occurrence of ventricular fibrosis and remodeling of connexin 43 expression.<sup>9-11</sup> *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice thus appeared as a unique model to elucidate PCCD pathophysiological mechanisms and identify molecular targets for developing preventive treatments. Our previous studies have shown that *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice exhibited fibrotic remodeling around coronary vessels as early as 14-16 weeks of age and increased myocardial interstitial fibrosis, together with focal fibrosis, over 50 weeks.<sup>9-11</sup> The extent of fibrosis in old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice seemed to be linked to the severity of primary conduction defects: mice exhibiting the more severe QRS complex prolongation when young had more myocardial fibrosis when old. Moreover, 50% of old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with a severe phenotype exhibited spontaneous ventricular arrhythmias.<sup>9</sup> However, the kinetics of occurrence of myocardial interstitial and focal fibrosis were not clearly determined. This represents

crucial information to identify the molecular mechanisms linking Nav1.5 decreased expression to fibrosis.

In this context, the objectives of the present study were (1) to determine more precisely the kinetics of myocardial fibrotic remodeling, and (2) to identify its triggering molecular pathway(s). For this purpose, we combined electrocardiographic, echocardiographic, biochemical and immunohistological studies on wild-type and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice at the ages of 10, 20, 30, 45 and 60 weeks. Our study shows that myocardial fibrosis does not increase progressively with ageing but rather quite rapidly only after the age of 45 weeks, triggered by the activation of TGF- $\beta$  pathway. Our results also suggest that this process involves a combined decrease of Nav1.5 and connexin 43 expressions, rather than a decrease in Na<sup>+</sup> current *per se*.

## **Methods**

### ***Ethics Statement***

All the animal experiments were performed in the animal facility of Nantes University Health Research Institute (*Unité de Thérapeutique Expérimentale*) and the *institut du thorax* which have been accredited by the French Ministry of Agriculture. Experimental procedures were approved by the regional ethic committee (CEEA – Pays de la Loire).

### ***Electrocardiography***

All mice (129/Sv genetic background) were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) as previously described.<sup>10</sup> Mice were anaesthetized for ECG recording with etomidate (25 mg/kg i.p.). Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus, USA). Six-lead ECG was recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and later analysis (ECG Auto v3.2.0.2, EMKA Technologies). ECGs were analyzed as previously described.<sup>10</sup>

***Assessment of cardiac function by echocardiography***

Two-dimensional (2-D) echocardiography was performed on mice using a Vivid 7 Dimension ultrasonography (GE Healthcare) with a 14-MHz transducer. Mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories, USA). Anesthetic induction was achieved at 5% isoflurane for 2.5 to 3 min, and anesthesia was maintained at 2.5%. In order to observe a possible structural remodeling, the left ventricular end-systolic diameter and the free wall end-systolic thickness were measured during systole from long- and short-axis images obtained by M-mode echocardiography. Systolic function was further assessed by calculation of the ejection and shortening fractions. Transmitral flow measurements of ventricular filling velocity were obtained using pulsed Doppler, with an apical four-chamber orientation. Doppler-derived mitral deceleration time, the early diastolic (E), the late diastolic (A) and the ratio E/A were obtained to assess diastolic dysfunction. To avoid bias in the analysis, experiments were done and analyzed by members of our research team blinded to the genotype.

***Cardiac fibrosis remodeling investigations***

After excision from WT and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice (n=5 in each group), hearts were rinsed in saline solution, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and transverse sectioned at 5- $\mu$ m intervals. Hearts from placebo- (n=4) and flecainide-treated-mice (n=5) were snap-frozen in liquid nitrogen and sectioned at 6- $\mu$ m intervals (HM530, Microm Microtech France, France). Slices were hydrated in Tissue-Clear<sup>®</sup> (Sakura Finetek USA, Inc., CA), decreased alcohol bath and deionized water. Then, they were stained during 1 hour in 0.1% picosirius red solution (20 g of picric acid + 1 g of Sirius Red in 1 liter of deionized water, pH 2.0). Then slices were decolorized for precisely 2 minutes in 0.01 N HCl and dehydrated in increased alcohol bath and Tissue-Clear<sup>®</sup>. Sections were mounted in QPath Coverquick 3000 (Labonord SAS, France) and examined with a classic light microscope (Nikon Eclipse E-600 microscope with NIS-Elements BR v4.10 Software, Nikon, Japan). Semi quantitative assessment of fibrosis was determined based upon the extent of interstitial fibrosis. For each heart, 3 regions (apex, middle and base) have been observed and at least 20 pictures of each

region have been taken. Automatic analysis was performed using ImageJ software 1.45b (NIH Software).

### ***Cx43 Immunostaining***

For cryo-sections, hearts (n=4 in each group) were embedded in Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT<sup>™</sup> (Sakura Finetek USA, Inc.) and serially sectioned transversally to generate 6- $\mu$ m thick sections (Microm Microtech France). Sections were fixed in cold acetone for 10 minutes and permeabilized and blocked with blocking buffer containing 10% normal goat serum (NGS), 1% bovine serum albumin (BSA), 0.5% TritonX-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature. Then sections were washed with PBS, incubated for 2 hours with monoclonal mouse anti-Cx43 purchased from BD Transduction Laboratories at room temperature, washed again and incubated for 45 minutes with AlexaFluor<sup>®</sup> 568 (Life Technologies; 1:200) at room temperature. Both primary and secondary antibodies were diluted in Incubation Buffer containing 3% NGS, 1% BSA, 0.5% TritonX-100 in PBS. Sections were washed in PBS and mounted in Calbiochem<sup>®</sup> FluorSave<sup>™</sup> Reagent (Merck KGaA, Germany). Immunostained preparations were analyzed by confocal microscopy (Nikon A1 RSi with x60 NA 1.4 objective) to determine protein localization. Images resolution was 1024x1024 pixels (0.21  $\mu$ m/pixel). For each heart, 3 regions (apex, middle, base) have been observed and at least 10 large images have been taken per region. A large image corresponds to 3x3 images and results in a 615.7x615.7  $\mu$ m field. Automated quantifications were performed using Volocity<sup>®</sup> 6.1.1 software (PerkinElmer Inc., USA). A gap junctional plaque was defined as a cluster of 1  $\mu$ m<sup>2</sup> or more of contiguous pixels showing an immunoreactive signal.<sup>12</sup> Plaques were defined with a long axis oriented parallel (0 to 20 degrees) or perpendicular (21 to 90 degrees) to the orientation fiber. Plaques of a given direction were counted to establish the prevalence of Cx43 lateralization in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice *versus* WT.

### ***Western blot analysis***

Protein samples were prepared from the left ventricular free walls. Tissues were snap frozen in liquid nitrogen, homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mmol/L): NaCl, 100; Tris-HCl, 50;

EGTA, 1; 1% TritonX-100, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1; NaF, 50; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 (Roche Applied Science); and protease inhibitor mixture (1:100 dilution; Sigma P8640) (pH 7.4). Samples were sonicated, and centrifuged at 14,000 × g for 15 min at 4 °C. Total homogenate protein was determined using the Pierce™BCA Protein Assay Kit. Samples were prepared with 40 µg of total protein, 2 µl of NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen), 5 µl of NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) and boiled during 3 min. Samples were run on 10% or 4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-rad) and transferred on Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-rad). Membranes were blocked and incubated with primary antibodies targeted against Nav1.5 (ASC-005, Alomone Labs; 1:1000), TGF-β, CTGF and SPARC (respectively Sc-7892, Sc-14939 and Sc-25574, Santa Cruz Biotechnology; 1:500), Connexin 43 (C610061, BD Transduction Lab.; 1:1000), SMAD2/3 and P-SMAD2/3 (07408 and AB3849 Merck Millipore; 1:500). In addition, anti-GAPDH antibody (Santa-Cruz Biotechnologies; 1:5000) was used as external/internal control. Next, membranes were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody (sc-2055, sc-2054 and sc-2922 Santa Cruz; 1:5000). Incubation was followed by detection using chemiluminescence (Clarity™ Western ECL Substrate, ChemiDoc™ MP System Bio-rad). Western-blot quantification was performed with Image Lab™ Software (Bio-rad) and normalized to GAPDH and stain-free.<sup>13</sup>

#### ***In vivo treatments with flecainide and GW 788388***

For flecainide, wild-type mice with 129/Sv genetic background were used at the age of 6 weeks. Mice were chronically treated orally (drinking water) with the Na<sup>+</sup> channel inhibitor flecainide at 50 mg/kg/day from the age of 6 weeks to the age of 20, 30 and 60 weeks.

For GW 788388, *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice were used at the age of 45 weeks and were treated orally chronically until the age of 60 weeks at a dose of 5 mg/kg/day.

#### ***Determination of myocardial Matrix Metalloproteinase activity by zymography***

For these experiments 40 µg of total protein samples for western were diluted in loading buffer containing: 1 M Tris pH 6.8, 10% SDS and 50% Glycerol. Samples were run on 10% Ready Gel®

Zymogram Precast Gels (Bio-Rad). Gels were washed four times in Triton 2.5% and then four times in milliQ water. Then the gel was incubated 48 hours at 37°C in Zymogram Development Buffer (Bio-Rad) follow by a gel staining in Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining solution kit (Bio-Rad). The gel was bleached for two hours in a buffer containing 20% isopropanol and 10% acetic acid. Bleaching was followed by detection and quantification using respectively ChemiDoc™ MP System and Image Lab™ Software (Bio-Rad).

### ***Statistics***

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistically significant differences between mean values were determined with either Mann-Whitney U test for comparison of two groups. Statistical analysis was made with Prism5 (GraphPad Software, Inc). For more than two groups, 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed with Bonferroni or Dunns post-test when appropriate. A P value of 0.05 was considered to indicate significance.

## Results

As in our previous study,<sup>9</sup> *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice were separated in two groups based on the QRS complex duration measured at the age of 9-11 weeks: one group with a mild QRS prolongation (QRS ≤ 18 ms; "mild") and one group with a severe phenotype (QRS > 18 ms; Suppl. fig. 1; "severe").

### *Kinetics of cardiac structural remodeling in Scn5a<sup>+/-</sup> mice*

As shown in figure 1, ventricular interstitial fibrosis in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice appeared rapidly between the age of 45 weeks and 60 weeks. Up to 45 weeks, there was no significant difference between wild-type and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. The amount of fibrosis in 60-week-old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with severe conduction defects was slightly, albeit not significantly, higher than in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with mild QRS complex prolongation. Development of fibrosis at the age of 60 weeks was associated with a mild left ventricular dilation in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with severe QRS complex prolongation resulting in a moderate decrease in contractile function as assessed with echocardiography (Fig. 2). In contrast, at 16 weeks old, *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with severe QRS prolongation exhibited a mild ventricular hypertrophy, leading to a slight but significant increase in contractility. Diastolic function was not altered.

### *Fibrosis development in Scn5a<sup>+/-</sup> mice parallels connexin 43 remodeling*

As shown in figure 3A, ageing was associated with changes in ventricular expression of connexin 43 (Cx43). Indeed, up to 45 weeks, Cx43 expression remained relatively stable. But in older mice, Cx43 expression was markedly reduced (by 57% at 60 weeks *versus* 30 weeks). *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice showed an increased expression of Cx43 compared to wild-type mice (Fig. 3B). As in wild-type mice, expression was stable up to 45 weeks (data not shown) and decreased between 45 and 60 weeks. This decrease in expression was larger than in wild-type mice, so that there was no more difference at 60 weeks between the two phenotypes (Fig. 3B). Immunohistological studies confirmed these results (Fig. 3C and 3D, left panel). However, the size and sarcolemmal distribution of Cx43 plaques in young *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice were different than in age-matched wild-type mice. Indeed, in 30-week-old wild-type mice, Cx43

plaques located at the intercalated discs were bigger than those located at the lateral membranes (Fig. 3D, middle left panel). In 30-week-old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, Cx43 plaques located at the intercalated discs failed to aggregate and were smaller than in wild-type mice. The size of Cx43 plaques located at the lateral membranes was also decreased but to a lesser extent, so that there was no difference between intercalated disks and lateral membranes. At the age of 60 weeks, the size of Cx43 plaques located at both intercalated disks and lateral membranes in wild-type mice decreased markedly to values similar to those observed for *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 3D, middle right panel). As shown in the right panel of figure 3D, the distribution of Cx43 between intercalated disks and lateral membranes was similar in all groups.

***Fibrotic remodeling is triggered by the activation of TGF-β pathway***

In order to decipher the pathophysiological pathway(s) involved in fibrosis remodeling, we investigated the left ventricular expression of proteins previously shown to be involved in fibrotic remodeling in other pathological models: MMP2 (Matrix Metalloproteinase), CTGF (Connective Tissue Growth Factor), TGF-β (Transforming Growth Factor β) and SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine). We had previously shown that the severity of QRS prolongation in 10-week-old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice was related to the level of expression of Nav1.5: mice with a severe QRS prolongation had a lower expression of Nav1.5 than mice with a mild QRS prolongation.<sup>9</sup> The present study confirms this result and shows that the difference in Nav1.5 between the two phenotypes persisted over time, although differences did not reach statistical significance (Fig. 4). At the ages of 10 and 20 weeks, these proteins were expressed at similar levels in wild-type and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice (data not shown). At 30 weeks, there was an increase in CTGF and SPARC expression in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, which was larger in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with a severe phenotype than in those with mild QRS prolongation (Fig. 4). CTGF and SPARC expression was further increased but the differences between the mild and severe phenotypes disappeared. At 30 weeks, there was also an increased activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases of 72 kDa in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice of both phenotypes, demonstrating an increase in MMP2 activity. This over-activity disappeared over time (Suppl. Fig.2). At the age of 45 weeks, there was an increased expression of TGF-β in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, which did not differ between the two

phenotypes. As expected, there was a concomitant increased expression of the phosphorylated form of Smad2/3, a well known downstream effector of the TGF- $\beta$  pathway, without any variation of total Smad2/3 expression (Fig. 4). These results suggest that fibrotic remodeling depends on the activation of TGF- $\beta$  pathway. In order to confirm this hypothesis, we treated *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice chronically from the age of 45 weeks to the age of 60 weeks with an antagonist of the TGF- $\beta$  receptor, the GW 788388. As shown in figure 5A, *Scn5a*<sup>+/-</sup> treated with GW 788388 did not show any sign of fibrotic remodeling at the age of 60 weeks, thus confirming our hypothesis. Interestingly, the treatment with GW 788388 induced a decrease in TGF- $\beta$  expression. This however is quite anecdotic in the present context since normal levels of TGF- $\beta$ , as seen in WT mice did not induce abnormal fibrosis. Altogether, the experiments performed with GW 788388 support our hypothesis that fibrotic remodeling in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice involved activation of TGF- $\beta$  pathway.

#### ***Chronic inhibition of Nav1.5 does not induce fibrotic remodeling***

*Scn5a*<sup>+/-</sup> mice are characterized by both a decreased expression of Nav1.5 at the membrane<sup>9</sup> and, as a consequence, a decreased Na<sup>+</sup> current.<sup>9</sup> In order to investigate whether decreasing the Na<sup>+</sup> current without alteration of Nav1.5 expression could induce a structural remodeling, we treated wild-type mice with flecainide chronically from the age of 6 weeks to the age of 60 weeks. As shown in figure 6, flecainide induced a marked prolongation of QRS complex to values close to those observed in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with a mild phenotype (Fig. 6A). As observed in this latter group, no ventricular dilatation was observed in 60-week-old mice treated with flecainide (Fig. 6B). But in contrast to this group of *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, there was no more fibrosis in mice treated chronically with flecainide than in mice treated with the placebo (Fig. 6C). This result is consistent with the observation that chronic flecainide did not induce an increase in TGF- $\beta$  or CTGF expression (Fig. 6D). There was also no change in Nav1.5 and Cx43 expression. Altogether, these results suggest that a decrease in Na<sup>+</sup> current is not enough *per se* to induce fibrotic remodeling.

