



HAL
open science

Étude pathophysiologique de la fibrillation atriale : approche multifacette

Élodie Morel

► **To cite this version:**

Élodie Morel. Étude pathophysiologique de la fibrillation atriale : approche multifacette. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10350 . tel-00729075

HAL Id: tel-00729075

<https://theses.hal.science/tel-00729075v1>

Submitted on 7 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES ET SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 21 décembre 2010

par

Melle MOREL Elodie

TITRE :

**ETUDE PATHOPHYSIOLOGIQUE DE LA
FIBRILLATION ATRIALE –
APPROCHE MULTIFACETTE**

Directeur de thèse : Mr Philippe Chevalier

JURY :

Mr Dominique Babuty
Mr Jean-Sylvain Hermida
Mr Jean-Marc Davy
Mr Gilles Millat
Mr Jean-Yves Le Heuzey
Mme Françoise Thivolet-Bejui

REMERCIEMENTS

A Mr Philippe Chevalier,

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Philippe Chevalier de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de son service.

Je vous remercie d'avoir encadré ce projet de thèse. Vos conseils, vos critiques et votre soutien m'ont toujours été très précieux. Je tiens aussi à vous témoigner toute ma reconnaissance pour m'avoir fait confiance et m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire il y a quelques années pour participer à vos projets de recherche. Vous m'avez permis de construire et d'orienter mon avenir professionnel.

Aux rapporteurs de ma thèse,

Je remercie grandement Mr Dominique Babuty, Mr Jean-Marc Davy et Mr Sylvain Hermida d'avoir accepté de juger ce travail. Votre lecture attentive et vos critiques m'ont permis d'améliorer le manuscrit. Je souhaite vous remercier sincèrement de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse.

A Mme Thivolet-Bejui et Mr Gilles Millat

Je remercie également Mme Françoise Thivolet-Bejui et Mr Gilles Millat d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse. Mme Thivolet-Bejui, vous avez été à l'origine de l'orientation de nos recherches vers les cellules interstitielles de Cajal et m'avez ainsi permis de commencer mes travaux avec des résultats qui se sont révélés concluants. Gilles, merci pour tes conseils et ta disponibilité. Un grand merci également à toute ton équipe de techniciennes pour nos nombreuses collaborations.

David Meyronet

Tu as été en quelque sorte mon deuxième directeur de thèse puisque tu m'as encadrée pour toute la partie histologique et immunohistochimique de ce travail. Ton expertise dans ce domaine m'a été précieuse. Cette collaboration a été un plaisir.

A toute l'équipe du laboratoire d'anatomopathologie,

Mes remerciements vont tout particulièrement à Eudeline, Corinne et l'ensemble des techniciennes du laboratoire d'anatomopathologie pour leur accueil et leur efficacité à

préparer mes lames ! Merci encore pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A l'équipe de ProfileXpert,

J'exprime également toute ma reconnaissance à Mr Joel Lachuer et toute son équipe de la plateforme ProfileXpert pour leur participation à l'étude transcriptomique. Un merci tout particulier à Séverine Croze pour toute la partie manip et à Nicolas Nazaret pour sa précieuse aide avec le logiciel Ingenuity.

Au centre commun d'imagerie de Laënnec,

Simone Peyrol et Elisabeth Errazuriz, un grand merci pour votre aide dans le traitement des échantillons et l'analyse de toutes ces images de microscopie électronique.

Au centre commun de quantimétrie,

Un grand merci également à Mr Yves Tourneur et Anne Beghin pour m'avoir fait découvrir la quantimétrie automatique.

Alina, Carine, Christine, Valérie, Tianyi, mes collègues de choc

Je suis très contente d'avoir travaillé ou de travailler avec vous au quotidien! Je tiens à vous remercier pour votre aide et votre soutien tout au long de ma thèse.

A toutes les personnes non citées qui ont participé de près ou de loin à l'ensemble de ces travaux, un grand merci. Votre aide et votre soutien n'ont pu rendre mon travail que meilleur.

A toute ma famille, à Nico

Encore merci pour votre soutien tout au long de ces années d'études.

RESUME en français

La fibrillation atriale (FA) est l'arythmie cardiaque la plus couramment rencontrée en pratique clinique. Sa pathophysiologie étant encore mal connue, elle est difficile à traiter. Plusieurs paramètres ont été décrits comme impliqués dans l'initiation de la fibrillation atriale ; cependant, les mécanismes précis d'initiation de la fibrillation atriale ne sont pas élucidés.

Dans cette étude, des approches histologiques, biochimiques, transcriptomiques et génétiques seront abordées afin d'identifier les substrats intervenant dans l'initiation de la fibrillation atriale humaine.

Ainsi, il a été mis en évidence des cellules interstitielles de type Cajal au sein des manchons myocardiques des veines pulmonaires pouvant être à l'origine des foyers ectopiques, une possible origine embryonnaire précoce via l'absence d'expression du gène *pitx2* chez les patients en fibrillation atriale, une surexpression des voies du système nerveux autonome à la fois adrénergique et cholinergique, une modification du flux potassique du courant I_{Ks} via une intervention des protéines régulatrices KCNE et de protéines du cytosquelette musculaire. De plus, une des complications de la fibrillation atriale est la survenue d'accidents vasculaires cérébraux ; il a été montré dans cette étude une surexpression au niveau de l'oreillette gauche du facteur Von Willebrand chez les patients en fibrillation atriale ainsi qu'une augmentation du VEGF sérique dans la forme paroxystique de la fibrillation atriale.

Ces nouvelles données permettent d'accroître les connaissances de la fibrillation atriale et d'envisager par la suite la possibilité de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

TITRE en anglais

Pathophysiological study of atrial fibrillation – multifaceted approach

RESUME en anglais

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia encountered in clinical practice. As its pathophysiology is still poorly understood, it is difficult to treat. Several parameters have been described as involved in the initiation of atrial fibrillation, but the precise mechanisms of initiation of atrial fibrillation are not understood. In this study, histological, biochemical, genetic and transcriptomic approaches have been performed in order to identify the substrates involved in the initiation of human atrial fibrillation.

Thus, it has been demonstrated presence of interstitial cells Cajal-like in myocardial sleeves of pulmonary veins that may be the cause of ectopic foci, a possible early embryonic origin through lack of expression of the *pitx2* gene in atrial fibrillation patients, overexpression of the autonomic nervous system to both adrenergic and cholinergic pathways, a change in the flow of potassium current I_{Ks} through intervention of KCNE regulatory proteins and cytoskeletal muscle protein. In addition, a complication of atrial fibrillation is the occurrence of stroke. It has been shown at left atrial level an overexpression of Von Willebrand factor in patients with atrial fibrillation and an increase of serological VEGF in paroxysmal subtype of atrial fibrillation.

These new data allow completing the knowledge on atrial fibrillation and subsequently considering the possibility of new therapeutic strategies that could be more effective.