## Discussion

This study shows (1) that myocardial interstitial and focal fibrosis in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice increases only after the age of 45 weeks, (2) that this fibrotic remodeling is triggered by TGF- $\beta$  signaling; (3) that this process is associated with Cx43 remodeling; (4) that the decrease in Na<sup>+</sup> current *per se* is not sufficient to induce fibrosis, and (5) that pharmacological inhibition of TGF- $\beta$  type I and type II receptors prevent the occurrence of fibrosis in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, offering new therapeutic opportunities.

***Myocardial fibrotic remodeling in Scn5a*<sup>+/-</sup> *mice is triggered by TGF- $\beta$ .*** The current study adds to previous studies on *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice have been shown to present conduction defects at atrial, atrioventricular and ventricular levels.<sup>8-10</sup> They also exhibit sinus node dysfunction.<sup>14</sup> One interesting feature of this model is the progressiveness of ventricular conduction defects with aging as observed on surface ECG<sup>9,10</sup> and activation mapping on Langendorff-perfused hearts,<sup>11</sup> reflecting in some aspects the clinical phenotype of patients with inherited *SCN5A*-related PCCD.<sup>15</sup> This age-dependent deterioration of ventricular conduction was associated with the occurrence of fibrosis in ventricular myocardium. This was the first demonstration that cardiac fibrosis could be the final outcome of an ionic channel defect.<sup>10,11</sup> In the present study, one of our objectives was to determine more precisely the timeline of fibrosis occurrence with a focus on interstitial myocardial fibrosis, which seems to be the most important for reducing global ventricular conduction.<sup>16,17</sup> We had previously shown that increased perivascular fibrosis could be detected in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice as early as 14-16 weeks of age,<sup>10</sup> but that myocardial fibrosis could be detected only in old (50-80 weeks) mice.<sup>9,10</sup> The present study shows that myocardial fibrosis does not increase progressively with age but appears only after the age of 45 weeks, an age characterized by two other phenomena, as discussed below: the activation of TGF- $\beta$  signaling pathway and a down-regulation of Cx43 expression.

Our second objective was to determine the pathophysiological pathway(s) involved in fibrosis development. The increase in cardiac fibrosis can result from an increase in collagen gene expression or from a decrease in the breakdown of collagen fibers, which is regulated by different

metalloproteinases (MMPs).<sup>18,19</sup> Our study shows that ventricular expression of fibrotic factors in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice is altered as early as 30 weeks. Indeed, there was an increase in CTGF and SPARC expression. Both proteins have been shown to play a key role in fibrosis development.<sup>20,21</sup> Surprisingly though, no increase in myocardial fibrosis was detected at this age. Because fibrosis results from a balance between collagen synthesis and degradation, we looked for MMP2 activity, known to be involved in collagen degradation. Interestingly, at 30 weeks, we observed an increase in MMP2 activity. This increase of MMP2 activity, which has been linked to CTGF,<sup>22</sup> could lead to an increased collagen turnover, as reported in patients with cardiac conduction defects,<sup>23</sup> and limit fibrosis development. At 45 weeks, MMP2 activity decreased to levels similar than in wild-type mice. At the age, the main event was a large increase in TGF- $\beta$  expression in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, leading to an activation of its canonical pathway as shown by the increase in phospho-smad2/3 expression. There was also a further increase in CTGF and SPARC expression. CTGF is known to be regulated by TGF- $\beta$  pathway.<sup>24-26</sup> SPARC is an upstream regulator of CTGF activated through TGF- $\beta$  pathway and might further limit collagen association with cell surfaces enhancing collagen deposition and formation of mature, insoluble collagen fibers.<sup>27</sup> Altogether, these events are expected to trigger fibrosis development. Although minor fibrotic factors are increased before observation of fibrosis, TGF- $\beta$  signaling appears as the major fibrotic factor involved in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. Hao *et al.* showed that fibrosis associated with sodium channel deficiency in the sinoatrial node of *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice also involved TGF- $\beta$  signaling.<sup>28</sup> A link between a Na<sup>+</sup> channel and TGF- $\beta$  has also been observed in rat primary myotubes. In this model, an increase in TGF- $\beta$  transcription pathway has been described after a 50% reduction of the sodium current, and inversely the expression of the TGF- $\beta$  receptor is decreased when the Na<sup>+</sup> channel expression is up-regulated.<sup>29</sup> Our study with flecainide chronic treatment suggests that a decrease in Na<sup>+</sup> current is not sufficient to explain by itself the activation of TGF- $\beta$  pathway and fibrosis development as observed in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. One could argue that the treatment with flecainide was started in 6-week-old mice whereas the loss in Nav1.5 expression in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice plays a key role as early as day 10.5 in the embryo.<sup>8</sup> However, abnormal prenatal and/or postnatal cardiac development does not seem to be involved in the activation of TGF- $\beta$  pathway and fibrosis since those occur only in mice older than 45 weeks. *In vitro* Nav1.5-E3 antibody has been shown to increase TGF-

$\beta$  production by both cardiomyocytes and fibroblasts. This effect was not only associated with a 50% decrease in  $\text{Na}^+$  current, but also with a 20% decrease in Nav1.5 expression.<sup>28</sup> Therefore, one explanation to connect Nav1.5 haploinsufficiency and increased TGF- $\beta$  signaling could be through Nav1.5 interacting proteins. This is consistent with formation of multiprotein complexes through which Nav1.5 may exert a regulatory role in cellular biological processes in addition to its electrophysiological function.<sup>30</sup> Although the detailed mechanistic link between disruption of Nav1.5 and TGF- $\beta$  secretion needs further investigation, our findings have important implication for possible mechanisms underlying correlation between Nav1.5 membrane expression and cardiac remodeling.

***Fibrotic process in  $\text{Scn5a}^{+/-}$  mice involves Cx43 remodeling.***

Our study also shows that Cx43 expression is altered in  $\text{Scn5a}^{+/-}$  mice in association with fibrotic remodeling. In  $\text{Scn5a}^{+/-}$  mice younger than 45 weeks, prior to activation of TGF- $\beta$  pathway, Cx43 expression is increased compared to wild-type mice. After 45 weeks, when TGF- $\beta$  expression is increased and triggers fibrotic remodeling, Cx43 expression decreases. This down-regulation does not result from TGF- $\beta$  pathway activation since it also occurs in wild-type mice. It is more likely the result of a physiological process linked to ageing. However, there seems to be a close relationship between Cx43 and fibrosis. In a previous study, we had reported that expression of Cx43 was decreased in  $\text{Scn5a}^{+/-}$  mice more particularly in regions with marked fibrosis.<sup>11</sup> In human also, fibrotic hearts are commonly hallmarked by a decrease in Cx43 expression.<sup>31-33</sup> It has been recently proposed that a reduction of Cx43 expression triggers fibrosis development in aging or pressure overloaded mouse hearts.<sup>34</sup> Inversely, the activity of TGF- $\beta$  has been shown to be positively regulated by Cx43.<sup>35</sup> This effect seems to involve microtubules. Indeed, Dai *et al.*, showed that TGF- $\beta$ -induced transcriptional activity was abolished by knockdown of the endogenous Cx43 activity in HL-1 cardiomyocytes and suggested that the translocation of Smad2/3 and Smad4 from the cytoplasm to the nucleus is mediated by Cx43 competition with Smad2/3 for binding to microtubules.<sup>36</sup> In a recent study of a mouse model of cardiac hypertrophy due to overexpression of a constitutively active form of calcineurin A, the authors observed a decreased expression of Cx43 and Nav1.5 before the development of hypertrophy

and fibrosis. However, despite the decrease in total Cx43 expression, the expression of the non-phosphorylated form of Cx43 was increased.<sup>37</sup> Non-phosphorylated Cx43 have been linked to loss of Cx43 aggregation in functional connexons.<sup>38-40</sup> Interestingly, our study indicates that Cx43 organization is altered in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice, Cx43 plaques appear to be smaller than in wild-type mice. We could hypothesize that Cx43 phosphorylation is decreased in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice leading to a loss of aggregation into gap junctions and consequently to an increase in free Cx43 able to activate TGF- $\beta$  pathway through microtubule interaction. One other hypothesis might implicate cardiac fibroblasts, which are known to play a key role in TGF- $\beta$ -induced fibrotic process.<sup>41</sup> Zhang *et al.*, showed that cardiac fibroblasts express Cx43 and that a reduction of Cx43 expression lead to an increase in fibroblast proliferation.<sup>42</sup> Interestingly, Nav1.5 has been shown to interact with Cx43<sup>43</sup> particularly around the perinexus<sup>44</sup> and Cx43 knock-out mice show a decreased expression of Nav1.5.<sup>45</sup> Our results confirm the close relation between Nav1.5 and Cx43 expression and organization. Further studies are needed to understand the cooperative relationship between these two major actors of cardiac conduction in the context of cardiac fibrosis.

#### ***TGF- $\beta$ receptor inhibition: a new therapeutic perspective for PCCD?***

In order to demonstrate TGF- $\beta$  implication into fibrotic process, we used GW 788388, a specific inhibitor of both type I and type II TGF- $\beta$  receptors.<sup>46,47</sup> Tan *et al.* showed that GW 788388 significantly reduced TGF- $\beta$  activity and led to a reduction of ventricular remodeling and systolic dysfunction in a rat model of myocardial infarction.<sup>48</sup> It was also shown to prevent cardiac fibrosis in a mouse model of Chagas disease.<sup>49</sup> Interestingly, in this study, GW 788388 also prevented the down-regulation of Cx43 expression.<sup>49</sup> In our study, we observed that a 15-week treatment with GW 788388 prevented fibrotic development in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. This result not only confirms TGF- $\beta$  pathway implication in fibrotic process in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice but also paves the way to new therapeutic approaches for treating PCCD.

In conclusion, the present data show that ageing-related ventricular fibrotic process in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice is linked to TGF- $\beta$  signaling and activation of this pathway occur if and only if Nav1.5 membrane expression is reduced. This study provides experimental grounds to support that Nav1.5 forms multiproteins complexes with Nav1.5-interacting proteins. Through these complexes, which might implicate Cx43, Nav1.5 may exert a regulatory role in cellular biological processes additional to beyond its electrical function.

### **Acknowledgements**

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No HEALTH-F2-2009-241526, EUTrigTreat. It was also supported by grants from the *Agence Nationale de la Recherche* (grant No ANR-12-BSV1-0013-01) and the *Genavie* foundation. The authors wish to thank Agnès Carcouet, Aurore Girardeau and Stéphanie Lemarchand for their expert technical assistance.

## References

1. Mond HG, Proclemer A. The 11th world survey of cardiac pacing and implantable cardioverter-defibrillators: calendar year 2009--a World Society of Arrhythmia's project. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2011;34:1013–1027.
2. Lenègre J, Moreau P. [CHRONIC AURICULO-VENTRICULAR BLOCK. ANATOMICAL, CLINICAL AND HISTOLOGICAL STUDY]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1963;56:867–888.
3. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AAM, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet.* 1999;23:20–21.
4. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott J-J, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld ACP, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AAM, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *Journal of Clinical Investigation.* 2008;118:2260–2268.
5. Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O. Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *Journal of Clinical Investigation.* 2009;119:2737–2744.
6. Liu H, Zein El L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Mégarbané A, Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O, Bouvagnet P. Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics.* 2010;3:374–385.
7. Probst V. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:643–652.
8. Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AEO, Huang CLH, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:6210–6215.
9. Leoni A-L, Gavillet B, Rougier J-S, Marionneau C, Probst V, Le Scouarnec S, Schott J-J, Demolombe S, Bruneval P, Huang CLH, Colledge WH, Grace AA, Le Marec H, Wilde AAM, Mohler PJ, Escande D, Abriel H, Charpentier F. Variable Nav1.5 Protein Expression from the Wild-Type Allele Correlates with the Penetrance of Cardiac Conduction Disease in the Scn5a<sup>+/-</sup> Mouse Model. *PLoS ONE.* 2010;5:e9298.
10. Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni A-L, Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation.* 2005;111:1738–1746.
11. van Veen TAB, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CLH, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JMT, van Rijen HVM. Impaired impulse propagation in Scn5a-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin

- expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation*. 2005;112:1927–1935.
12. Chkourko HS, Guerrero-Serna G, Lin X, Darwish N, Pohlmann JR, Cook KE, Martens JR, Rothenberg E, Musa H, Delmar M. Remodeling of mechanical junctions and of microtubule-associated proteins accompany cardiac connexin43 lateralization. *Heart Rhythm*. 2012;9:1133–1140.e6.
  13. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to  $\beta$ -actin for Western blots. *Anal Biochem*. 2013;440:186–188.
  14. Lei M, Goddard C, Liu J, Leoni A-L, Royer A, Fung SS-M, Xiao G, Ma A, Zhang H, Charpentier F, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA, Huang CLH. Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J Physiol (Lond)*. 2005;567:387–400.
  15. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baró I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081–3086.
  16. de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Tasseron S, Vermeulen JT, de Jonge N, Lahpor JR. Slow conduction in the infarcted human heart. “Zigzag” course of activation. *Circulation*. 1993;88:915–926.
  17. Tusscher Ten KHWJ, Panfilov AV. Influence of diffuse fibrosis on wave propagation in human ventricular tissue. *Europace*. 2007;9 Suppl 6:vi38–45.
  18. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, Tannhäuser R, Kühl U, Schultheiss HP. Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res*. 1998;37:123–129.
  19. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, D'Alessandro G, Cacace A, Ciampi Q, Chiariello M. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;108:1455–1460.
  20. Atorrasagasti C, Aquino JB, Hofman L, Alaniz L, Malvicini M, Garcia M, Benedetti L, Friedman SL, Podhajcer O, Mazzolini G. SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- $\beta$ 1 and PDGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300:G739–48.
  21. Au CG, Butler TL, Sherwood MC, Egan JR, North KN, Winlaw DS. Increased connective tissue growth factor associated with cardiac fibrosis in the mdx mouse model of dystrophic cardiomyopathy. *Int J Exp Pathol*. 2011;92:57–65.
  22. Yang M, Huang H, Li J, Huang W, Wang H. Connective tissue growth factor increases matrix metalloproteinase-2 and suppresses tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 production by cultured renal interstitial fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2007;15:817–824.
  23. Bozkaya YT, Aydin HH, Celik HA, Kayikcioglu M, Payzin S, Kultursay H, Aydin M, Yesil M, Can LH, Hasdemir C. Increased myocardial collagen turnover in patients with progressive cardiac conduction disease. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008;31:1284–1290.
  24. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- $\beta$  in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1805–1819.

25. Dendooven A, Gerritsen KG, Nguyen TQ, Kok RJ, Goldschmeding R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) ELISA: a novel tool for monitoring fibrosis. *Biomarkers*. 2011;16:289–301.
26. Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D. Cooperative interaction of CTGF and TGF- $\beta$  in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:4.
27. McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: Fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:544–549.
28. Hao X, Zhang Y, Zhang X, Nirmalan M, Davies L, Konstantinou D, Yin F, Dobrzynski H, Wang X, Grace A, Zhang H, Boyett M, Huang CLH, Lei M. TGF- $\beta$ 1-mediated fibrosis and ion channel remodeling are key mechanisms in producing the sinus node dysfunction associated with SCN5A deficiency and aging. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2011;4:397–406.
29. Ugarte G, Brandan E. Transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling is regulated by electrical activity in skeletal muscle cells. TGF-beta type I receptor is transcriptionally regulated by myotube excitability. *J Biol Chem*. 2006;281:18473–18481.
30. Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:2–11.
31. Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennell DJ, Fox K, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle. *Circulation*. 1998;97:651–660.
32. La Vecchia L, Ometto R, Bedogni F, Finocchi G, Mosele GM, Bozzola L, Bevilacqua P, Vincenzi M. Ventricular late potentials, interstitial fibrosis, and right ventricular function in patients with ventricular tachycardia and normal left ventricular function. *Am J Cardiol*. 1998;81:790–792.
33. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klövekorn W-P, Bauer EP, Schaper J. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem*. 2003;242:135–144.
34. Jansen JA, van Veen TAB, de Jong S, van der Nagel R, van Stuijvenberg L, Driessen H, Labzowski R, Oefner CM, Bosch AA, Nguyen TQ, Goldschmeding R, Vos MA, de Bakker JMT, van Rijen HVM. Reduced Cx43 Expression Triggers Increased Fibrosis Due to Enhanced Fibroblast Activity. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2012;5:380–390.
35. Hirschi KK, Burt JM, Hirschi KD, Dai C. Gap junction communication mediates transforming growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circ Res*. 2003;93:429–437.
36. Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu T. Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol Biol Cell*. 2007;18:2264–2273.
37. Fontes MSC, Raaijmakers AJA, van Doorn T, Kok B, Nieuwenhuis S, van der Nagel R, Vos MA, de Boer TP, van Rijen HVM, Bierhuizen MFA. Changes in Cx43 and NaV1.5 expression precede the occurrence of substantial fibrosis in calcineurin-induced murine cardiac hypertrophy. *PLoS ONE*. 2014;9:e87226.

38. Laird DW, Puranam KL, Revel JP. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J.* 1991;273(Pt 1):67–72.
39. Johnson KE, Mitra S, Katoch P, Kelsey LS, Johnson KR, Mehta PP. Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2013;24:715–733.
40. Solan JL, Lampe PD. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett.* 2014;588:1423–1429.
41. Leask A. TGFbeta; cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res.* 2007;74:207–212.
42. Zhang Y, Kanter EM, Laing JG, Aprhys C, Johns DC, Kardami E, Yamada KA. Connexin43 Expression Levels Influence Intercellular Coupling and Cell Proliferation of Native Murine Cardiac Fibroblasts. *Cell Commun Adhes.* 2008;15:289–303.
43. Malhotra JD. Tyrosine-phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel 1 Subunits Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279:40748–40754.
44. Rhett JM, Ongstad EL, Jourdan J, Gourdie RG. Cx43 Associates with Na(v)1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus. *J Membr Biol.* 2012;245:411–22.
45. Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, de Jong S, van der Nagel R, Hund TJ, Mohler PJ, Vos MA, van Veen TA, de Bakker JM, Delmar M, van Rijen HV. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm.* 2012;9:600–607.
46. Gellibert F, de Gouville A-C, Woolven J, Mathews N, Nguyen V-L, Bertho-Ruault C, Patikis A, Grygielko ET, Laping NJ, Huet S. Discovery of 4-{4-[3-(Pyridin-2-yl)-1 H-pyrazol-4-yl]pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2 H- pyran-4-yl)benzamide (GW788388): A Potent, Selective, and Orally Active Transforming Growth Factor-β Type I Receptor Inhibitor. *J Med Chem.* 2006;49:2210–2221.
47. Petersen M, Thorikay M, Deckers M, van Dinther M, Grygielko ET, Gellibert F, de Gouville AC, Huet S, Dijke ten P, Laping NJ. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-β type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int.* 2007;73:705–715.
48. Tan SM, Zhang Y, Connelly KA, Gilbert RE, Kelly DJ. Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H1415–H1425.
49. de Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige J-J, Bailly S, Waghahi MC. Oral Administration of GW788388, an Inhibitor of Transforming Growth Factor Beta Signaling, Prevents Heart Fibrosis in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1696.

## Figure legends

**Figure 1. Fibrosis development with age in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice.** **A.** Representative left ventricular sections stained with picosirius red from 10-60 week-old wild-type mice (WT) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with mild and severe phenotype. Scale bar: 50  $\mu$ m. **B.** Quantification of fibrosis (% of collagen per histological section) as a function of age. Means  $\pm$  sem of 5 mice per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus WT.

**Figure 2. Assessment of cardiac function by echocardiography performed on 16-week-old and 60-week-old wild-type (WT) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice.** The structural remodeling and the systolic and diastolic functions were assessed respectively by Two-dimensional (2-D) echocardiography and pulsed Doppler (For 16 weeks-old mice: WT n=23, *Scn5a*<sup>+/-</sup> mild n=10 and *Scn5a*<sup>+/-</sup> severe n=12; For 60 weeks old: WT n=6, n for *Scn5a*<sup>+/-</sup> mild n=7 and *Scn5a*<sup>+/-</sup> severe n= 6; \* $p < 0.05$ , data are expressed as mean  $\pm$  SEM).

**Figure 3. Connexin43 (Cx43) remodeling in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice.** **A.** Cx43 ventricular expression as a function of age in wild-type (WT) mice. **B.** Cx43 ventricular expression in 30- and 60-week-old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. Top, representative western blots; bottom, corresponding quantification of Cx43 expression was performed on Western blots from 6 mice per group by normalizing the intensities of the Cx43 bands to the GAPDH bands. \*\*  $p < 0.01$  versus 20, 30 and 45 weeks; \*\*\* $p < 0.001$  versus WT. **C.** Cx43 ventricular expression and localization in 30- and 60-week-old WT and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. The square image is a representative confocal image of Cx43 in left ventricular sections from WT and 30- and 60-week-old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice. The rectangular image is a magnification of an intercalated disc. Scale bars: 50  $\mu$ m. **D.** Quantification (in arbitrary units) of overall Cx43 left ventricular expression in left bar graph, Cx43 subcellular distribution in the two middle bar graphs. Bars represent average sizes of Cx43 clusters expressed as area/length ratio (see methods section) in intercalated discs and lateral membranes, respectively. The bar graph on the right shows the average percentage of Cx43 expressed

in intercalated discs. Means  $\pm$  sem of 4 mice per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus WT; §§§  $p < 0.001$  versus 30 weeks.

**Figure 4. Signaling pathways involved in fibrosis development in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice.** Nav1.5, TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ), SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), CTGF (Connective Tissue Growth Factor), P-Smad2/3 (phospho-Smad2/3) and Smad2/3 ventricular expression in 30- and 45-week-old wild-type (WT) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with mild and severe QRS prolongation. Right: representative western blots; left: corresponding quantification performed on Western blots by normalizing the intensities to the GAPDH bands. Means  $\pm$  sem of 6 mice per group.\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  versus WT.

**Figure 5. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  type I receptor by GW 788388 prevents fibrosis remodeling in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice.** **A.** Representative left ventricular sections stained with picrosirius red from 60 week-old wild-type mice (WT) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice treated with GW 788388 (5 mg/kg/day) during 15 weeks. Scale bar: 50  $\mu$ m. The bar graph on the right shows quantification of fibrosis (% of collagen per histological section). Means  $\pm$  sem of 4 WT mice and 5 *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice treated with GW 788388. **B.** TGF- $\beta$  expression in 60-week-old wild-type (WT) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice treated with GW 788388. The bar graph on the right shows quantification of TGF- $\beta$  expression obtained by normalizing the intensities to the GAPDH bands. Mean  $\pm$  sem of 3 WT mice and 6 *Scn5a*<sup>+/-</sup> treated mice. \*  $p < 0.05$  versus WT.

**Figure 6: Effects of chronic inhibition of Nav1.5 on ventricular conduction, contractile function and fibrosis.** **A.** Upper panel: representative lead I ECGs from wild-type (WT) mice treated with placebo or flecainide (50 mg/kg/day) at the ages of 20 and 60 weeks. Scale bar: 100 ms. Lower panel: average QRS interval duration as a function of age. QRS values in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with a mild phenotype are given for comparison. Means  $\pm$  sem of 13 20-week-old, 14 30-week-old and 13 60-week-old placebo-treated mice, in flecainide 50 20-week-old, 29 30-week-old and 11 60-week-old flecainide-treated mice and 175 20-week-old, 130 30-week-old and 43 60-week-old *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with mild QRS complex prolongation. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus placebo. **B.** Echocardiographic

parameters in 60-week-old mice treated with placebo (n = 11) or flecainide (n = 10). **C.** Left panel: representative left ventricular sections from 60-week-old mice treated with placebo or flecainide stained with picrosirius red. Scale bar: 50  $\mu$ m. Right panel: quantification of fibrosis (% of collagen per histological section) as a function of age. Means  $\pm$  sem of 4 placebo- and 5 flecainide-treated mice. **D.** Cx43, Nav1.5, TGF- $\beta$  and CTGF expression in 60-week-old mice treated with placebo or flecainide. Both representative Western blots and bar graphs for quantification are shown. Quantification was obtained by normalizing the intensities of Cx43, Nav1.5, TGF- $\beta$  and CTGF bands to the GAPDH bands. Means  $\pm$  sem of 5 mice per group.