DISCIPLINE

Cardiologie

MOTS-CLES

Fibrillation atriale ; Histologie ; Transcriptome ; Génétique ; Cellules interstitielles de Cajal ;
Système nerveux autonome ; courants ioniques ; inflammation

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Service de rythmologie, Hôpital cardiologique Louis Pradel. EA4171 Méthodologie de
traitement de l'information en cardiologie

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

I. EPIDEMIOLOGIE DE LA FIBRILLATION ATRIALE	1
A. DEFINITION DE LA FIBRILLATION ATRIALE	1
1. <i>Caractéristiques électriques</i>	1
2. <i>Electrophysiologie de la fibrillation atriale</i>	2
B. CLASSIFICATION DES FIBRILLATIONS ATRIALES	7
1. <i>Fibrillation atriale nouvellement diagnostiquée</i>	8
2. <i>Fibrillation atriale paroxystique</i>	9
3. <i>Fibrillation atriale persistante</i>	9
4. <i>Fibrillation atriale persistante de longue date</i>	9
5. <i>Fibrillation atriale permanente</i>	9
6. <i>Evolution d'une forme à une autre</i>	9
C. SYMPTOMES DE LA FIBRILLATION ATRIALE.....	12
D. INCIDENCE ET PREVALENCE DES FIBRILLATIONS ATRIALES.....	12
1. <i>Prévalence</i>	12
2. <i>Ethnie</i>	13
3. <i>Données en fonction de l'âge et du sexe</i>	13
4. <i>Fibrillation atriale post-opératoire</i>	15
E. EPIDEMIOLOGIE DES CO-MORBIDITES.....	15
1. <i>Risque de morbi-mortalité</i>	15
2. <i>Cardiopathies associées – Facteurs de risque</i>	16
3. <i>Fibrillation atriale et hypertension</i>	16
4. <i>Fibrillation atriale et insuffisance cardiaque</i>	17
5. <i>Fibrillation atriale et obésité / syndrome métabolique</i>	17
F. COMPLICATIONS DE LA FIBRILLATION ATRIALE	19
1. <i>Risques à long terme</i>	19
2. <i>La fibrillation atriale engendre la fibrillation atriale</i>	20
3. <i>Complications thromboemboliques</i>	21
4. <i>Insuffisance cardiaque</i>	22
G. TRAITEMENTS.....	22
1. <i>Thérapie médicamenteuse</i>	22
2. <i>Technique d'ablation</i>	23
H. COUT DE LA PRISE EN CHARGE	24
II. FACTEURS DE PREDISPOSITION A LA FIBRILLATION ATRIALE	25
A. LES TROIS PRINCIPAUX FACTEURS DE PREDISPOSITION– TRIANGLE DE COUMEL	25
B. IMPORTANCE DES VEINES PULMONAIRES DANS LA FIBRILLATION ATRIALE.....	26
C. INNERVATION	28
1. <i>Le système nerveux cardiaque</i>	29
2. <i>Fibrillation atriale vagale et Fibrillation atriale adrénérergique</i>	32
3. <i>Rôle du baroréflexe</i>	34
4. <i>Relation entre le système nerveux autonome, l'hypertension et la fibrillation atriale</i>	35
D. FOYERS DE DECHARGE ECTOPIQUES	36
E. MICRO-REENTREES.....	37
1. <i>Circuits de re-entrée</i>	37
2. <i>Nœud sino-atrial et fibrillation atriale</i>	38
3. <i>Anisotropie</i>	38
F. INFLAMMATION	46
G. ASPECTS GENETIQUES DE LA FIBRILLATION ATRIALE	48
1. <i>Aspect génétique</i>	48
2. <i>Les différents locus</i>	49
3. <i>Principales mutations identifiées</i>	51
H. PERPETUATION DE LA FIBRILLATION ATRIALE.....	64
1. <i>Remodelage électrique</i>	64
2. <i>Remodelage anatomique</i>	65
3. <i>La fibrose</i>	66

4. Surcharge hémodynamique.....	67
III. ETUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA FIBRILLATION ATRIALE : APPROCHE MULTIFACETTE	69
A. ETUDE HISTOLOGIQUE.....	69
1. Constitution de la banque de tissus humains.....	69
2. Analyse structurale	72
3. Identification de cellules interstitielles de type Cajal (CITC)	84
B. ETUDE DE L'INFLAMMATION DANS LA FIBRILLATION ATRIALE	109
1. Contexte	109
2. Protocole d'étude.....	109
3. Plan expérimental.....	110
4. Investigations biologiques	111
5. Concentrations en cytokines chez les patients en fibrillation atriale	113
C. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA FIBRILLATION ATRIALE.....	120
1. Rappel sur le transcriptome.....	120
2. Données connues sur le transcriptome des oreillettes de patients en fibrillation atriale	123
3. Analyse du profil transcriptomique de tissus cardiaques de patients en fibrillation atriale.....	125
D. ETUDE GENETIQUE D'UNE FIBRILLATION ATRIALE FAMILIALE	147
1. Données cliniques.....	147
2. Principe de l'analyse génomique par recherche de zones d'intérêt et de gènes candidats	149
3. Identification du gène <i>KCNE1L</i> au sein de la famille de fibrillation atriale.....	151
Fibrillation atriale et hyperthyroïdie	156
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	159
A. SYNTHÈSE DES RESULTATS.....	159
B. PERSPECTIVES	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	165
ANNEXES.....	205

Liste des figures

Figure 1 : Electrocardiogramme d'un patient en fibrillation atriale.....	1
Figure 2: les potentiels d'action cardiaques	2
Figure 3: le potentiel d'action cardiaque à réponse rapide.....	3
Figure 4: Durée du potentiel d'action normal versus en fibrillation atriale.	4
Figure 5 : Mécanisme de la fibrillation atriale (FA).	5
Figure 6: Déterminants ioniques de la fibrillation atriale..	7
Figure 7: Les différents types de fibrillation atriale.....	8
Figure 8: Evolution des fibrillations atriales	10
Figure 9: Evolution de fibrillation atriale paroxystique en fibrillation atriale permanente en fonction des conditions concomitantes connues pour favoriser la fibrillation atriale.....	10
Figure 10: Courbe de survie chez des patients avec fibrillation atriale isolée.	11
Figure 11: Projection du nombre de patients en fibrillation atriale entre 2000 et 2050.....	12
Figure 12: Incidence de la fibrillation atriale	13
Figure 13: Tendances, spécifique au sexe, de l'incidence de la fibrillation atriale.....	14
Figure 14: Répartition du nombre de patients en fibrillation atriale par âge.	14
Figure 15: Fréquence cumulée d'incidence de fibrillation atriale basée sur les interactions entre l'indice de masse corporelle (IMC) et l'indice Apnée-Hypopnée..	19
Figure 16: Migration d'un thrombus	21
Figure 17: Principe de la technique d'ablation par radiofréquence	23
Figure 18: Facteurs de prédisposition à la fibrillation atriale.....	26
Figure 19: Foyers arythmogènes et fibrillation atriale.....	27
Figure 20: Diagramme représentant les sites des foyers de déclenchement de fibrillation atriale.....	28
Figure 21: Régulation autonome de la fonction cardiovasculaire.....	31
Figure 22 : Schéma d'une jonction gap.....	39
Figure 23: Modèle à deux étapes pour la formation du myocarde pulmonaire.....	42
Figure 24: Localisation chromosomique d'un gène	50
Figure 25 : potentiel d'action au niveau de l'oreillette et du ventricule	53
Figure 26: Coupe d'une veine pulmonaire – Coloration au Trichrome	74
Figure 27: Reconstructions graphiques de veines pulmonaires	75
Figure 28: Jonction OG-VP de type 1	77
Figure 29: Jonction OG-VP de type 2.....	78
Figure 30: Jonction OG-VP de type 3	79
Figure 31: Jonction OG-VP de type 4.....	79
Figure 32: Immunomarquage de l'acétylcholinestérase au niveau de la jonction VP-OG chez le porc (A) et chez le chien (B).	83
Figure 33: Distribution circonférentielle des nerfs autonomes à la jonction VP-OG	83
Figure 34: Photo d'une cellule interstitielle de type Cajal dans une veine pulmonaire humaine par immunomarquage avec l'anticorps anti-cKit.	88
Figure 35: Photo d'une cellule interstitielle de type Cajal dans une veine pulmonaire humaine par immunomarquage à l'anticorps anti-cKit.....	88
Figure 36: immunomarquage d'une cellule interstitielle de type Cajal à l'HCN4.....	91
Figure 37 : Images d'une cellule interstitielle en microscopie électronique à transmission sur une coupe de veine pulmonaire humaine.	92
Figure 38: Immunomarquage de cellules interstitielles en culture à partir de prélèvement tissulaire de jonction VP-OG.	96
Figure 39: Immunomarquage de myocytes en culture à partir de prélèvement tissulaire de jonction VP-OG.....	97