Figure 1

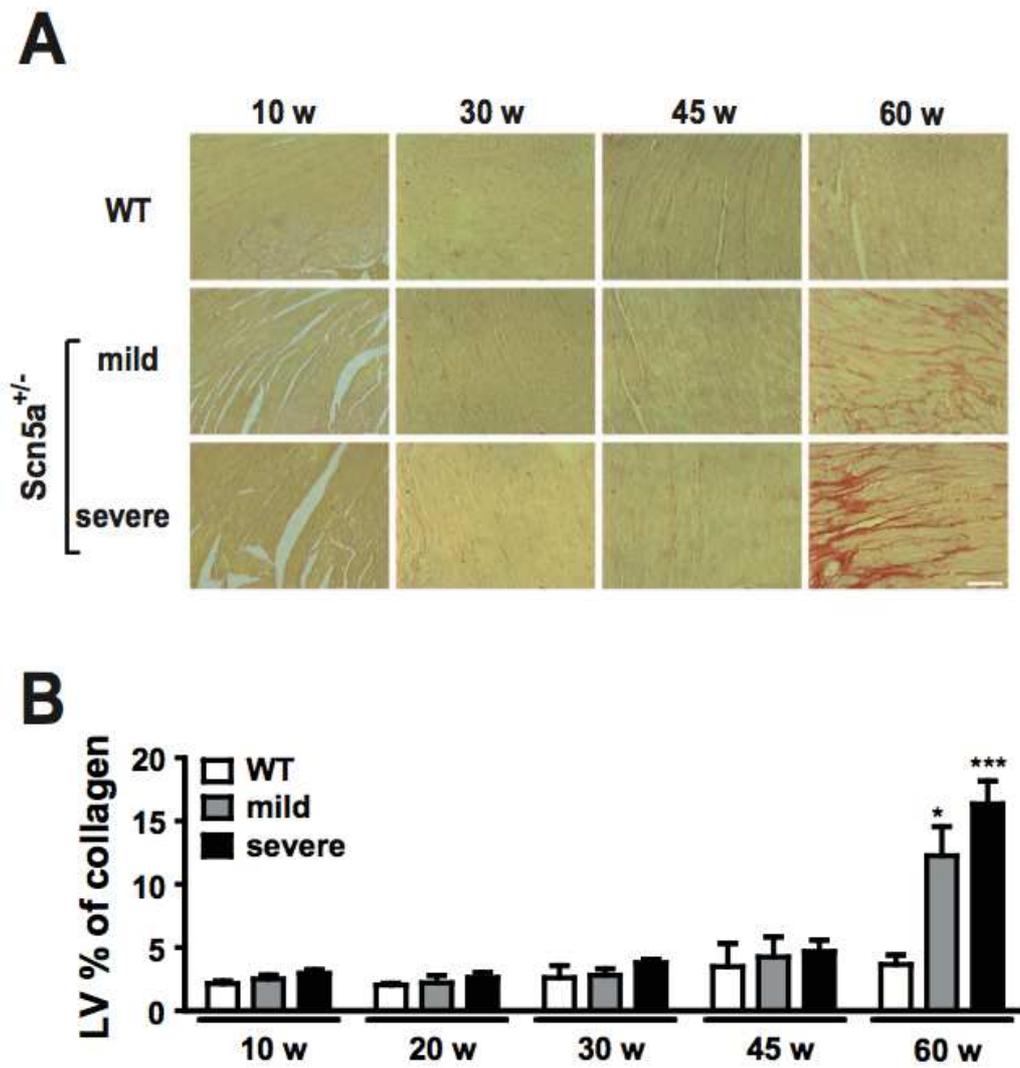


Figure 2

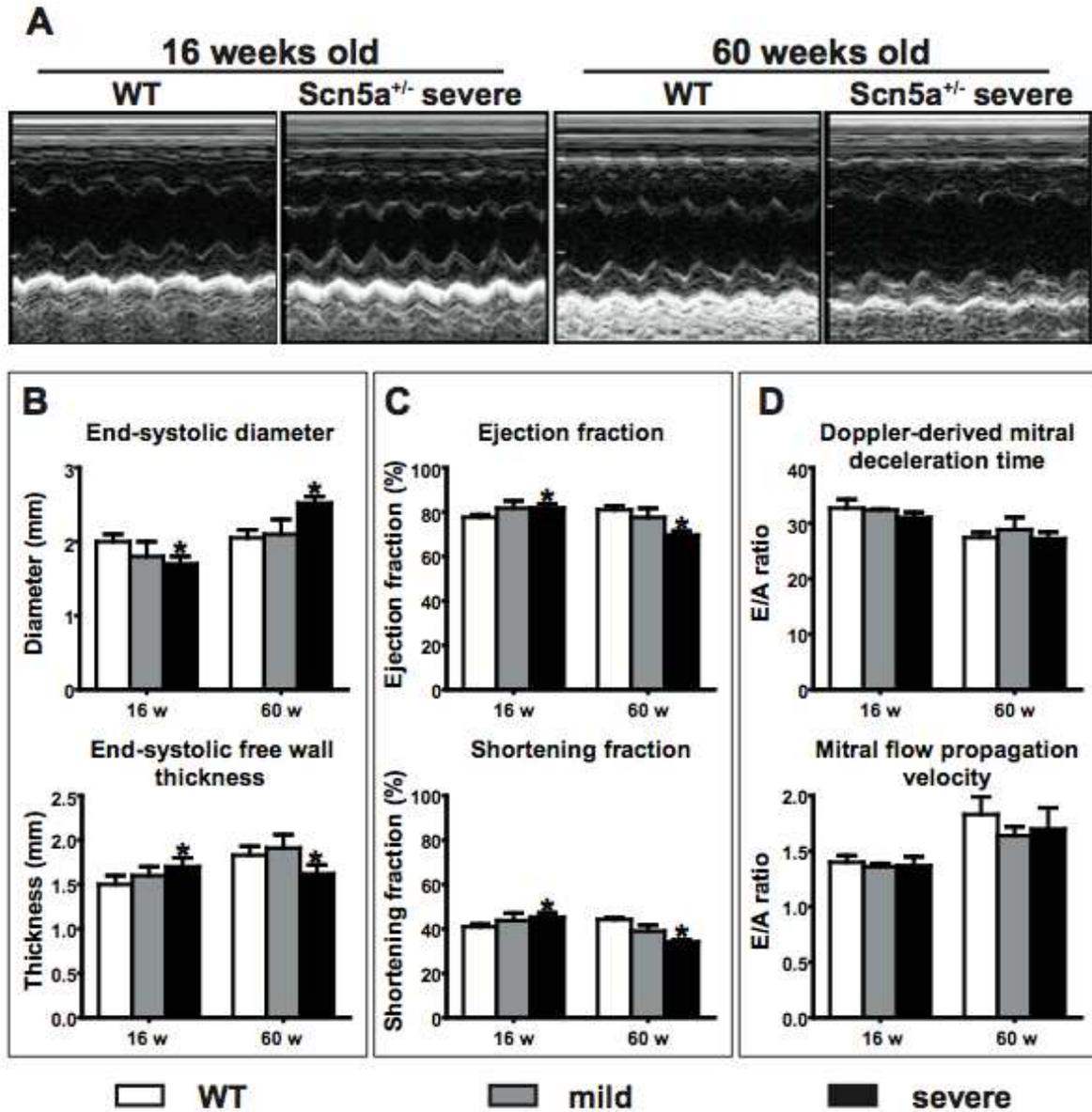


Figure 3

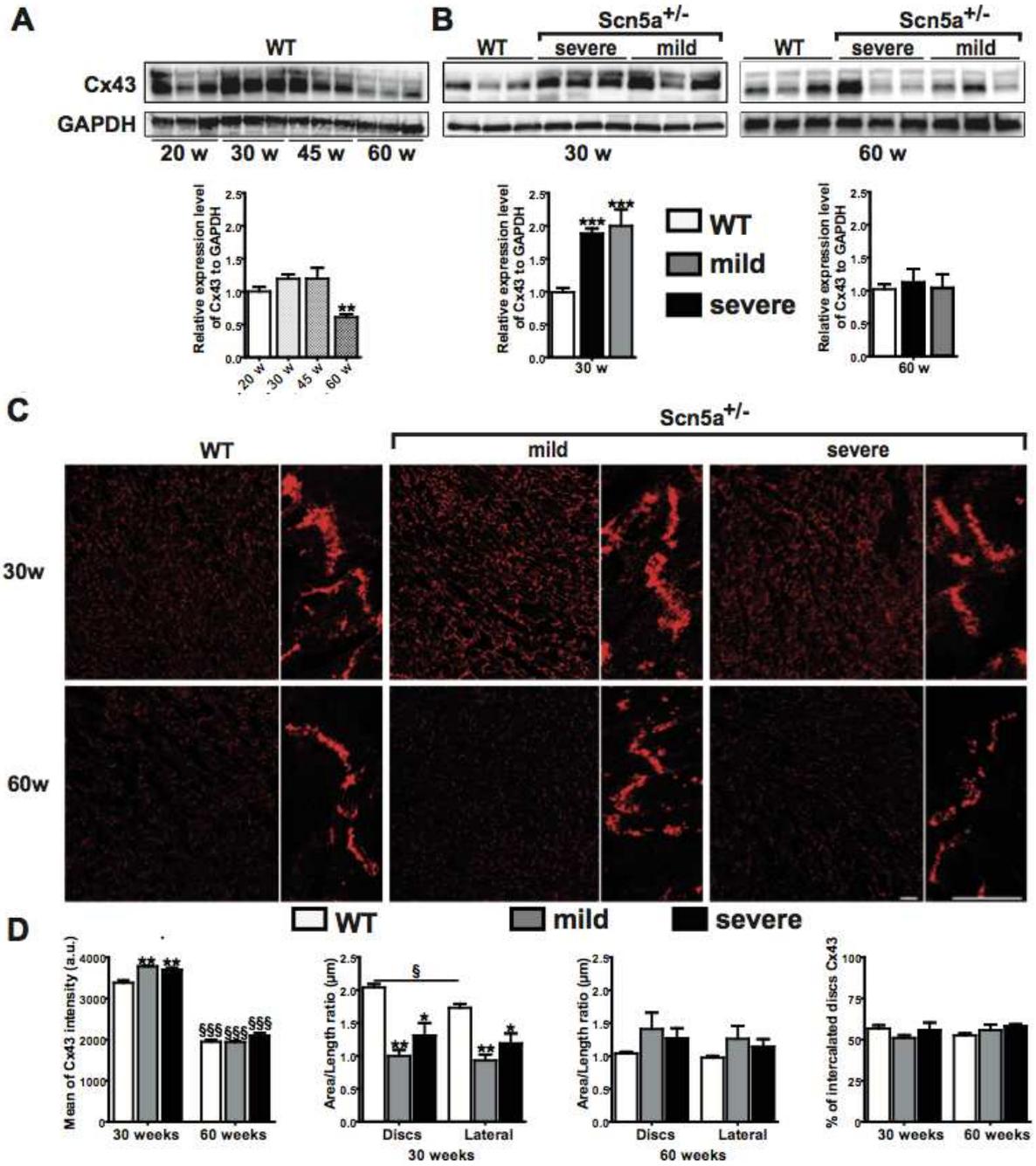


Figure 4

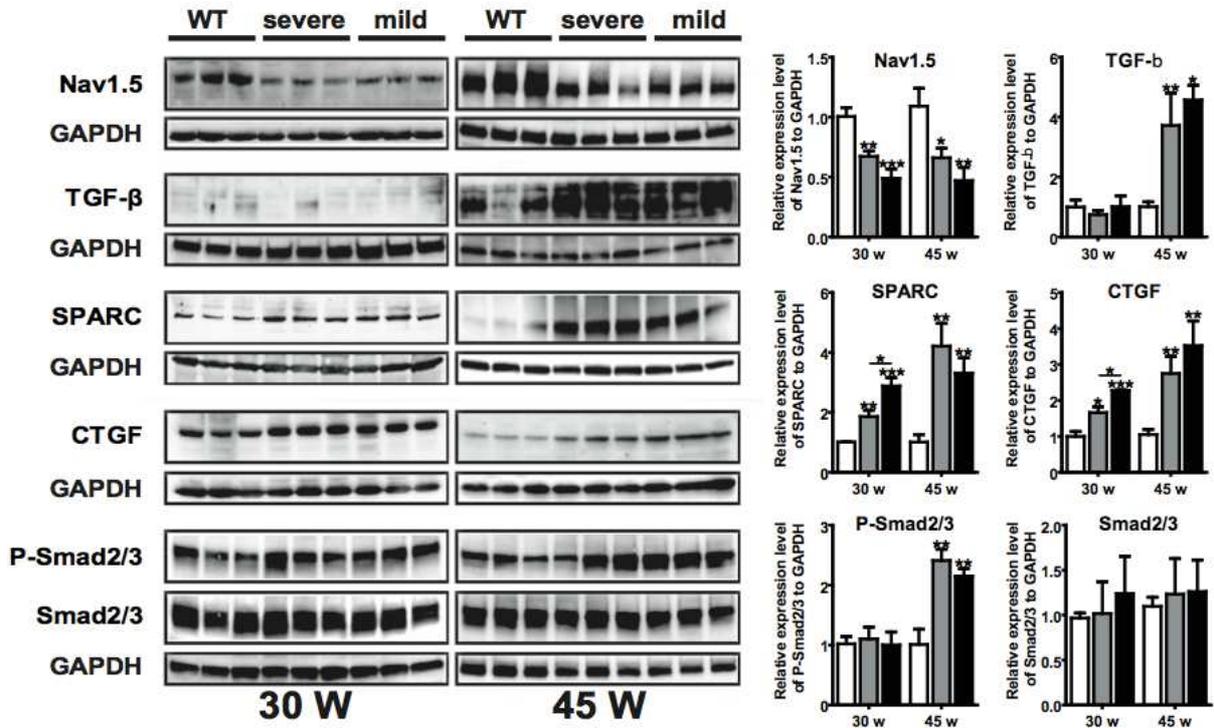


Figure 5

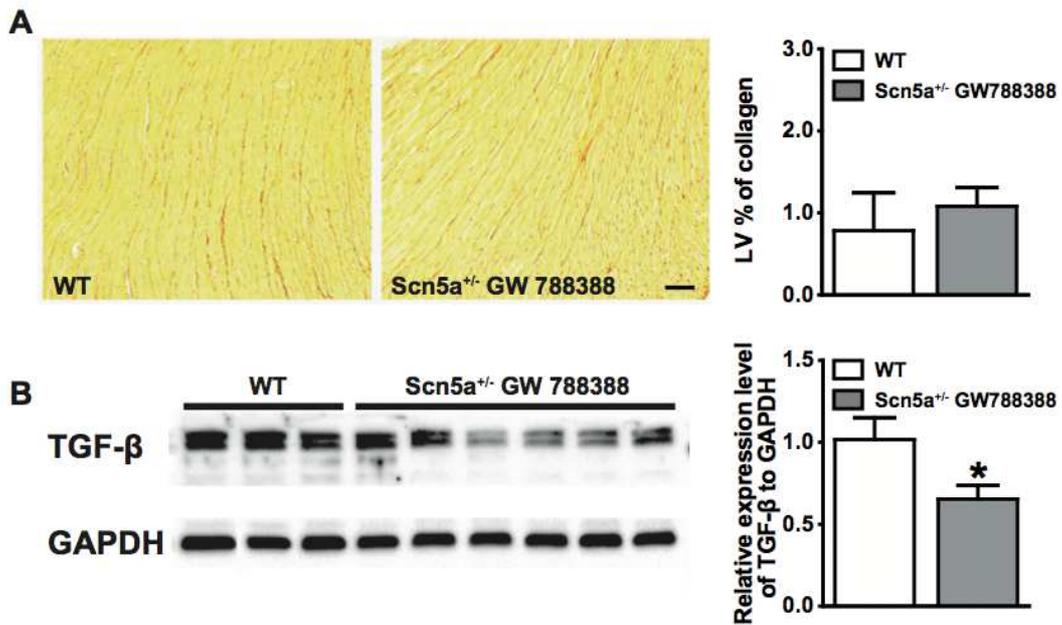
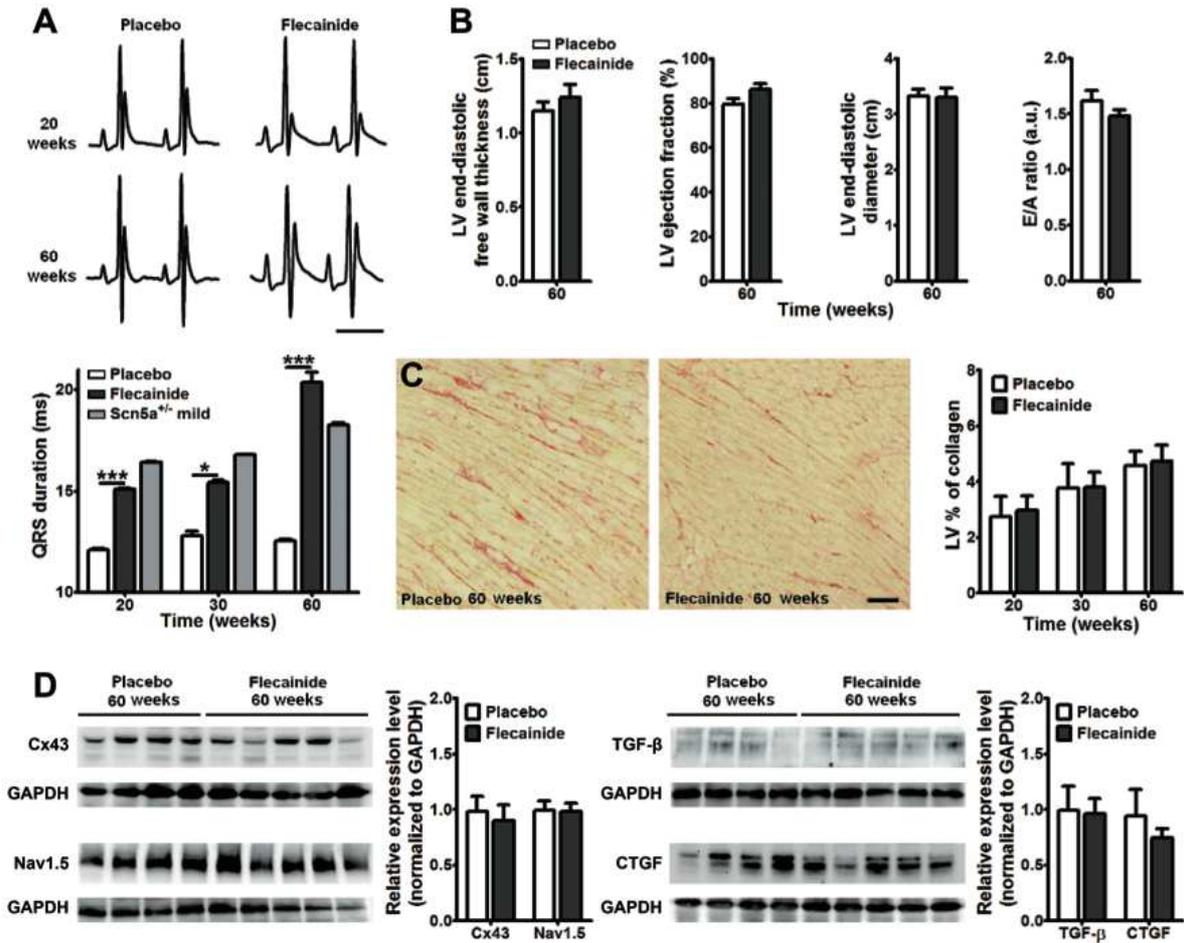


Figure 6



**Age-dependent development of ventricular fibrosis in the *Scn5a*<sup>+/-</sup> mouse model is triggered by activation of TGF- $\beta$  pathway**

Mickael Derangeon,<sup>1-3\*</sup> Jérôme Montnach,<sup>1-3\*</sup> Cynthia Ore Cerpa,<sup>1-3</sup> Gilles Toumaniantz,<sup>1-3</sup> Benoit Jagu,<sup>1-3</sup> Christopher LH Huang,<sup>4</sup> William H. Colledge,<sup>4</sup> Andrew A Grace,<sup>4</sup> Isabelle Baró,<sup>1-3</sup> Flavien Charpentier<sup>1-3§</sup>

**Online data supplement**

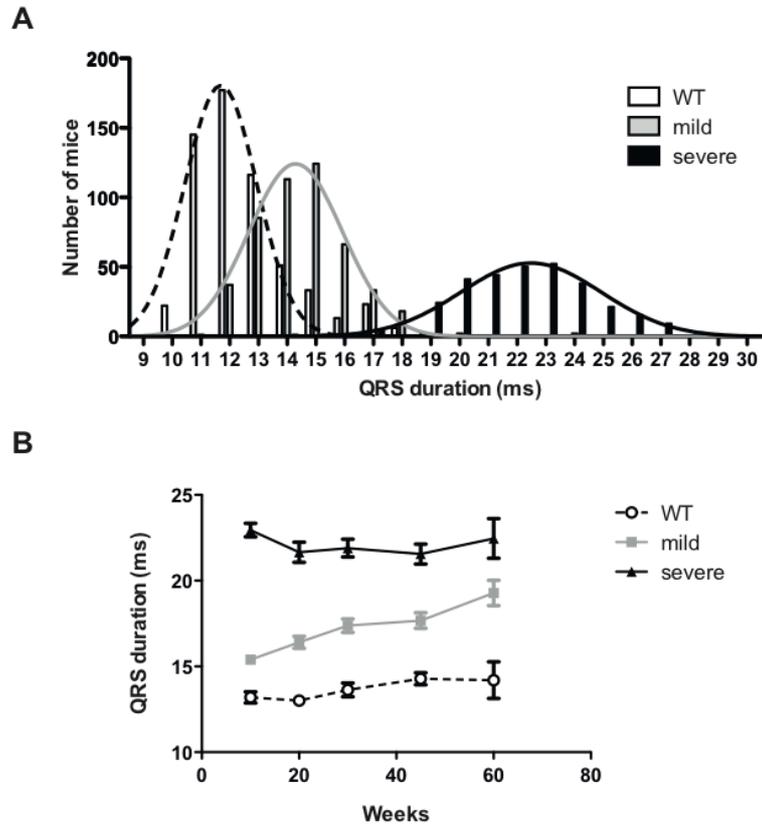
**Supplemental figure legends**

**Supplemental figure 1:** Variable degrees of ventricular conduction defects in *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice.

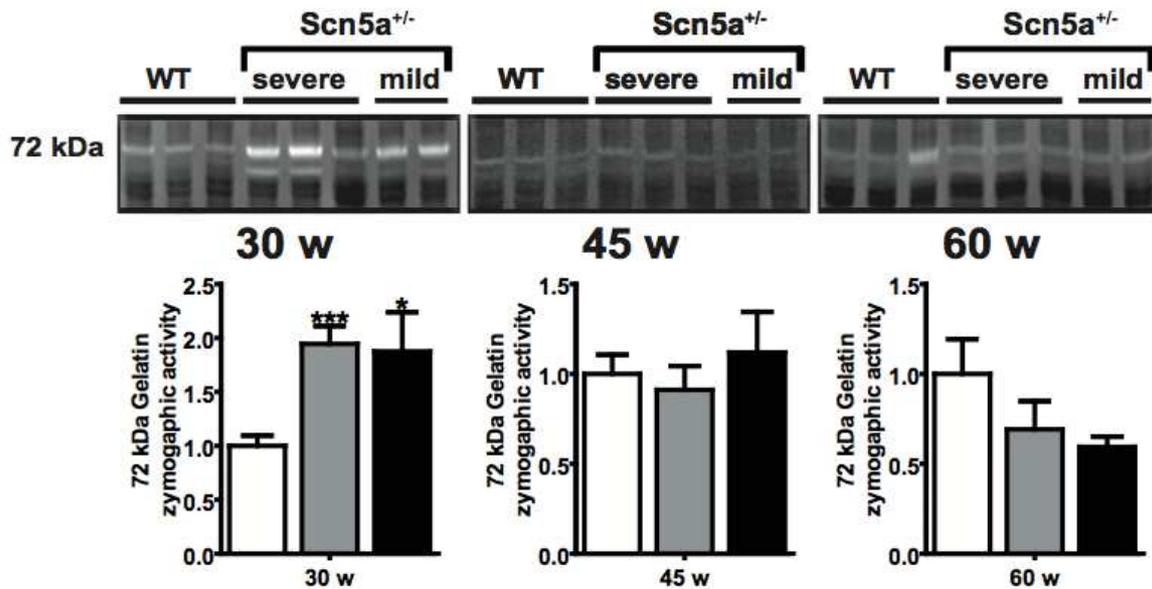
**A.** Distribution of QRS interval duration with corresponding Gaussian fits in 10 week-old wild-type (WT; white bars) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with mild (grey bars) and severe (black bars) QRS complex prolongation. **B.** Effects of age (X-axis) on QRS interval duration (Y-axis) in WT mice (open circles) and *Scn5a*<sup>+/-</sup> mice with mild (filled squares) and severe (filled triangles) phenotype.

**Supplemental figure 2:** Activation of 72 kDa Gelatin Matrix Metalloproteinase. Top, representative zymographic gels; bottom, corresponding quantification. Means  $\pm$  sem of 6 mice per group. \* p<0.05 and \*\*\*p<0.001 vs. WT.

Suppl. Figure 1



Suppl. Figure 2



## **XII- Bibliographie**

Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, Biondi-Zoccai GGL, Houser JE, Qureshi IZ, Ownby ED, Gustini E, Biasucci LM, Severino A, Capogrossi MC, Vetovec GW, Crea F, Baldi A, Kukreja RC, Dobrina A. Anakinra, a Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist, Inhibits Apoptosis in Experimental Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 2008;117:2670–2683.

Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:2–11.

Adabag AS, Peterson G, Apple FS, Titus J, King R, Luepker RV. Etiology of sudden death in the community: results of anatomical, metabolic, and genetic evaluation. *American Heart Journal*. 2010;159:33–39.

Ahmed MS, Gravning J, Martinov VN, Lueder von TG, Edvardsen T, Czibik G, Moe IT, Vinge LE, Oie E, Valen G, Attramadal H. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2011;300:H1291–H1302.

AKAR J, AKAR F. Regulation of ion channels and arrhythmias in the ischemic heart. *J Electrocardiol*. 2007;40:S37–S41.

Aldous SJ. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2012;

Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2010;460:223–237.

Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Chavey WE, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, 2011 WRITING GROUP MEMBERS, ACCF/AHA TASK FORCE MEMBERS. 2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2011;123:e426–579.

Andrikopoulos P, Fraser SP, Patterson L, Ahmad Z, Burcu H, Ottaviani D, Diss JKJ, Box C, Eccles SA, Djamgoz MBA. Angiogenic Functions of Voltage-gated Na<sup>+</sup> Channels in Human Endothelial Cells: MODULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) SIGNALING. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286:16846–16860.

Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:517–527.

Aouizerat BE, Vittinghoff E, Musone SL, Pawlikowska L, Kwok P-Y, Olgin JE, Tseng ZH. GWAS for discovery and replication of genetic loci associated with sudden cardiac arrest inpatients with coronary artery disease. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2011;11:29.

Arshad A, Mandava A, Kamath GS, Musat D. Sudden Cardiac Death and the Role of Medical Therapy. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008;50:420–438.

Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF. *Exp Cell Res*. 2009;315:1190–1199.

Authors/Task Force Members, Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D, ESC COMMITTEE FOR PRACTICE GUIDELINES, Bax JJ, Auricchio A, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Poldermans D, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, DOCUMENT REVIEWERS, Windecker S, Achenbach S, Badimon L, Bertrand M, Botker HE, Collet JP, Crea F, Danchin N, Falk E, Goudevenos J, Gulba D, Hambrecht R, Herrmann J, Kastrati A, Kjeldsen K, Kristensen SD, Lancellotti P, Mehilli J, Merkely B, Montalescot G, Neumann FJ, Neyses L, Perk J, Roffi M, Romeo F, Ruda M, Swahn E, Valgimigli M, Vrints CJ, Widimsky P. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2011;32:2999–3054.

Azarbar S, Dupuis J. Lung capillary injury and repair in left heart disease: a new target for therapy? *Clin Sci*. 2014;127:65–76.

Baba S. Remodeling in Cells From Different Regions of the Reentrant Circuit During Ventricular Tachycardia. *Circulation*. 2005;112:2386–2396.

Baldo MP, Davel APC, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, Rossoni LV, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor reduces mortality by suppressing ventricular arrhythmias in acute phase of myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;52:375–380.

Bankston JR, Kass RS. Fading sodium channels in failing hearts. *Circ Res*. 2007;101:1073–1074.

Baum JR, Long B, CABO C, Duffy HS. Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2012;302:H790–H800.

Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kléber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res*. 2000;87:656–662.

Bello D, Fieno DS, Kim RJ, Pereles FS, Passman R, Song G, Kadish AH, Goldberger JJ. Infarct morphology identifies patients with substrate for sustained ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1104–1108.

Benito B, Josephson ME. Ventricular Tachycardia in Coronary Artery Disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2012;65:939–955.

Benson DW. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest*. 2003;112:1019–1028.

Betsuyaku T. Spontaneous and inducible ventricular arrhythmias after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular Pathology*. 2004;13:156–164.

Bezzina CR, Pazoki R, Bardai A, Marsman RF, de Jong JSSG, Blom MT, Scicluna BP, Jukema JW, Bindraban NR, Lichtner P, Pfeufer A, Bishopric NH, Roden DM, Meitinger T, Chugh SS, Myerburg RJ, Jouven X, Käåb S, Dekker LRC, Tan HL, Tanck MWT, Wilde AAM. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus at 21q21 for ventricular fibrillation in acute myocardial infarction. *Nature Genetics*. 2010;42:688–691.

Bi J, Wang W, Liu Z, Huang X, Jiang Q, Liu G, Wang Y, Huang X. Seipin Promotes Adipose Tissue Fat Storage through the ER Ca. *Cell Metabolism*. 2014;19:861–871.

- Black JA, Waxman SG. Perspective. *Neuron*. 2013;80:280–291.
- Bocquet A, Sablayrolles S, Vacher B, Le Grand B. F 15845, a new blocker of the persistent sodium current prevents consequences of hypoxia in rat femoral artery. *British Journal of Pharmacology*. 2010;161:405–415.
- Boehringer T, BUGERT P, BORGGREFE M, ELMAS E. SCN5A mutations and polymorphisms in patients with ventricular fibrillation during acute myocardial infarction. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10:2039–2044.
- Bogun F, Good E, Reich S, Elmouchi D, Iqbal P, Tschopp D, Dey S, Wimmer A, Jongnarangsin K, Oral H, Chugh A, Pelosi F, Morady F. Role of Purkinje Fibers in Post-Infarction Ventricular Tachycardia. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:2500–2507.
- BORLAK J. Post-translational modifications of the cardiac Na channel: contribution of CaMKII-dependent phosphorylation to acquired arrhythmias. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2013;305:H431–H445.
- BORLAK J. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*. 2003;17:1592–1608.
- van den Borne SWM, van de Schans VAM, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HTM, Lijnen PM, Cleutjens JPM, Smits JFM, Daemen MJAP, Janssen BJA, Blankesteijn WM. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;84:273–282.
- Bradley E, Webb TI, Hollywood MA, Sergeant GP, McHale NG, Thornbury KD. The cardiac sodium current Nav1.5 is functionally expressed in rabbit bronchial smooth muscle cells. *AJP: Cell Physiology*. 2013;305:C427–C435.
- Brønnum H, Eskildsen T, Andersen DC, Schneider M, Sheikh SP. IL-1 $\beta$  suppresses TGF- $\beta$ -mediated myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Growth Factors*. 2013;31:81–89.
- Brown RD, Jones GM, Laird RE, Hudson P, Long CS. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362:200–205.
- Brueggemann LI, Haick JM, Neuburg S, Tate S, Randhawa D, Cribbs LL, Byron KL. KCNQ (Kv7) potassium channel activators as bronchodilators: combination with a  $\beta$ -adrenergic agonist enhances relaxation of rat airways. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014;306:L476–L486.
- Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res*. 2012;111:1091–1106.
- Burton FL, Cobbe SM. Dispersion of ventricular repolarization and refractory period. *Cardiovasc Res*. 2001;50:10–23.
- Buxton AE, Lee KL, Fisher JD, Josephson ME, Prystowsky EN, Hafley G. A randomized study of the prevention of sudden death in patients with coronary artery disease. Multicenter Unsustained Tachycardia Trial Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:1882–1890.
- CABO C, Boyden PA. Electrical remodeling of the epicardial border zone in the canine infarcted heart: a computational analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H372–84.
- Cai B, Wang N, Mao W, You T, Lu Y, Li X, Ye B, Li F, Xu H. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;74:297–306.

Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS. Relationship Between Regional Cardiac Hyperinnervation and Ventricular Arrhythmia. *Circulation*. 2000;101:1960–1969.

Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, Ohara T, Lee MH, Tsai J, Lai WW, Karagueuzian HS, Wolf PL, Fishbein MC, Chen PS. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res*. 2000;86:816–821.

Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev*. 1999;79:917–1017.

Carrithers MD, Dib-Hajj S, Carrithers LM, Tokmoulina G, Pypaert M, Jonas EA, Waxman SG. Expression of the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in the Macrophage Late Endosome Regulates Endosomal Acidification. *The Journal of Immunology*. 2007;178:7822–7832.

Cascio WE, Yang H, Muller-Borer BJ, Johnson TA. Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *J Electrocardiol*. 2005;38:55–59.

Casini S, Verkerk AO, van Borren MMGJ, van Ginneken ACG, Veldkamp MW, de Bakker JMT, Tan HL. Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2009;81:72–81.

Charpentier F. Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias. 2012;:1–11.

Chatelier A, Mercier A, Tremblier B, Theriault O, Moubarak M, Benamer N, Corbi P, Bois P, Chahine M, Faivre JF. A distinct de novo expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *The Journal of physiology*. 2012;590:4307–4319.

Chen PS, Chen LS, Cao JM, Sharifi B, Karagueuzian HS, Fishbein MC. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res*. 2001;50:409–416.

Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:945–953.

Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Phase 2 ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction: a neglected target for therapeutic antiarrhythmic drug development and for safety pharmacology evaluation. *British Journal of Pharmacology*. 2005;145:551–564.

Coronel R, Wilders R, Verkerk AO, Wiegerinck RF, Benoist D, Bernus O. Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:2432–2441.

Coronel R, Janse MJ, Opthof T, Wilde AA, Taggart P. Postrepolarization refractoriness in acute ischemia and after antiarrhythmic drug administration: Action potential duration is not always an index of the refractory period. *HRTM*. 2012;9:977–982.

Crotti L, Hu D, Barajas-Martinez H, De Ferrari GM, Oliva A, Insolia R, Pollevick GD, Dagradi F, Guerchicoff A, Greco F, Schwartz PJ, Viskin S, Antzelevitch C. Torsades de pointes following acute myocardial infarction: Evidence for a deadly link with a common genetic variant. *HRTM*. 2012;9:1104–1112.

Crotti L, Tester DJ, White WM, Bartos DC, Insolia R, Besana A, Kunic JD, Will ML, Velasco EJ, Bair JJ, Ghidoni A, Cetin I, Van Dyke DL, Wick MJ, Brost B, Delisle BP, Facchinetti F, George AL, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Long QT syndrome-associated mutations in intrauterine fetal death. *JAMA*. 2013;309:1473–1482.

- Curtis MJ. Characterisation, utilisation and clinical relevance of isolated perfused heart models of ischaemia-induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res.* 1998;39:194–215.
- Curtis MJ, Hancox JC, Farkas A, Wainwright CL, Stables CL, Saint DA, Clements-Jewery H, Lambiase PD, Billman GE, Janse MJ, Pugsley MK, Ng GA, Roden DM, Camm AJ, Walker MJA. *Pharmacology & Therapeutics.* Pharmacol Ther. 2013;139:213–248.
- D'Elia E, Pascale A, Marchesi N, Ferrero P, Senni M, Govoni S, Gronda E, Vanoli E. Novel approaches to the post-myocardial infarction/heart failure neural remodeling. *Heart Fail Rev.* 2014;19:611–619.
- Dekker LRC. Familial Sudden Death Is an Important Risk Factor for Primary Ventricular Fibrillation: A Case-Control Study in Acute Myocardial Infarction Patients. *Circulation.* 2006;114:1140–1145.
- Delgado JF, Conde E, Sánchez V, López-Ríos F, Gómez-Sánchez MA, Escribano P, Sotelo T, la Cámara de AG, Cortina J, la Calzada de CS. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension due to chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure.* 2007;7:1011–1016.
- Denniss AR, Richards DAB. Mechanisms, prediction and treatment of ventricular tachyarrhythmias occurring late after myocardial infarction. *Heart Lung Circ.* 2007;16:156–161.
- Deschenes I. Isoform-Specific Modulation of Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels by Calmodulin. *Circ Res.* 2002;90:49e–57.
- Di Diego JM, Antzelevitch C. Ischemic ventricular arrhythmias: Experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm.* 2011;
- Di Diego JM, Antzelevitch C. Cellular basis for ST-segment changes observed during ischemia. *J Electrocardiol.* 2003;36 Suppl:1–5.
- Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:504–511.
- Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac Metabolism in Heart Failure: Implications Beyond ATP Production. *Circ Res.* 2013;113:709–724.
- Dun W. Diverse phenotypes of outward currents in cells that have survived in the 5-day-infarcted heart. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2005;289:H667–H673.
- Dun W. Dynamic remodeling of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in cells that survived in the epicardial border zone of canine healed infarcted heart. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2004;287:H1046–H1054.
- Dun W, Lowe JS, Wright P, Hund TJ, Mohler PJ, Boyden PA. Ankyrin-G Participates in INa Remodeling in Myocytes from the Border Zones of Infarcted Canine Heart. *PLoS ONE.* 2013;8:e78087.
- ELMAS E, BUGERT P, POPP T, LANG S, WEISS C, BEHNES M, BORGGREFE M, KÄLSCH T. The P-selectin gene polymorphism Vall68Met: a novel risk marker for the occurrence of primary ventricular fibrillation during acute myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology.* 2010;21:1260–1265.
- Esmaeilzadeh M, Parsaee M, Maleki M. The role of echocardiography in coronary artery disease and acute myocardial infarction. *J Tehran Heart Cent.* 2013;8:1–13.