Figure 40: représentation du développement et de la plasticité des cellules interstitielles de Cajal.	98
Figure 41: Réseau tridimensionnel des cellules interstitielles de Cajal (CIC) avec les cellules environnantes	100
Figure 42: Modèle quadridimensionnel des cellules interstitielles de type Cajal et des cellules environnantes	101
Figure 43 : Modèle de mécanisme de propagation d'ondes lentes des cellules interstitielles de Cajal.	105
Figure 44: schéma du déroulement de l'étude REMI	111
Figure 45: Principe du dosage par la technique ELISA Sandwich	112
Figure 46: Niveaux sériques de VEGF, en fonction du type de fibrillation atriale.....	117
Figure 47: Concentrations sériques en VEGF dans la veine pulmonaire supérieure, l'oreillette gauche et le sinus coronaire chez des patients en fibrillation atriale.	118
Figure 48: Mécanismes impliqués du gène à la protéine	121
Figure 49 : Principe de l'analyse transcriptomique.....	122
Figure 50: Puce Affymetrix hgu133p.....	123
Figure 51: Structure d'une fibre musculaire	136
Figure 52: Interaction actine-myosine.....	138
Figure 53: Proposition d'interactions entre les différentes fonctions biologiques au cours de la fibrillation atriale.....	146
Figure 54: Arbre généalogique de la famille de fibrillation atriale.....	148
Figure 55: Principe du protocole d'analyse génétique	150
Figure 56: Région génomique du gène <i>kcnell</i> et les polymorphismes environnants.	152
Figure 57: Expression relative des gènes <i>kcnq1</i> et <i>kcne</i> dans le cœur humain par RT-PCR.	154
Figure 58: Effets de l'hormone thyroïdienne sur la durée du potentiel d'action (PA) de cardiomyocytes d'une veine pulmonaire (VP).	156
Figure 59: Proposition du mécanisme de la physiopathologie de la fibrillation atriale à partir des données de la littérature et des données de cette présente étude.....	161

Liste des tableaux

Tableau 1: Risque d'installation de nouvelle fibrillation atriale en fonction de l'IMC.....	18
Tableau 2 : Principales mutations mises en évidence dans la fibrillation atriale.....	63
Tableau 3: Données cliniques des patients participants à la banque de tissus cardiaques.....	71
Tableau 4: Organisation des couches de la paroi du cœur et des vaisseaux	73
Tableau 5: Pourcentage de la circonférence de la veine pulmonaire recouverte du manchon myocardique.....	75
Tableau 6: Tableau récapitulatif des patterns des veines pulmonaires des sept patients	80
Tableau 7: Nombre de CITC au niveau des jonctions OG-VP et des veines pulmonaires.....	89
Tableau 8: Données cliniques des patients de l'étude REMI.....	114
Tableau 9: Concentration des marqueurs de l'inflammation en fonction du type de fibrillation atriale.....	116
Tableau 10: Tableau récapitulatif des échantillons analysés en transcriptomique.....	125
Tableau 11: Biofonctions dérégulées chez les patients en fibrillation atriale.....	128
Tableau 12: Principaux gènes dérégulés dans le tissu atrial/veine pulmonaire chez les patients en fibrillation atriale.....	129
Tableau 13: Données cliniques de la famille atteinte de fibrillation atriale.....	149

ABREVIATIONS

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine
AChE : acétylcholine estérase
ADN : acide désoxyribonucléique
AGT : angiotensinogène
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine triphosphate
AV : auriculo-ventriculaire
AVC : accident vasculaire cérébral
Ca²⁺ : calcium
CF : cœur fœtal
ChAT : acétylcholine transférase
CHO : cellules d'ovaires de hamster chinois
CIC : cellule interstitielle de Cajal
CIC-MY : cellule interstitielle de Cajal myentérique
CITC : cellule interstitielle de type Cajal
CPP : comité de protection des personnes
CRP : protéine C réactive
Cx : connexine
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
Erk : kinase régulée par des signaux extracellulaires (Extracellular signal-regulated kinases)
FA : fibrillation atriale
HBSS : Solution saline tamponnée de Hank (Hank's Buffered Salt Solution)
HCN : canal activé par l'hyperpolarisation (Hyperpolarisation-activated Channel)
HCN4 : hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Hsp : Protéine de choc thermique (heat shock protein)
IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion
I_f : courant funny calcique entrant
I_k : courant potassique
I_{k1} : courant potassique entrant de rectification
I_{KACH} : courant potassique entrant de rectification activé par l'acétylcholine
I_{KATP} : courant potassique entrant de rectification activé par la baisse de la concentration intracellulaire d'ATP
I_{kr} : composante rapide du courant potassique sortant tardif de rectification I_k
I_{ks} : composante lente du courant potassique sortant tardif de rectification I_k
I_{kur} : courant potassique ultrarapide sortant
IMC : indice de masse corporelle
I_{Na} : courant sodique
K⁺ : potassium
LQT : QT long
MAP kinase : protéine kinase activée par des mitogènes (Mitogen-Activated Protein Kinase)
Mg²⁺ : magnésium
MgCl₂ : chlorure de magnésium
MMP : métalloprotéase
Na⁺ : sodium
NAPDH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF : neurofilament
NO : monozyde d'azote
NOS : nitric oxide synthase
OD : oreillette droite
OG : oreillette gauche
PA : potentiel d'action
PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)
PCR : polymerase chain reaction
PFA : paraformaldéhyde
PKA : protéine kinase A
PR : période réfractaire
PRE : période réfractaire effective
Rpm : rotation par minute
RS : Réticulum sarcoplasmique
RS : rythme sinusal
RT-PCR : réaction en chaîne par polymerase après réverse transcription
RyR : récepteur à la ryanodine
SA : sino-atrial
SERCA : pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique
SMA : actine de muscle lisse (smooth muscle actin)
SNA : système nerveux autonome
SVF : serum de veau foetal
TGF : facteur de croissance (Transforming growth factor)
TH : hormone thyroïdienne
TIMP : inhibiteur de métalloprotéase
TnI : troponine I
TnT : troponine T
TSH : thyrostimuline (thyroid stimulating hormone)
VD : ventricule droit
VEGF : facteur de croissance vasculaire endothélial
VG : ventricule gauche
VP : veine pulmonaire
VPID : veine pulmonaire inférieure droite
VPIG : veine pulmonaire inférieure gauche
VPSD : veine pulmonaire supérieure droite
VPSG : veine pulmonaire supérieure gauche
WPW : Wolff Parkinson White

ETUDE PATHOPHYSIOLOGIQUE DE LA FIBRILLATION ATRIALE – APPROCHE MULTIFACETTE

I. Epidémiologie de la fibrillation atriale

A. Définition de la fibrillation atriale

1. Caractéristiques électriques

La fibrillation atriale (FA) est l'arythmie cardiaque la plus fréquente dans la population générale [1-3]. Elle correspond à une activation électrique rapide et désynchronisée des myocytes atriaux. Ce rythme se traduit par une incompétence hémodynamique atriale.

Sur l'électrocardiogramme (ECG) (figure 1), les ondes d'activation de l'oreillette correspondent à des oscillations rapides dont l'amplitude, la forme et la durée varient.

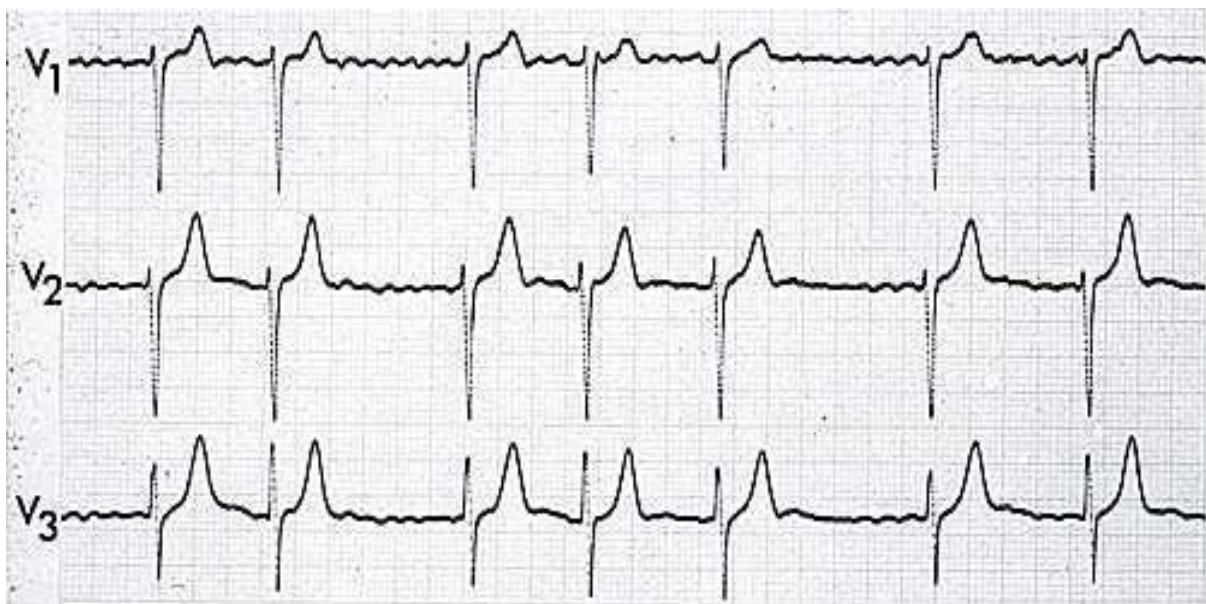


Figure 1 : Electrocardiogramme d'un patient en fibrillation atriale.

2. Electrophysiologie de la fibrillation atriale

a. Rappel d'électrophysiologie cellulaire cardiaque

Le potentiel d'action (PA) cellulaire correspond aux variations du potentiel membranaire consécutives à un stimulus. La dépolarisation spontanée se produit à partir des cellules douées d'automatisme (cellules pace-maker) propagé de proche en proche grâce aux connexions intercellulaires (gap jonctions).

On décrit schématiquement deux types de potentiel d'action qui diffèrent par leurs caractéristiques électriques, leur forme et la nature des échanges ioniques :

- les potentiels d'action à réponse rapide (myocarde atrial, myocarde ventriculaire et réseau de Purkinje),
- les potentiels d'action à réponse lente (cellules des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire) (figure 2).

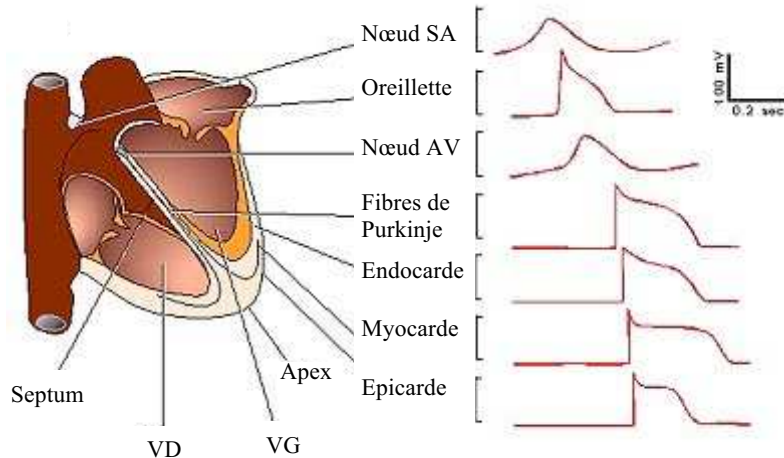


Figure 2: les potentiels d'action cardiaques
(AV : auriculo-ventriculaire ; SA : sino-atrial ; VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit)

Au niveau du myocarde atrial, on retrouve ainsi un potentiel d'action à réponse rapide. Celui-ci comporte quatre phases (figure 3) :

- La phase initiale (phase 0) est engendrée par l'entrée de sodium (Na^+) dans la cellule (courant I_{Na}) grâce à l'ouverture de canaux sodiques avec inversion du potentiel qui devient positif (+ 30 mV).

- Après la phase 0 rapide et l'inactivation des canaux sodiques, survient le plateau du potentiel d'action. Les phases 1 et 2 correspondent à une repolarisation rapide puis à une repolarisation lente. Cette phase résulte de l'équilibre entre le courant entrant de calcium (I_{Ca}) et le courant sortant de potassium (I_K). Cette phase correspond à un état d'inexcitabilité cardiaque appelé période réfractaire (PR).
- La phase 3 (repolarisation rapide) est due à une sortie accélérée de potassium avec un retour progressif du potentiel d'action à la valeur du potentiel de repos.
- La phase 4 est une phase de repos, durant laquelle les échanges se font par l'intermédiaire de pompes assurant un transport ionique actif consommateur d'énergie par la pompe Na^+/K^+ ATPase ou utilisant les gradients transmembranaires en sodium (Na^+) et en calcium (Ca^{2+}) comme l'échangeur Na^+/Ca^{2+} qui contribue également au plateau du PA.

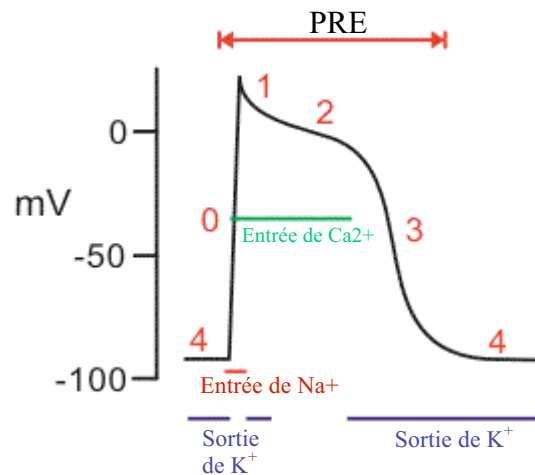


Figure 3: le potentiel d'action cardiaque à réponse rapide (PRE : période réfractaire effective)

b. Mécanismes cellulaires des arythmies

Trois mécanismes cellulaires actuellement bien connus sont à l'origine de la plupart des arythmies. Ce sont :

1. Les anomalies d'automaticité : elles concernent la phase 4 du potentiel d'action (liée au courant I_f et parfois au courant I_{Ca}) et sont responsables de tachycardies sinusales ou atriales, de rythmes idio-ventriculaires ou encore de tachycardies atriales ou ventriculaires notamment post-infarctus.
2. Les activités déclenchées : elles peuvent survenir soit en phase 3 (post-dépolarisations précoces) et être à l'origine essentiellement de torsades de pointe, soit en phase 4 (post-

dépolarisations tardives liés à une surcharge calcique intracellulaire). Ces dernières sont observées lors d'intoxication digitalique et à l'occasion de tachycardies adrénérgiques.