- Everaert BR, Boulet GA, Timmermans J-P, Vrints CJ. Importance of Suitable Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR: Special Reference to Mouse Myocardial Infarction Studies. *PLoS ONE*. 2011;6:e23793.
- Evseev AI, Semenov I, Archer CR, Medina JL, Dube PH, Shapiro MS, Brenner R. Functional effects of KCNQ K(+) channels in airway smooth muscle. *Front Physiol*. 2013;4:277.
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657–671.
- Fang L, Gao X-M, Samuel CS, Su Y, Lim YL, Dart AM, Du X-J. Higher levels of collagen and facilitated healing protect against ventricular rupture following myocardial infarction. *Clin Sci*. 2008;115:99–106.
- Fang L, Gao X-M, Moore X-L, Kiriazis H, Su Y, Ming Z, Lim YL, Dart AM, Du X-J. Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:535–544.
- Firth AL, Remillard CV, Platoshyn O, Fantozzi I, Ko EA, Yuan JXJ. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. 2011;1:48–71.
- Florea VG, Cohn JN. The autonomic nervous system and heart failure. *Circ Res*. 2014;114:1815–1826.
- Frangogiannis NG. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circ Res*. 2012;110:159–173.
- Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. 2008;58:88–111.
- Fraser SP, Diss JKJ, Chioni A-M, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, Koyutürk M, Kaya H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC, Djamgoz MBA. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5381–5389.
- Friedlander Y, Siscovick DS, Weinmann S, Austin MA, Psaty BM, Lemaitre RN, Arbogast P, Raghunathan TE, Cobb LA. Family history as a risk factor for primary cardiac arrest. *Circulation*. 1998;97:155–160.
- FRIEDMAN PL, STEWART JR, FENOGLIO JJ, Wit AL. Survival of Subendocardial Purkinje Fibers after Extensive Myocardial Infarction in Dogs: IN VITRO AND IN VIVO CORRELATIONS. *Circ Res*. 1973;33:597–611.
- Frohlich J, Al-Sarraf A. Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22:16–18.
- Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, Podewski E, Schieffer B, Rose-John S, Drexler H. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J*. 2003;17:2118–2120.
- Fukuda K. Oxidative Mediated Lipid Peroxidation Recapitulates Proarrhythmic Effects on Cardiac Sodium Channels. *Circ Res*. 2005;97:1262–1269.
- Galderisi M. Diastolic Dysfunction and Diabetic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1548–1551.
- Gao G, Brahmanandam V, Raicu M, Gu L, Zhou L, Kasturirangan S, Shah A, Negi SI, Wood MR, Desai AA, Tatoes A, Schwartz A, Dudley SC. Enhanced risk profiling of implanted defibrillator

shocks with circulating SCN5A mRNA splicing variants: a pilot trial. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2261–2269.

Gao G, Xie A, Huang S-C, Zhou A, Zhang J, Herman AM, Ghassemzadeh S, Jeong E-M, Kasturirangan S, Raicu M, Sobieski MA, Bhat G, Tautoles A, Benz EJ, Kamp TJ, Dudley SC. Role of RBM25/LUC7L3 in Abnormal Cardiac Sodium Channel Splicing Regulation in Human Heart Failure. *Circulation.* 2011;

Gao X-M, White DA, Dart AM, Du X-J. Post-infarct cardiac rupture: Recent insights on pathogenesis and therapeutic interventions. *Pharmacol Ther.* 2012;134:156–179.

Gao X-M, Ming Z, Su Y, Fang L, Kiriazis H, Xu Q, Dart AM, Du X-J. Infarct size and post-infarct inflammation determine the risk of cardiac rupture in mice. *Int J Cardiol.* 2010;143:20–28.

Gao X-M, Xu Q, Kiriazis H, Dart AM, Du X-J. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovasc Res.* 2005;65:469–477.

Garratt C, Ward DE, Camm AJ. Lessons from the cardiac arrhythmia suppression trial. *BMJ.* 1989;299:805–806.

Gehrmann J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, Lee RT, Berul CI. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:237–250.

Gosling M, Harley SL, Turner RJ, Carey N, Powell JT. Human saphenous vein endothelial cells express a tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium current. *J Biol Chem.* 1998;273:21084–21090.

Granger CB, Goldberg RJ, Dabbous O, Pieper KS, Eagle KA, Cannon CP, van de Werf F, Avezum A, Goodman SG, Flather MD, Fox KAA, Global Registry of Acute Coronary Events Investigators. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med.* 2003;163:2345–2353.

Gravning J, Ørn S, Kaasbøll OJ, Martinov VN, Manhenke C, Dickstein K, Edvardsen T, Attramadal H, Ahmed MS. Myocardial connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS ONE.* 2012;7:e52120.

de Groot JR, Coronel R. Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004;62:323–334.

Gui J, Wang T, Jones RPO, Trump D, Zimmer T, Lei M. Multiple Loss-of-Function Mechanisms Contribute to SCN5A-Related Familial Sick Sinus Syndrome. *PLoS ONE.* 2010;5:e10985.

Gui J, Wang T, Trump D, Zimmer T, Lei M. Mutation-Specific Effects of Polymorphism H558R in SCN5A-Related Sick Sinus Syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology.* 2010;21:564–573.

Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:505–515.

Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac Myocytes Produce Interleukin-6 in Culture and in Viable Border Zone of Reperfused Infarctions. *Circulation.* 1999;99:546–551.

Hallaq H, Yang Z, VISWANATHAN P, Fukuda K, SHEN W, WANG D, WELLS K, Zhou J, YI J, MURRAY K. Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc Res.* 2006;72:250–261.

Hamer M, Malan L. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2010;35:76–83.

Hao X, Zhang Y, Zhang X, Nirmalan M, Davies L, Konstantinou D, Yin F, Dobrzynski H, Wang X, GRACE A, ZHANG H, Boyett M, Huang CLH, Lei M. TGF- 1 Mediated Fibrosis and Ion Channel Remodeling Are Key Mechanisms Producing the Sinus Node Dysfunction Associated with SCN5A Deficiency and Aging. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2011;

Hasan W, Jama A, Donohue T, Wernli G, Onyszczuk G, Al-Hafez B, Bilgen M, Smith PG. Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats. *Brain Research.* 2006;1124:142–154.

Herren AW, Bers DM, Grandi E. Post-translational Modifications of the Cardiac Na Channel. Contribution of CaMKII-Dependent Phosphorylation to Acquired Arrhythmias. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2013;305:H431–H445.

Hirota S, Helli P, Janssen LJ. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> handling in airway smooth muscle. *European Respiratory Journal.* 2007;30:114–133.

Hohnloser SH, Kuck KH, Dorian P, Roberts RS, Hampton JR, Hatala R, Fain E, Gent M, Connolly SJ, DINAMIT Investigators. Prophylactic use of an implantable cardioverter-defibrillator after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2004;351:2481–2488.

Honsho S, Nishikawa S, Amano K, Zen K, Adachi Y, Kishita E, Matsui A, Katsume A, Yamaguchi S, Nishikawa K, Isoda K, Riches DWH, Matoba S, Okigaki M, Matsubara H. Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways. *Circ Res.* 2009;105:1149–1158.

van Hoorn F, Campian ME, Spijkerboer A, Blom MT, Planken RN, van Rossum AC, de Bakker JMT, Wilde AAM, Groenink M, Tan HL. SCN5A Mutations in Brugada Syndrome Are Associated with Increased Cardiac Dimensions and Reduced Contractility. *PLoS ONE.* 2012;7:e42037.

House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM, Lee NH. Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channel SCN5A Is a Key Regulator of a Gene Transcriptional Network That Controls Colon Cancer Invasion. *Cancer Research.* 2010;70:6957–6967.

Hu D, Viskin S, Oliva A, Carrier T, Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Wu Y, Burashnikov E, Sicouri S, Brugada R, Rosso R, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. Novel mutation in the SCN5A gene associated with arrhythmic storm development during acute myocardial infarction. *Heart Rhythm.* 2007;4:1072–1080.

Huang B, El-Sherif T, Gidh-Jain M, Qin D, El-Sherif N. Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology.* 2001;12:218–225.

Hummel YM, Wilde AAM, Voors AA, Bugatti S, Hillege HL, van den Berg MP. Ventricular dysfunction in a family with long QT syndrome type 3. *Europace.* 2013;15:1516–1521.

Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Miyamoto T, Touma M, Sasayama S. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *JAC.* 2001;38:1546–1553.

- Jagu B, Charpentier F, Toumaniantz G. Identifying potential functional impact of mutations and polymorphisms: linking heart failure, increased risk of arrhythmias and sudden cardiac death. *Front Physiol.* 2013;4:254.
- Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 1989;69:1049–1169.
- Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004;61:208–217.
- Janse MJ, Coronel R, Wilms-Schopman FJG, de Groot JR. Mechanical effects on arrhythmogenesis: from pipette to patient. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2003;82:187–195.
- Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, de Jong S, van der Nagel R, Hund TJ, Mohler PJ, Vos MA, van Veen TA, de Bakker JM, Delmar M, van Rijen HV. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm.* 2011;9:600–607.
- Jansen JA, van Veen TAB, de Bakker JMT, van Rijen HVM. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:76–82.
- Jia Y-Y, Bao Z-W, Wei M-F, Zhu J-H, Gui L. Aliskiren ameliorates sympathetic nerve sprouting and suppresses the inducibility of ventricular tachyarrhythmia in postinfarcted rat heart. *Chin Med J.* 2013;126:4707–4714.
- Jiang H, Lu Z, Yu Y, Zhao D, Yang B, Huang C. Relationship between sympathetic nerve sprouting and repolarization dispersion at peri-infarct zone after myocardial infarction. *Autonomic Neuroscience.* 2007;134:18–25.
- Jo T, Nagata T, Iida H, Imuta H, Iwasawa K, Ma J, Hara K, Omata M, Nagai R, Takizawa H, Nagase T, Nakajima T. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: involvement of SCN9A. *FEBS Lett.* 2004;567:339–343.
- Jouven X, Desnos M, Guerot C, Ducimetière P. Predicting sudden death in the population: the Paris Prospective Study I. *Circulation.* 1999;99:1978–1983.
- Kanno S, Kovacs A, Yamada KA, Saffitz JE. Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:681–686.
- Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation.* 2011;123:594–604.
- Kieken F, Mutsaers N, Dolmatova E, Virgil K, Wit AL, Kellezi A, Hirst-Jensen BJ, Duffy HS, Sorgen PL. Structural and Molecular Mechanisms of Gap Junction Remodeling in Epicardial Border Zone Myocytes following Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2009;104:1103–1112.
- Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS. Calmodulin Mediates Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279:45004–45012.
- Kiper C, Grimes B, Van Zant G, Satin J. Mouse strain determines cardiac growth potential. *PLoS ONE.* 2013;8:e70512.
- Kléber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev.* 2004;84:431–488.

- Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74:29–38.
- Ko JH, Park WS, Kim SJ, Earm YE. Slowing of the inactivation of voltage-dependent sodium channels by staurosporine, the protein kinase C inhibitor, in rabbit atrial myocytes. *European Journal of Pharmacology.* 2006;534:48–54.
- Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, Matsubara H, Nakata T. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 2010;87:424–430.
- Kolettis TM. Coronary artery disease and ventricular tachyarrhythmia: pathophysiology and treatment. *Current Opinion in Pharmacology.* 2013;13:210–217.
- Konen E, Goitein O, Sternik L, Eshet Y, Shemesh J, Di Segni E. The Prevalence and Anatomical Patterns of Intramuscular Coronary Arteries. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:587–593.
- Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc.* 2009;84:917–938.
- Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baró I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A Mutation Leading Either to Isolated Cardiac Conduction Defect or Brugada Syndrome in a Large French Family. *Circulation.* 2001;104:3081–3086.
- Lameris TW, de Zeeuw S, Alberts G, Boomsma F, Duncker DJ, Verdouw PD, Veld AJMI', van den Meiracker AH. Time Course and Mechanism of Myocardial Catecholamine Release During Transient Ischemia In Vivo. *Circulation.* 2000;101:2645–2650.
- Lei M. Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *The Journal of physiology.* 2005;567:387–400.
- Lenfant C. Chest pain of cardiac and noncardiac origin. *Metabolism.* 2010;59:S41–S46.
- Leoni A-L, Gavillet B, Rougier J-S, Marionneau C, Probst V, Le Scouarnec S, Schott J-J, Demolombe S, Bruneval P, Huang CLH, Colledge WH, Grace AA, Le Marec H, Wilde AA, Mohler PJ, Escande D, Abriel H, Charpentier F. Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the *Scn5a*(+/-) mouse model. *PLoS ONE.* 2010;5:e9298.
- Liew R, Chiam PTL. Risk stratification for sudden cardiac death after acute myocardial infarction. *Ann Acad Med Singap.* 2010;39:237–246.
- Liu M, Sanyal S, Gao G, Gurung IS, Zhu X, Gaconnet G, Kerchner LJ, Shang LL, Huang CLH, Grace A, London B, Dudley SC. Cardiac Na<sup>+</sup> current regulation by pyridine nucleotides. *Circ Res.* 2009;105:737–745.
- Lo W-L, Donermeyer DL, Allen PM. A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. *Nat Immunol.* 2012;13:880–887.
- Lopez B, Gonzalez A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Diez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2010;299:H1–H9.
- Lu T, Lee HC, Kabat JA, Shibata EF. Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit. *The Journal of physiology.* 1999;518 ( Pt 2):371–384.