3. Les réentrées : elles constituent probablement l'un des mécanismes les plus souvent en cause, et sont liées à un mouvement circulaire et à un ralentissement localisé de la conduction. Les arythmies générées par ce mécanisme sont la fibrillation atriale, le flutter atrial, la plupart des tachycardies intranodales et bon nombre de tachycardies ventriculaires.

c. Electrophysiologie de la fibrillation atriale

La fibrillation atriale persistante raccourcit de manière importante la durée du potentiel d'action (figure 4) :

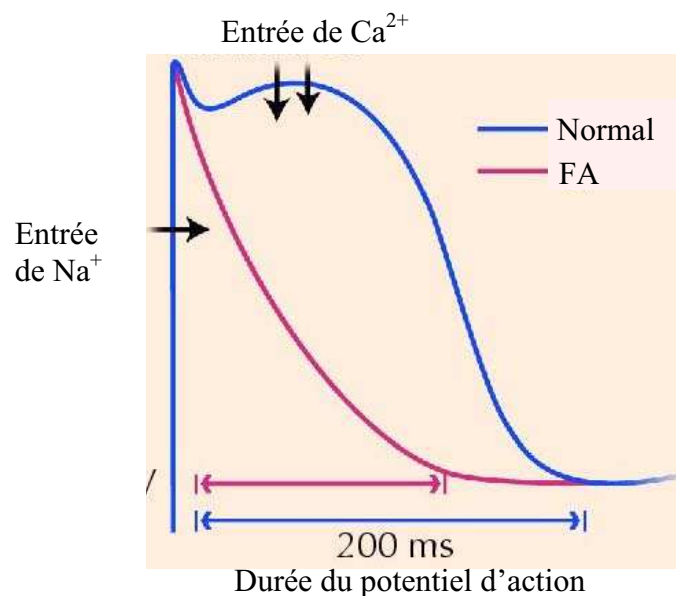
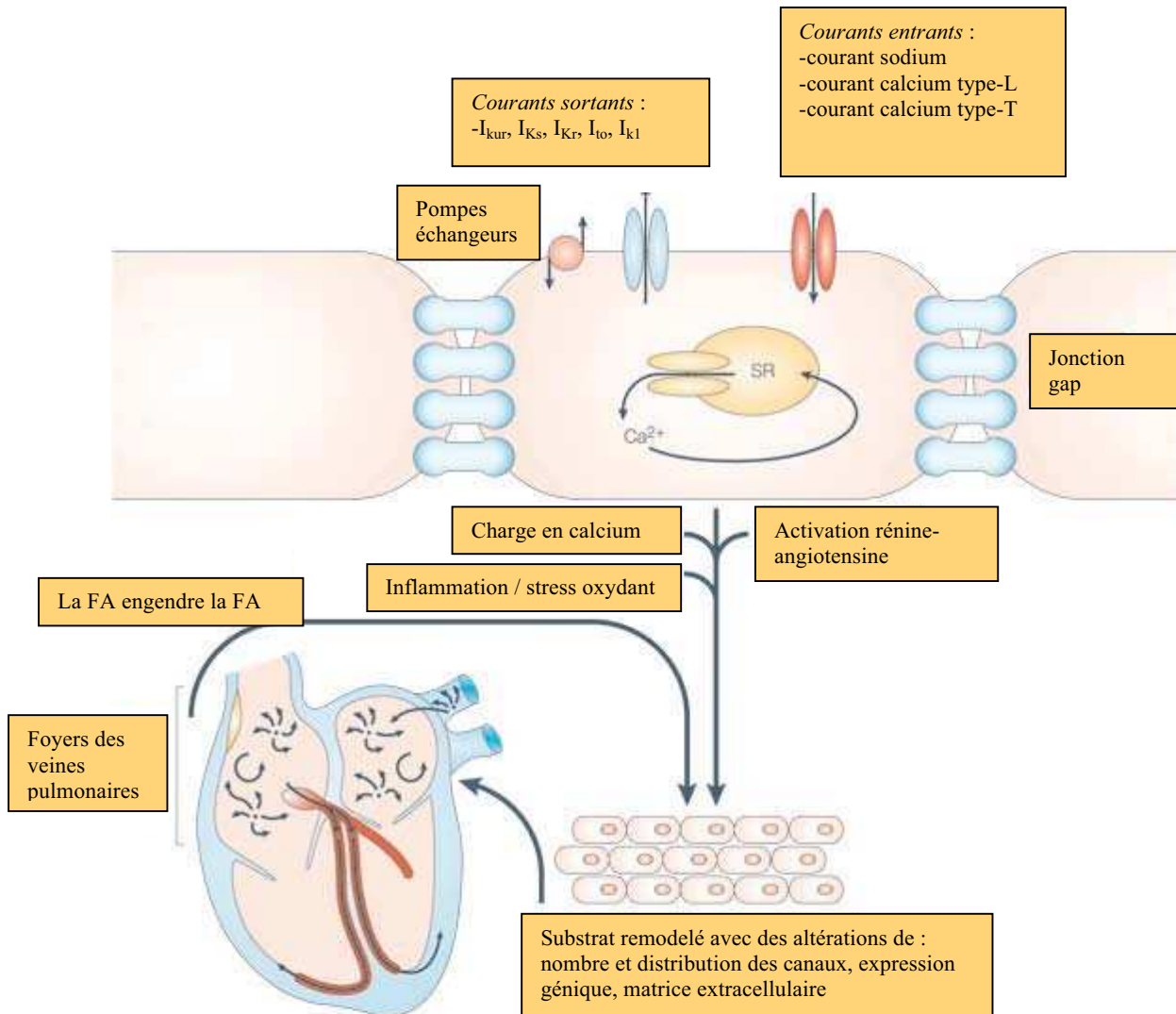


Figure 4: Durée du potentiel d'action normal versus en fibrillation atriale.

La durée du potentiel d'action et la période de réfraction sont raccourcies de la même manière que le courant calcique [4]. Copyright © 2004 Canadian Medical Association or its licensors

A chaque cycle cardiaque, les myocytes atriaux sont soumis à la dépolarisation et la repolarisation de la membrane cellulaire pour générer des potentiels d'action. Ces signaux électriques sont générés par l'ouverture et la fermeture normale de canaux sodium, de canaux calcium et de canaux potassium par les pompes et les échangeurs qui régulent l'homéostasie ionique intracellulaire, et par des jonctions qui propagent le potentiel d'action aux cellules voisines (figure 5). Lors de chaque potentiel d'action, le calcium est libéré des réserves du réticulum sarcoplasmique (RS), et interagit avec l'actine-myosine pour générer une contraction. Puis le calcium est récupéré par le réticulum sarcoplasmique. La fonction

désordonnée des myocytes, causée par ou modulée par l'activation des voies arythmogènes, modifie l'électrophysiologie atriale normale pour générer un substrat à risque de fibrillation. La fibrillation atriale elle-même génère une boucle de feedback pour perpétuer ces changements [5].



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 5 : Mécanisme de la fibrillation atriale (FA). (Figure adaptée de [5]).

➤ Implication des différents courants ioniques

Les courants potassiques et calciques semblent être les courants intervenant les plus au cours de la fibrillation atriale (figure 6).

- Le courant sodique

Le courant sodique ne semble pas impliqué dans l'établissement de la fibrillation atriale chronique ; en effet, peu d'altération dans l'amplitude de ce courant n'a été observée [6].

- Les courants calciques

L'implication du courant I_{CaT} est fortement suggérée de part ses propriétés d'inactivation et de réactivation rapide. Cependant, d'une part il n'a jamais été montré l'effet de ces canaux dans des cellules atriales humaines et d'autre part l'absence de facteurs pharmacologiques spécifiques ne permet pas de conclure à l'implication du courant I_{CaT} dans la survenue de la fibrillation atriale.

En revanche, le courant I_{CaL} est diminué dans la fibrillation atriale chronique [6-7] participant ainsi au raccourcissement de la durée du potentiel d'action atrial, à la perte d'adaptation de la durée du potentiel d'action en fonction de la fréquence cardiaque, et à une baisse de la contraction. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement identifiés [8-11]. La densité de I_{CaL} et la durée du potentiel d'action peuvent cependant être restaurées suite à une stimulation β -adrénergique [10] comme dans la fibrillation atriale [6-7].

Il a ainsi été suggéré qu'une surcharge calcique intracellulaire pouvait contribuer à l'induction des remodelages, électriques et structuraux, observés au cours de la fibrillation atriale.

Une fuite calcique du récepteur à la ryanodine (RyR) engendrée par une hyperphosphorylation par la protéine kinase A (PKA) pourrait jouer un rôle dans le développement et le maintien de la fibrillation atriale chronique [12].

- Les courants potassiques

Le ralentissement de la phase de repolarisation initiale rapide est dominé par les courants potassiques repolarisants sortants à activation rapide dont le courant potassium (K^+) transitoire rapide I_{to1} et le courant potassium rectifieur ultra-rapide I_{kur} . Ces courants optimisent l'activation du courant calcique, I_{CaL} , en établissant le potentiel de plateau du potentiel d'action.

Lors de la fibrillation atriale, il est noté une diminution importante de la densité des canaux potassiques [11] avec un effet majeur sur I_{to1} [13-16]. En revanche, les rôles sont plus

discutés concernant les courants I_{Kur} et I_{Ks} dont les résultats sont contradictoires selon les études [6, 13, 16-18]. Par ailleurs, une tendance à l'augmentation des courants I_{K1} et I_{KAch} a été aussi notée, notamment chez l'homme [6, 11, 14].

La réduction des courants K^+ repolarisants de la phase précoce de la repolarisation semble contradictoire avec la réduction des courants I_{CaL} (raccourcissement de la phase plateau du potentiel d'action). Il est admis cependant que l'inhibition du courant calcique I_{CaL} , est in fine prédominante.

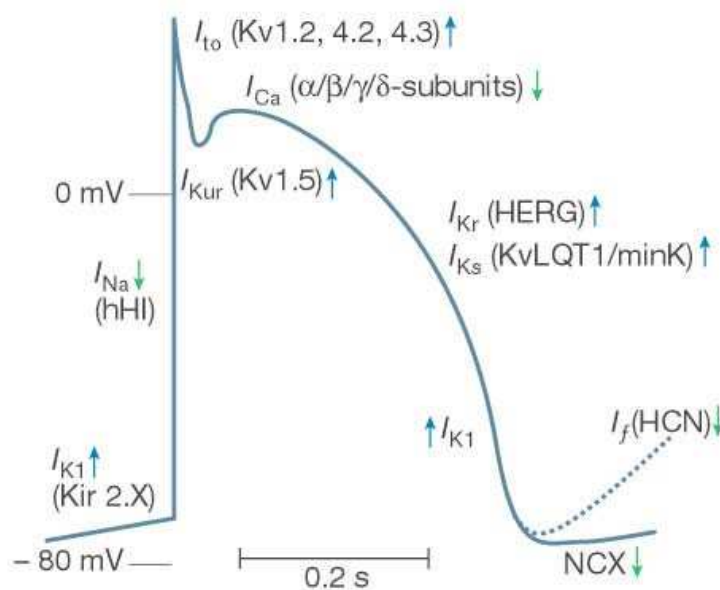


Figure 6: Déterminants ioniques de la fibrillation atriale. Le potentiel d'action montre les principaux courants qui interviennent au cours de chaque phase (avec les sous-unités correspondantes entre parenthèses).

B. Classification des fibrillations atriales

La fibrillation atriale peut se présenter sous plusieurs formes. Elle est ainsi répertoriée, d'après les sociétés savantes, en cinq classes selon la présentation et la durée de l'arythmie : paroxystique, persistante, persistante de longue date et permanente. Cette avant-dernière dernière forme a été récemment ajoutée dans les nouvelles recommandations sur la fibrillation par la société européenne de cardiologie en 2010 [19]. La fibrillation atriale peut évoluer longtemps sur le mode paroxystique, ou être d'emblée permanente (figure 7).

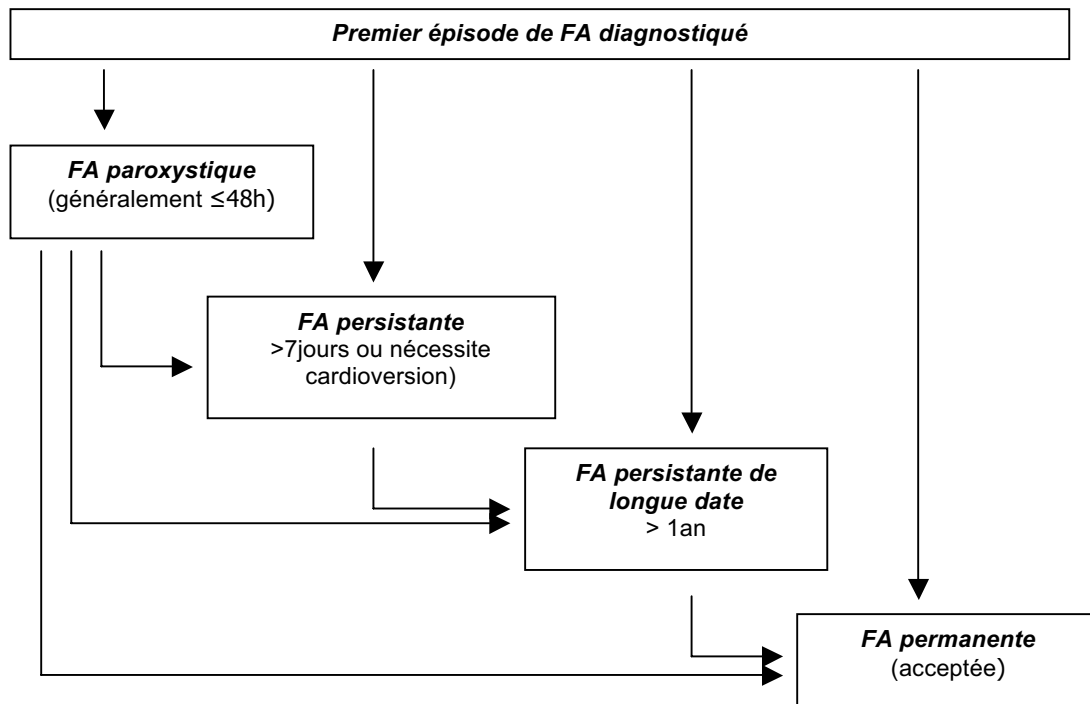


Figure 7: Les différents types de fibrillation atriale. Figure adaptée de [19].