- Lue WM, Boyden PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. Alterations in  $V_{max}$  and the transient outward current. *Circulation*. 1992;85:1175–1188.
- Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered  $Ca^{2+}$  handling in heart failure. *Circ Res*. 2013;113:690–708.
- Lupsa BC, Sachdev V, Lungu AO, Rosing DR, Gorden P. Cardiomyopathy in Congenital and Acquired Generalized Lipodystrophy. *Medicine*. 2010;89:245–250.
- Luqman N, Sung RJ, Wang C-L, Kuo C-T. Myocardial ischemia and ventricular fibrillation: Pathophysiology and clinical implications☆. *Int J Cardiol*. 2007;119:283–290.
- Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, Meier M, Mégarbané A, Bachy A, Verloes A, D'Abronzo FH, Seemanova E, Assan R, Baudic N, Bourrut C, Czernichow P, Huet F, Grigorescu F, De Kerdanet M, Lacombe D, Labrune P, Lanza M, Loret H, Matsuda F, Navarro J, Nivelon-Chevalier A, Polak M, Robert JJ, Tric P, Tubiana-Rufi N, Vigouroux C, Weissenbach J, Savasta S, Maassen JA, Trygstad O, Bogalho P, Freitas P, Medina JL, Bonnicci F, Joffe BI, Loyson G, Panz VR, Raal FJ, O'Rahilly S, Stephenson T, Kahn CR, Lathrop M, Capeau J, BSCL Working Group. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nature Genetics*. 2001;28:365–370.
- Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: Implications for repolarization variability. *European Journal of Heart Failure*. 2007;9:219–227.
- Mao W, You T, Ye B, Li X, Dong HH, Hill JA, Li F, Xu H. Reactive Oxygen Species Suppress Cardiac  $NaV1.5$  Expression through Foxo1. *PLoS ONE*. 2012;7:e32738.
- Marijjanowski MM, Teeling P, Becker AE. Remodeling after myocardial infarction in humans is not associated with interstitial fibrosis of noninfarcted myocardium. *JAC*. 1997;30:76–82.
- Marsman RFJ, Bezzina CR, Freiberg F, Verkerk AO, Adriaens ME, Podliesna S, Chen C, Purfürst B, Spallek B, Koopmann TT, Baczko I, Remedios Dos CG, George AL, Bishopric NH, Lodder EM, de Bakker JMT, Fischer R, Coronel R, Wilde AAM, Gotthardt M, Remme CA. Cxsackie and adenovirus receptor is a modifier of cardiac conduction and arrhythmia vulnerability in the setting of myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:549–559.
- Martin CA, Grace AA, Huang CLH. Spatial and temporal heterogeneities are localized to the right ventricular outflow tract in a heterozygotic *Scn5a* mouse model. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2011;300:H605–H616.
- Martin CA, Grace AA, Huang CLH. Refractory dispersion promotes conduction disturbance and arrhythmias in a *Scn5a* +/- mouse model. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2011;462:495–504.
- Martin CA, Zhang Y, Grace AA, Huang CLH. Increased Right Ventricular Repolarization Gradients Promote Arrhythmogenesis in a Murine Model of Brugada Syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2010;21:1153–1159.
- Marzilli M, Merz CNB, Boden WE, Bonow RO, Capozza PG, Chilian WM, DeMaria AN, Guarini G, Huqi A, Morrone D, Patel MR, Weintraub WS. Obstructive Coronary Atherosclerosis and Ischemic Heart Disease: An Elusive Link! *JAC*. 2012;60:951–956.
- Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Remodeling of Cell-Cell and Cell-Extracellular Matrix Interactions at the Border Zone of Rat Myocardial Infarcts. *Circ Res*. 1999;85:1046–1055.

- McCord J, Jneid H, Hollander JE, de Lemos JA, Cercek B, Hsue P, Gibler WB, Ohman EM, Drew B, Philippides G, Newby LK. Management of Cocaine-Associated Chest Pain and Myocardial Infarction: A Scientific Statement From the American Heart Association Acute Cardiac Care Committee of the Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. 2008;117:1897–1907.
- McCurdy SM, Dai Q, Zhang J, Zamilpa R, Ramirez TA, Dayah T, Nguyen N, Jin YF, Bradshaw AD, Lindsey ML. SPARC mediates early extracellular matrix remodeling following myocardial infarction. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301:H497–H505.
- McDowell KS, Arevalo HJ, Maleckar MM, Trayanova NA. Susceptibility to Arrhythmia in the Infarcted Heart Depends on Myofibroblast Density. *Biophysj*. 2011;101:1307–1315.
- MD UP, PhD OPM, MD GSW. The 24-lead ECG display for enhanced recognition of STEMI-equivalent patterns in the 12-lead ECG. *J Electrocardiol*. 2014;:1–5.
- Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*. 2004;172:2731–2738.
- Meta-Analysis Research Group in Echocardiography (MeRGE) AMI Collaborators. Independent Prognostic Importance of a Restrictive Left Ventricular Filling Pattern After Myocardial Infarction: An Individual Patient Meta-Analysis: Meta-Analysis Research Group in Echocardiography Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 2008;117:2591–2598.
- Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:19725–19730.
- Mias C, Coatrieux C, Denis C, Genet G, Seguelas M-H, Laplace N, Rouzaud-Laborde C, Calise D, Parini A, Cussac D, Pathak A, Sénard J-M, Galés C. Cardiac Fibroblasts Regulate Sympathetic Nerve Sprouting and Neurocardiac Synapse Stability. *PLoS ONE*. 2013;8:e79068.
- Mill JG, Stefanon I, Santos dos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44:890–898.
- Minicucci MF, Azevedo PS, Ardisson LP, Okoshi K, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Zornoff LAM. Relevance of the ventricular remodeling pattern in the model of myocardial infarction in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95:635–639.
- Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS. IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2006;292:H1139–H1147.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:17533–17538.
- Mollema SA, Nucifora G, Bax JJ. Prognostic value of echocardiography after acute myocardial infarction. *Heart*. 2009;95:1732–1745.
- Møller JE, Hillis GS, Oh JK, Reeder GS, Gersh BJ, Pellikka PA. Wall motion score index and ejection fraction for risk stratification after acute myocardial infarction. *American Heart Journal*. 2006;151:419–425.
- Morrow DA, Antman EM, Charlesworth A, Cairns R, Murphy SA, de Lemos JA, Giugliano RP, McCabe CH, Braunwald E. TIMI Risk Score for ST-Elevation Myocardial Infarction: A Convenient, Bedside, Clinical Score for Risk Assessment at Presentation : An Intravenous nPA for Treatment of Infarcting Myocardium Early II Trial Substudy. *Circulation*. 2000;102:2031–2037.

Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Klein H, Levine JH, Saksena S, Waldo AL, Wilber D, Brown MW, Heo M. Improved survival with an implanted defibrillator in patients with coronary disease at high risk for ventricular arrhythmia. Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial Investigators. *N Engl J Med.* 1996;335:1933–1940.

Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML, Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II Investigators. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med.* 2002;346:877–883.

Mrcp CAM, Phd YZ, Phd AAG, Phd CLHH. In vivo studies of Scn5a<sup>+/-</sup> mice modeling Brugada syndrome demonstrate both conduction and repolarization abnormalities. *J Electrocardiol.* 2010;43:433–439.

Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na<sup>+</sup> channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci.* 2008;82:1210–1215.

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;87:425–456.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85:1205–1253.

Nian M. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res.* 2004;94:1543–1553.

Noels H, Weber C. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17:1410–1422.

Noorman M, Hakim S, Kessler E, Groeneweg JA, Cox MG PJ, Asimaki A, van Rijen HVM, van Stuijvenberg L, Chkourko H, Van der Heyden MAG, Vos MA, de Jonge N, van der Smagt JJ, Dooijes D, Vink A, de Weger RA, Varro A, de Bakker JMT, Saffitz JE, Hund TJ, Mohler PJ, Delmar M, Hauer RNW, van Veen TAB. Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *HRTHM.* 2013;10:412–419.

Oh Y-S, Jong AY, Kim DT, Li H, Wang C, Zemljic-Harpf A, Ross RS, Fishbein MC, Chen P-S, Chen LS. Spatial distribution of nerve sprouting after myocardial infarction in mice. *Heart Rhythm.* 2006;3:728–736.

Ohara T, Little WC. Evolving focus on diastolic dysfunction in patients with coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol.* 2010;25:613–621.

Ohlow M-A, Geller JC, Richter S, Farah A, Müller S, Fuhrmann JT, Lauer B. Incidence and predictors of ventricular arrhythmias after ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Emerg Med.* 2012;30:580–586.

Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya Y, Takigawa M, Tsuji T. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:2411–2422.

Olesen MS, Yuan L, Liang B, Holst AG, Nielsen N, Nielsen JB, Hedley PL, Christiansen M, Olesen SP, Haunsø S, Schmitt N, Jespersen T, Svendsen JH. High Prevalence of Long QT Syndrome Associated SCN5A Variants in Patients with Early-Onset Lone Atrial Fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;

Oliva A, Hu D, Viskin S, Carrier T, Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Wu Y, Burashnikov E, Brugada R, Rosso R, Guerchicoff A, Pollevick G, Pascali VL, Antzelevitch C. SCN5A mutation associated with acute myocardial infarction. *Leg Med (Tokyo)*. 2009;11 Suppl 1:S206–9.

Olson TM, Michels VV, Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, Horton SC, Rodeheffer RJ, Anderson JL. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA*. 2005;293:447–454.

Onganer PU, Seckl MJ, Djamgoz MBA. Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2005;93:1197–1201.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in Cardiology 4Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367:356–367.

Ørn S, Ueland T, Manhenke C, Sandanger Ø, Godang K, Yndestad A, Mollnes TE, Dickstein K, Aukrust P. Increased interleukin-1 $\beta$  levels are associated with left ventricular hypertrophy and remodelling following acute ST segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention. *Journal of Internal Medicine*. 2012;272:267–276.

Oxford EM, Musa H, Maass K, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res*. 2007;101:703–711.

Palaniyappan A, Uwiera RRE, Idikio H, Menon V, Jugdutt C, Jugdutt BI. Attenuation of increased secretory leukocyte protease inhibitor, matricellular proteins and angiotensin II and left ventricular remodeling by candesartan and omapatrilat during healing after reperfused myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2013;376:175–188.

Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, Perrot A, Geier C, Morano RDI, Bader M, Özcelik C. Connective Tissue Growth Factor Overexpression in Cardiomyocytes Promotes Cardiac Hypertrophy and Protection against Pressure Overload. *PLoS ONE*. 2009;4:e6743.

Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AEO, Huang CL-H, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:6210–6215.

Park TS, Hu Y, Noh HL, Drosatos K, Okajima K, Buchanan J, Tuinei J, Homma S, Jiang XC, Abel ED, Goldberg IJ. Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *The Journal of Lipid Research*. 2008;49:2101–2112.

Partemi S, Batlle M, Berne P, Berruezo A, Campos B, Mont L, Riuró H, Roig E, Pérez-Villa F, Ortiz J, Pascali VL, Oliva A, Brugada R, Brugada J. Analysis of the arrhythmogenic substrate in human heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2012;:1–8.

Peters NS, Wit AL. Myocardial Architecture and Ventricular Arrhythmogenesis. *Circulation*. 1998;97:1746–1754.

Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci*. 1996;90:447–452.

Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*. 1993;88:864–875.

Petitprez S, Zmoos AF, Ogrodnik J, Balse E, Raad N, El-Haou S, Albesa M, Bittihn P, Luther S, Lehnart SE, Hatem SN, Coulombe A, Abriel H. SAP97 and Dystrophin Macromolecular Complexes

- Determine Two Pools of Cardiac Sodium Channels Nav1.5 in Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011;108:294–304.
- Piccini JP, Berger JS, Brown DL. Early sustained ventricular arrhythmias complicating acute myocardial infarction. *Am J Med.* 2008;121:797–804.
- Pinto JM, Boyden PA. Electrical remodeling in ischemia and infarction. *Cardiovasc Res.* 1999;42:284–297.
- Platoshyn O, Remillard CV, Fantozzi I, Sison T, Yuan JXJ. Identification of functional voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 2005;451:380–387.
- Poelzing S, Forleo C, Samodell M, Dudash L, Sorrentino S, Anaclerio M, Troccoli R, Iacoviello M, Romito R, Guida P, Chahine M, Pitzalis M, Deschenes I. SCN5A Polymorphism Restores Trafficking of a Brugada Syndrome Mutation on a Separate Gene. *Circulation.* 2006;114:368–376.
- Poelzing S. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2004;287:H1762–H1770.
- Port JD, Walker LA, Polk J, Nunley K, Buttrick PM, Sucharov CC. Temporal expression of miRNAs and mRNAs in a mouse model of myocardial infarction. *Physiol Genomics.* 2011;43:1087–1095.
- Pratt CM, Moye LA. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial: background, interim results and implications. *Am J Cardiol.* 1990;65:20B–29B.
- Prieur X, Dollet L, Takahashi M, Nemani M, Pillot B, Le May C, Mounier C, Takigawa-Imamura H, Zelenika D, Matsuda F, Fève B, Capeau J, Lathrop M, Costet P, Cariou B, Magré J. Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bsc12/seipin-deficient mice. *Diabetologia.* 2013;56:1813–1825.
- Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu J-N, Mialet G, Demolombe S, Schott J-J, Baró I, Escande D, Le Marec H. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:643–652.
- Pudil R, Pidrman V, Krejsek J, Gregor J, Tichý M, Andrys C, Drahosová M. Cytokines and adhesion molecules in the course of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 1999;280:127–134.
- Qu Y, Rogers JC, Tanada TN, Catterall WA, Scheuer T. Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol.* 1996;108:375–379.
- Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786–794.
- Remme CA, Scicluna BP, Verkerk AO, Amin AS, van Brunschot S, Beekman L, Deneer VHM, Chevalier C, Oyama F, Miyazaki H, Nukina N, Wilders R, Escande D, Houlgatte R, Wilde AAM, Tan HL, Veldkamp MW, de Bakker JMT, Bezzina CR. Genetically Determined Differences in Sodium Current Characteristics Modulate Conduction Disease Severity in Mice With Cardiac Sodium Channelopathy. *Circ Res.* 2009;104:1283–1292.
- Remme CA, Bezzina CR. REVIEW: Sodium Channel (Dys)Function and Cardiac Arrhythmias. *Cardiovascular therapeutics.* 2010;28:287–294.

Rhett JM, Ongstad EL, Jourdan J, Gourdie RG. Cx43 Associates with Nav1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus. *Journal of Membrane Biology*. 2012;245:411–422.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J, on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Roger VL, Turner MB, On behalf of the American Heart Association Heart Disease and Stroke Statistics Writing Group. Heart Disease and Stroke Statistics--2011 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123:e18–e209.

Roman BB. Genetic background influences adaptation to cardiac hypertrophy and Ca<sup>2+</sup> handling gene expression. 2013;:1–7.

Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MFA. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res*. 2011;

Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni A-L, Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. 2005;111:1738–1746.

Rubart M. Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest*. 2005;115:2305–2315.

Russo AM, Stainback RF, Bailey SR, Epstein AE, Heidenreich PA, Jessup M, Kapa S, Kremers MS, Lindsay BD, Stevenson LW. ACCF/HRS/AHA/ASE/HFSA/SCAI/SCCT/SCMR 2013 Appropriate Use Criteria for Implantable Cardioverter-Defibrillators and Cardiac Resynchronization Therapy. *HRTM*. 2013;10:e11–e58.

Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ*. 2013;22:399–411.

Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksoen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013;99:164–174.

Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL, Taffet SM, Delmar M. Interactions Between Ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the Cardiac Intercalated Disc. *Circ Res*. 2011;109:193–201.

Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patino GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. Loss of Plakophilin-2 Expression Leads to Decreased Sodium Current and Slower Conduction Velocity in Cultured Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2009;105:523–526.

Schellings MWM, VANHOUTTE D, Swinnen M, Cleutjens JP, Debets J, van Leeuwen REW, d'Hooge J, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Sage EH, HEYMANS S. Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;206:113–123.