L'étude française ALFA, prenant en compte les fibrillations atriales vues en cardiologie de ville, a révélé que les fibrillations atriales permanentes sont les plus nombreuses, suivies des fibrillations atriales paroxystiques [20].

Les fibrillations atriales silencieuses (asymptomatiques) peuvent se manifester par une complication liée à la fibrillation atriale (accident vasculaire cérébral ischémique ou tachycardiomyopathie) ou peut être diagnostiquée par un ECG opportuniste. La fibrillation atriale silencieuse peut se présenter comme l'une des formes temporelles de la FA.

1. Fibrillation atriale nouvellement diagnostiquée

Chaque patient qui se présente pour la première fois avec une fibrillation atriale est considéré comme un patient avec un premier diagnostic de fibrillation atriale, indépendamment de la durée de l'arythmie ou de la présence et la sévérité des symptômes liés à la fibrillation atriale.

2. Fibrillation atriale paroxystique

Elle se traduit par la survenue de brefs épisodes arythmiques, d'une durée au moins égale à 30 secondes. Ces épisodes sont spontanément résolutifs, en général dans les 48 premières heures. Bien que les épisodes puissent durer jusqu'à sept jours, le point-temps de 48h est cliniquement important, car au-delà de ce délai, la probabilité de conversion spontanée est faible et l'anti-coagulation doit être envisagée.

Cette forme de fibrillation atriale est souvent récidivante.

3. Fibrillation atriale persistante

Les épisodes arythmiques sont plus longs, ils durent généralement plus de sept jours et sont plus espacés. Ils nécessitent alors une voire plusieurs cardioversions électriques ou médicamenteuses.

4. Fibrillation atriale persistante de longue date

La fibrillation dure depuis plus d'un an lorsqu'il est décidé d'adopter une stratégie de contrôle du rythme.

5. Fibrillation atriale permanente

La fibrillation atriale est devenue chronique. Le rythme sinusal ne peut plus être maintenu même après une cardioversion. La présence de l'arythmie est acceptée par le patient (et le médecin). Par conséquent, les interventions de contrôle du rythme ne sont pas poursuivies chez les patients atteints de fibrillation atriale permanente. Si une stratégie de contrôle du rythme est adoptée, l'arythmie est renommée en « fibrillation atriale persistante de longue date ».

6. Evolution d'une forme à une autre

La fibrillation atriale peut évoluer d'une forme paroxystique vers une forme persistante ou permanente (figure 8). Environ 8% des patients présentant une fibrillation atriale paroxystique évoluent vers une forme persistante [20-21].

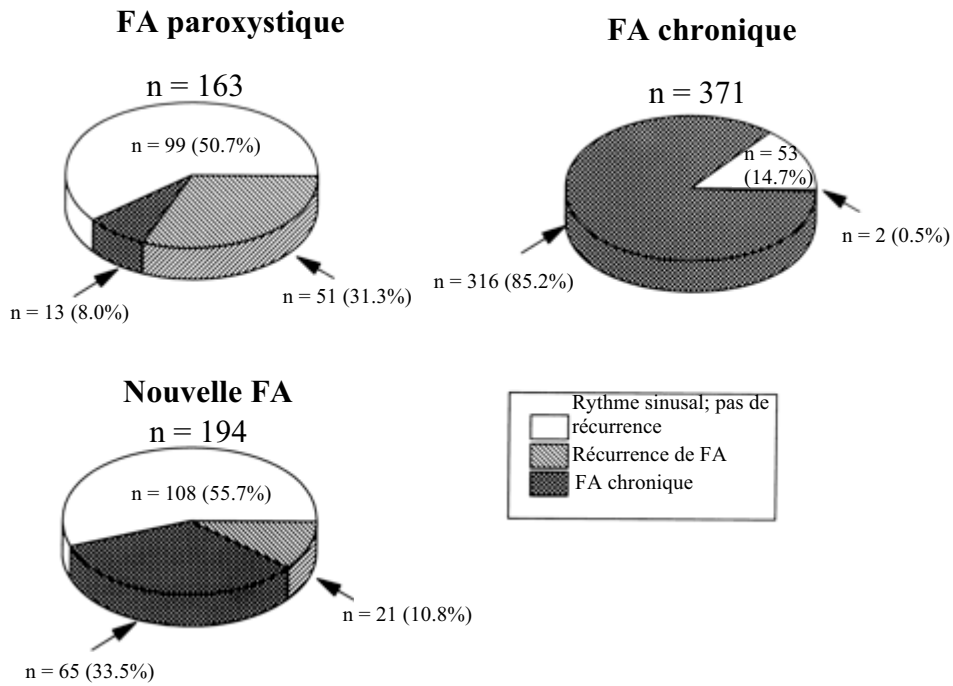


Figure 8: Evolution des fibrillations atriales [20]

Ce ratio augmente en présence d'une oreillette gauche (OG) dilatée, d'infarctus du myocarde ou de pathologie valvulaire (figure 9).

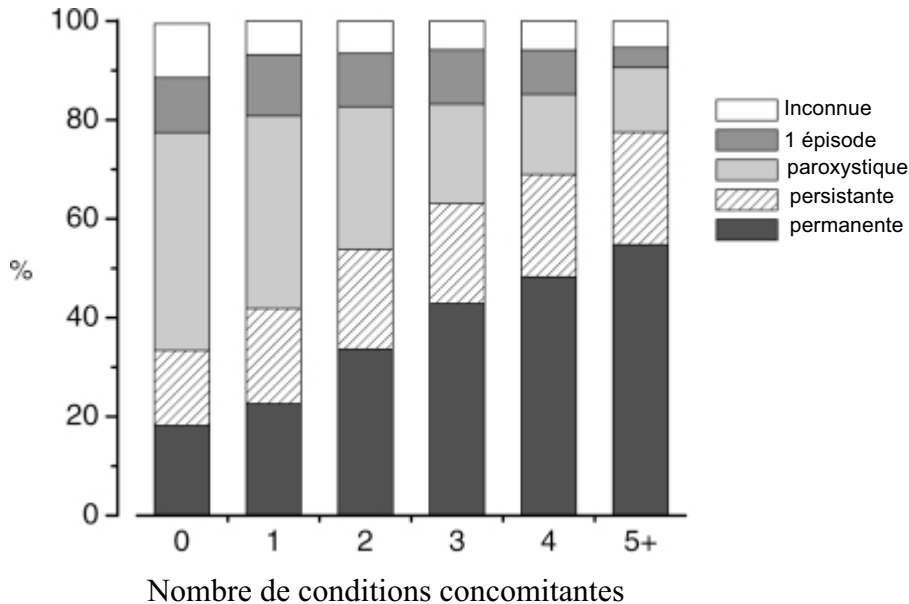


Figure 9: Evolution de fibrillation atriale paroxystique en fibrillation atriale permanente en fonction des conditions concomitantes connues pour favoriser la fibrillation atriale. Les facteurs pris en compte sont l'âge (> 75 ans), l'hypertension, le diabète, une cardiomyopathie, l'insuffisance cardiaque, une valvulopathie [23].

Le terme de fibrillation atriale isolée est utilisé pour décrire des fibrillations atriales survenant chez des individus jeunes (moins de 60 ans) sans signes cliniques ou échocardiographiques de maladies cardio-pulmonaires (dont l'hypertension). En effet, dans 30 à 50% des cas, la

fibrillation atriale survient chez des individus sans pathologie cardiaque ni autre type de pathologie. Chez les patients jeunes, elle correspond à 20-25% des fibrillations atriales persistantes [24].