Schmidt A, Azevedo CF, Cheng A, Gupta SN, Bluemke DA, Foo TK, Gerstenblith G, Weiss RG, Marban E, Tomaselli GF, Lima JAC, Wu KC. Infarct Tissue Heterogeneity by Magnetic Resonance

- Imaging Identifies Enhanced Cardiac Arrhythmia Susceptibility in Patients With Left Ventricular Dysfunction. *Circulation*. 2007;115:2006–2014.
- Schott J-J, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AAM, Escande D, Mannens MMAM, Le Marec HE. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nature Genetics*. 1999;23:20–21.
- Schroeter A, Walzik S, Blechschmidt S, Haufe V, Benndorf K, Zimmer T. Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:16–24.
- Seferian A, Simonneau G. Dossier thématique. *La Presse Medicale*. 2014;43:935–944.
- Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res*. 2008;80:9–19.
- Shang LL, Sanyal S, Pfahnl AE, Jiao Z, Allen J, Liu H, Dudley SC. NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional regulation of the cardiac scn5a sodium channel by angiotensin II. *AJP: Cell Physiology*. 2008;294:C372–C379.
- Shang LL. Tandem Promoters and Developmentally Regulated 5'- and 3'-mRNA Untranslated Regions of the Mouse Scn5a Cardiac Sodium Channel. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;280:933–940.
- Shang LL, Pfahnl AE, Sanyal S, Jiao Z, Allen J, Banach K, Fahrenbach J, Weiss D, Taylor WR, Zafari AM, Dudley SC. Human heart failure is associated with abnormal C-terminal splicing variants in the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2007;101:1146–1154.
- Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *BBA - Molecular Cell Research*. 2012;:1–9.
- Sia YT, O'Meara E, Ducharme A. Role of echocardiography in acute myocardial infarction. *Curr Heart Fail Rep*. 2008;5:189–196.
- Siwik DA, Chang DLF, Colucci WS. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro. *Circ Res*. 2000;86:1259–1265.
- SM RPGM, MD EB. The Year in Acute Coronary Syndrome. *JAC*. 2014;63:201–214.
- Snetkov VA, Hirst SJ, Ward JP. Ion channels in freshly isolated and cultured human bronchial smooth muscle cells. *Exp Physiol*. 1996;81:791–804.
- Spear JF, Michelson EL, Spielman SR, Moore EN. The origin of ventricular arrhythmias 24 hours following experimental anterior septal coronary artery occlusion. *Circulation*. 1977;55:844–852.
- Srikanth S, Ambrose JA. Pathophysiology of coronary thrombus formation and adverse consequences of thrombus during PCI. *Curr Cardiol Rev*. 2012;8:168–176.
- St John Sutton M. Left Ventricular Remodeling and Ventricular Arrhythmias After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2003;
- Stanley WC. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol Rev*. 2005;85:1093–1129.

Stein M, van Veen TAB, Hauer RNW, de Bakker JMT, van Rijen HVM. A 50% Reduction of Excitability but Not of Intercellular Coupling Affects Conduction Velocity Restitution and Activation Delay in the Mouse Heart. *PLoS ONE*. 2011;6:e20310.

Stein M, van Veen TAB, Remme CA, Boulaksil M, Noorman M, van Stuijvenberg L, van der Nagel R, Bezzina CR, Hauer RNW, de Bakker JMT, van Rijen HVM. Combined reduction of intercellular coupling and membrane excitability differentially affects transverse and longitudinal cardiac conduction. *Cardiovasc Res*. 2009;83:52–60.

Steinbeck G, Andresen D, Seidl K, Brachmann J, Hoffmann E, Wojciechowski D, Kornacewicz-Jach Z, Sredniawa B, Lupkovics G, Hofgärtner F, Lubinski A, Rosenqvist M, Habets A, Wegscheider K, Senges J, IRIS Investigators. Defibrillator implantation early after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2009;361:1427–1436.

Stevenson WG, FRIEDMAN PL, Kocovic D, Sager PT, Saxon LA, Pavri B. Radiofrequency catheter ablation of ventricular tachycardia after myocardial infarction. *Circulation*. 1998;98:308–314.

Stokoe KS, Balasubramaniam R, Goddard CA, Colledge WH, Grace AA, Huang CLH. Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of *Scn5a*<sup>+/−</sup> murine hearts modelling the Brugada syndrome. *The Journal of physiology*. 2007;581:255–275.

Strege PR, mazzone A, kraichely RE, sha L, holm AN, ou Y, lim I, gibbons SJ, sarr MG, farrugia G. Species dependent expression of intestinal smooth muscle mechanosensitive sodium channels. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19:135–143.

Takamatsu T. Arrhythmogenic substrates in myocardial infarct. *Pathology International*. 2008;58:533–543.

Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM, Anderson ME, Balsler JR. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 2002;415:442–447.

Tao Z-Y, Cavasin MA, Yang F, Liu Y-H, Yang X-P. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci*. 2004;74:1561–1572.

TFELT-HANSEN J, WINKEL BG, GRUNNET M, JESPERSEN T. Inherited Cardiac Diseases Caused by Mutations in the *Nav1.5* Sodium Channel. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2010;21:107–115.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation*. 2012;126:2020–2035.

Thygesen K, Alpert JS, White HD, on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, TASK FORCE MEMBERS: Chairpersons: Kristian Thygesen (Denmark), Joseph S. Alpert (USA), Harvey D. White (New Zealand), Biomarker Group: Allan S. Jaffe, Coordinator (USA), Fred S. Apple (USA), Marcello Galvani (Italy), Hugo A. Katus (Germany), L. Kristin Newby (USA), Jan Ravkilde (Denmark), ECG Group: Bernard Chaitman, Co-ordinator (USA), Peter M. Clemmensen (Denmark), Mikael Dellborg (Sweden), Hanoch Hod (Israel), Pekka Porela (Finland), Imaging Group: Richard Underwood, Coordinator (UK), Jeroen J. Bax (The Netherlands), George A. Beller (USA), Robert Bonow (USA), Ernst E. Van Der Wall (The Netherlands), Intervention Group: Jean-Pierre Bassand, Co-ordinator (France), William Wijns, Coordinator (Belgium), T. Bruce Ferguson (USA), Philippe G. Steg (France), Barry F. Uretsky (USA), David O. Williams (USA), Clinical Investigation Group: Paul W. Armstrong, Coordinator (Canada), Elliott M. Antman (USA), Keith A. Fox (UK), Christian W. Hamm (Germany), E. Magnus

Ohman (USA), Maarten L. Simoons (The Netherlands), Global Perspective Group: Philip A. Poole-Wilson, Coordinator (UK), Enrique P. Gurfinkel (Argentina), Jose-Luis Lopez-Sendon (Spain), Prem Pais (India), Shanti Mendis (Switzerland), Jun-Ren Zhu (China), Implementation Group: Lars C. Wallentin Coordinator (Sweden), Francisco Fernandez-Aviles (Spain), Kim M. Fox (UK), Alexander N. Parkhomenko (Ukraine), Silvia G. Priori (Italy), Michal Tendera (Poland), Liisa-Maria Voipio-Pulkki (Finland), ESC COMMITTEE FOR PRACTICE GUIDELINES, Alec Vahanian, Chair (France), A. John Camm (UK), Raffaele De Caterina (Italy), Veronica Dean (France), Kenneth Dickstein (Norway), Gerasimos Filippatos (Greece), Christian Funck-Brentano (France), Irene Hellemans (The Netherlands), Steen Dalby Kristensen, DOCUMENT REVIEWERS, Joao Morais, Review Coordinator (Portugal), Sorin Brener (USA), Robert Harrington (USA), David Morrow (USA), Udo Sechtem (Germany), Michael Lim (Singapore), Marco A. Martinez-Rios (Mexico), Steve Steinhubl (USA), Glen N. Levine (USA), W. Brian Gibler (USA). Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation*. 2007;116:2634–2653.

Tomaselli GF, Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;42:270–283.

Turner NA. Effects of interleukin-1 on cardiac fibroblast function: relevance to post-myocardial infarction remodelling. *Vascular Pharmacology*. 2014;60:1–7.

Ufret-Vincenty CA. Role of Sodium Channel Deglycosylation in the Genesis of Cardiac Arrhythmias in Heart Failure. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:28197–28203.

Vachiéry J-L, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galiè N, Ghio S, Gibbs JSR, Martinez F, Semigran M, Simonneau G, Wells A, Seeger W. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D100–8.

Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ, Makielski JC. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:475–483.

VANHOUTTE D, SCHELLINGS M, PINTO Y, HEYMANS S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. *Cardiovasc Res*. 2006;69:604–613.

Vasquez C, Mohandas P, Louie KL, Benamer N, Bapat AC, Morley GE. Enhanced Fibroblast-Myocyte Interactions in Response to Cardiac Injury. *Circ Res*. 2010;107:1011–1020.

van Veen TAB, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CL-H, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JMT, van Rijen HVM. Impaired impulse propagation in Scn5a-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation*. 2005;112:1927–1935.

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS. Reactive Oxygen Species-Activated Ca/Calmodulin Kinase II Is Required for Late INa Augmentation Leading to Cellular Na and Ca Overload. *Circ Res*. 2011;108:555–565.

Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest*. 2006;116:3127–3138.

Wang H, Eitzman DT. Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;229:18–22.

- Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. Genomic Organization of the Human SCN5A Gene Encoding the Cardiac Sodium Channel. *Genomics*. 1996;34:9–16.
- Watson CL, Gold MR. Modulation of Na<sup>+</sup> current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells. *Circ Res*. 1997;81:380–386.
- Weiss RG, Maslov M. Normal myocardial metabolism: fueling cardiac contraction. *Adv Stud Med*. 2004;4:S457–S463.
- Wellens HJJ, Schwartz PJ, Lindemans FW, Buxton AE, Goldberger JJ, Hohnloser SH, Huikuri HV, Kääh S, La Rovere MT, Malik M, Myerburg RJ, Simoons ML, Swedberg K, Tijssen J, Voors AA, Wilde AA. Risk stratification for sudden cardiac death: current status and challenges for the future. *European Heart Journal*. 2014;35:1642–1651.
- van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*. 2008;29:2909–2945.
- Wingo TL, Shah VN, Anderson ME, Lybrand TP, Chazin WJ, Balsler JR. An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11:219–225.
- Xiao GQ, Qu Y, Sun ZQ, Mochly-Rosen D, Boutjdir M. Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Na(+) channels. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2001;281:C1477–86.
- Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 2004;279:39513–39519.
- Yan AT. Characterization of the Peri-Infarct Zone by Contrast-Enhanced Cardiac Magnetic Resonance Imaging Is a Powerful Predictor of Post-Myocardial Infarction Mortality. *Circulation*. 2006;114:32–39.
- Yan GX. Phase 2 Reentry as a Trigger to Initiate Ventricular Fibrillation During Early Acute Myocardial Ischemia. *Circulation*. 2004;110:1036–1041.
- Yang EH, Brilakis ES, Reeder GS, Gersh BJ. Modern Management of Acute Myocardial Infarction. *Current Problems in Cardiology*. 2006;31:769–817.
- Yang P. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res*. 2004;61:56–65.
- Yang Y, Ma Y, Han W, Li J, Xiang Y, Liu F, Ma X, Zhang J, Fu Z, Su Y-D, Du X-J, Gao X-M. Age-related differences in postinfarct left ventricular rupture and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H1815–22.
- Yildiz A, Okcun B, Peker T, Arslan C, Olcay A, Bulent Vatan M. Prevalence of Coronary Artery Anomalies in 12,457 Adult Patients Who Underwent Coronary Angiography. *Clin Cardiol*. 2010;33:E60–E64.
- Young KA, Caldwell JH. Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *The Journal of physiology*. 2005;565:349–370.

- Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol*. 1998;275:H250–8.
- Zaman S, Kovoor P. Sudden cardiac death early after myocardial infarction: pathogenesis, risk stratification, and primary prevention. *Circulation*. 2014;129:2426–2435.
- Zhang Y, Kanter EM, Yamada KA. Remodeling of cardiac fibroblasts following myocardial infarction results in increased gap junction intercellular communication. *Cardiovascular Pathology*. 2010;19:e233–e240.
- Zhang Y, Kanter EM, Laing JG, Aprhys C, Johns DC, Kardami E, Yamada KA. Connexin43 Expression Levels Influence Intercellular Coupling and Cell Proliferation of Native Murine Cardiac Fibroblasts. *Cell Commun Adhes*. 2008;15:289–303.
- Zhang Y, Takagawa J, Sievers RE, Khan MF, Viswanathan MN, Springer ML, Foster E, Yeghiazarians Y. Validation of the wall motion score and myocardial performance indexes as novel techniques to assess cardiac function in mice after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1187–92.
- Zhou J. Phosphorylation and Putative ER Retention Signals Are Required for Protein Kinase A-Mediated Potentiation of Cardiac Sodium Current. *Circ Res*. 2002;91:540–546.
- Zhou R, Hang P, Zhu W, Su Z, Liang H, Du Z. Whole genome network analysis of ion channels and connexins in myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27:299–304.
- Zhou S. Mechanisms of Cardiac Nerve Sprouting After Myocardial Infarction in Dogs. *Circ Res*. 2004;95:76–83.
- Zicha S, Maltsev VA, Nattel S, Sabbah HN, Undrovinas AI. Post-transcriptional alterations in the expression of cardiac Na<sup>+</sup> channel subunits in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:91–100.

---

## RESUME

### **Etude des implications du gène SCN5A dans les arythmies et les remodelages ventriculaires post ischémiques observés suite à un infarctus du myocarde chez un modèle murin de ligature coronaire permanente.**

Le canal sodique voltage dépendant Nav1.5, codé par le gène SCN5A, joue un rôle primordial dans l'activité électrique du cœur. Des pathologies cardiaques sont associées à des mutations pour ce gène. De plus, des modifications de l'expression et/ou de l'activité de Nav1.5 ont été rapportées au cours de l'insuffisance cardiaque. De rares cas cliniques suggèrent l'existence d'un lien entre des mutations du gène SCN5A, une pathologie coronarienne, et l'augmentation de l'incidence des arythmies ventriculaires potentiellement associés à la survenue de mort subite cardiaque. L'objectif de mon travail de thèse a été de confirmer ce lien dans le but d'identifier une nouvelle population à risque.

Par une étude réalisée chez la souris, nous avons pu montrer une augmentation de l'incidence des arythmies ventriculaires au cours des 24 premières heures suite un infarctus du myocarde, induit par ligature permanente de l'artère coronaire gauche ascendante, chez des animaux invalidés à l'état hétérozygote pour le gène SCN5A. De plus, j'ai pu identifier un profil inflammatoire supérieur et une réserve de conduction plus diminuée chez ces mêmes animaux. Ces observations laissent présager un remodelage cardiaque post ischémique plus sévère comme le suggèrent nos données préliminaires. Au cours de ce travail, nous avons aussi pu mettre en évidence une expression et une fonctionnalité pour le canal Nav1.5 au niveau pulmonaire. Ce nouveau siège d'expression pourrait avoir des répercussions potentielles lors de la mise en place d'un remodelage post ischémique.

Parallèlement à ce travail, j'ai été amené à caractériser un nouveau modèle transgénique murin surexprimant la mutation humaine T220I pour Nav1.5.

**Mots-clés :** SCN5A, Nav1.5, infarctus du myocarde, arythmies ventriculaires, remodelages cardiaques, insuffisance cardiaque, mort subite cardiaque et stratification du risque.

## ABSTRACT

### **Study of the implications of SCN5A gene in the occurrence of ventricular arrhythmias and post ischemic remodelling after myocardial infarction in a permanent coronary ligation model in mice**

The voltage dependant sodium channel Nav1.5, encoded by the gene SCN5A, plays an essential role for the electrical activity of the heart. Cardiac congenital disorders are associated with mutations for this gene. Moreover, several modifications of the expression and the activity of Nav1.5 have been reported during heart failure. Several clinical cases suggest a link between mutations of SCN5A, coronary heart disease, and an increase of the occurrence of ventricular arrhythmic storms associated with sudden cardiac death. The aim of this study was to validate this link for the identification of a new population at risk.

By a preclinical study, we have observed an elevation of ventricular arrhythmias during the first 24 hours after a myocardial infarction on mouse model invalidated at the heterozygous state for the gene SCN5A. In the same time, we are characterized a pro inflammatory pattern and a more reduced reserve of conduction in these KO mice. The observations suggest a more severe ischemic cardiac remodelling, which seem to be confirmed by preliminary data. In this framework, we have also identified an expression and functionality for Nav1.5 in lungs. This new seat of expression for Nav1.5 could have some repercussions in the setting of post ischemic remodelling.

In the same time, I contribute to characterize a new knock-in mouse model for the human T220I mutation for Nav1.5.

**Key-words:** SCN5A, Nav1.5, myocardial infarction, ventricular arrhythmias, cardiac remodelling, heart failure, sudden cardiac death and risk stratification

---