Il y a cependant peu de données sur la fibrillation atriale isolée issues d'essais cliniques et les données relatives à son développement, traitement ou pronostic sont assez rares [25].

D'un point de vue physiopathologique, le mécanisme sous-jacent à la fibrillation atriale isolée est différent de ceux impliqués dans l'installation d'une fibrillation atriale associée à une pathologie sous-jacente. Il semblerait que la fibrillation atriale associée à une pathologie sous-jacente soit plutôt liée au substrat, dû aux pathologies et à la dilatation de l'oreillette avec du stretch et de la fibrose. Au contraire, la fibrillation atriale isolée serait plutôt liée à un phénomène électrophysiologique dans l'oreillette structurellement normale. Ceci pourrait expliquer pourquoi les patients avec une vraie fibrillation atriale isolée ont une espérance de vie normale comparée aux personnes sans problèmes arythmiques (figure 10), un faible risque d'accident vasculaire cérébral (AVC), et pourquoi la fibrillation atriale paroxystique isolée progressent rarement en forme persistante ou permanente [24, 26].

De plus, le pronostic des patients avec fibrillation atriale isolée est lié à la présence ou au développement de la dilatation de l'oreillette gauche ce qui peut suggérer la formation d'un substrat structural atrial [27].

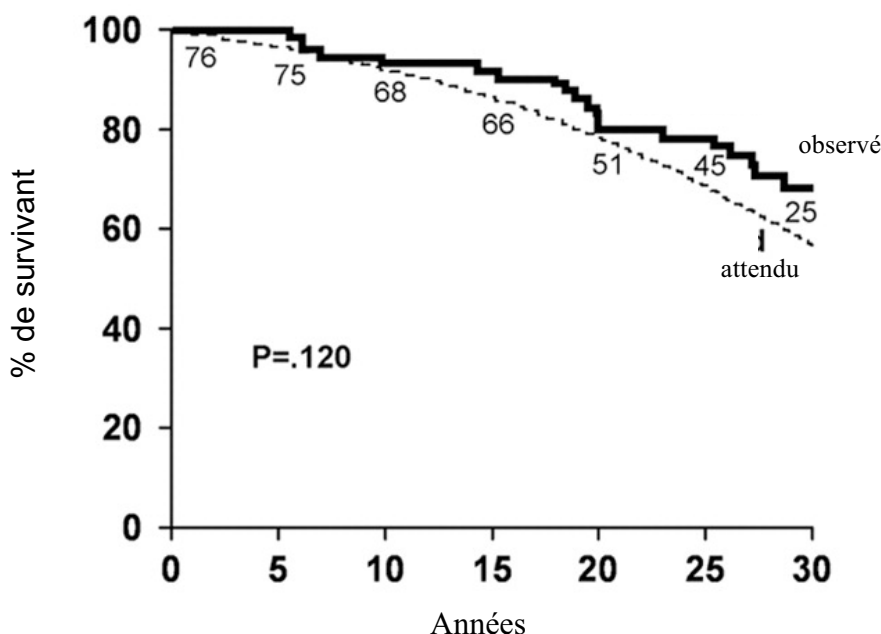


Figure 10: Courbe de survie chez des patients avec fibrillation atriale isolée (ligne pleine) et une population appariée avec âge et sexe (ligne pointillée). Adapté de [26].

En revanche, la fibrillation atriale associée à une pathologie sous-jacente progresse souvent d'une forme paroxystique en forme persistante ou permanente en lien avec la progression du substrat cardiaque sous-jacent et est associée avec une incidence croissante du risque d'AVC [27].

C. Symptômes de la fibrillation atriale

La fibrillation atriale est souvent associée à des symptômes typiques tels que les palpitations, la dyspnée, des vertiges et une syncope [20, 28]. Cependant, une proportion significative de patients restent asymptomatiques [29].

D. Incidence et prévalence des fibrillations atriales

1. Prévalence

De nombreuses études présentent des données concordantes que ce soit aux Etats-Unis, en Europe ou en Australie. 1% de la population souffre de fibrillation atriale. Actuellement, on estime que 2,2 millions de personnes aux Etats-Unis et 4,5 millions de personnes en Europe sont atteints de fibrillation atriale. On peut ainsi estimer à partir d'une extrapolation de ces données qu'environ 600 000 personnes en France sont atteintes de fibrillation atriale [30].

Il est estimé, par des projections de données (Etude ATRIA et Olmsted County), que la prévalence de cette pathologie va tripler d'ici 2050 (figure 11) [1-2].

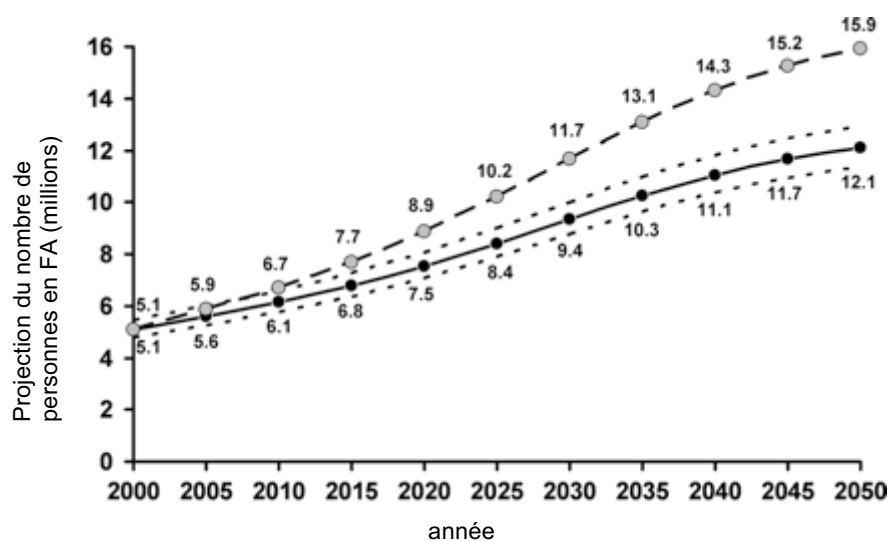


Figure 11: Projection du nombre de patients en fibrillation atriale entre 2000 et 2050 aux Etats-Unis (en supposant aucune nouvelle augmentation de l'incidence de la fibrillation atriale ; ajustement selon l'âge (courbe pleine) et en supposant une augmentation continue des taux d'incidence comme cela a été montré entre 1980 et 2000 (courbe en pointillés))[2].

2. Ethnie

Le rôle des différences ethniques dans la prévalence de la fibrillation atriale n'a pas été clairement élucidé dans les diverses études de population [31].

Des études croisées à partir de données de pratique clinique ont montré que les patients africains développent moins de fibrillation atriale que les patients caucasiens, ce qui suggère que les différences génétiques issues des différentes ethnies peuvent influencer la propension à la fibrillation atriale [1, 32].

Par ailleurs, les patients caucasiens et africains ont un volume atrial et une fonction atriale similaires ; En revanche, le diamètre de l'oreillette est significativement plus large chez les Caucasiens. La différence est petite mais de précédentes études ont montré que cette différence pouvait être une cause de fibrillation atriale [33].

3. Données en fonction de l'âge et du sexe

La prévalence de la fibrillation atriale est fortement dépendante de l'âge.

L'incidence de la fibrillation atriale peut être mise en évidence dès l'âge de 30/40 ans et subit une augmentation brutale à partir de l'âge de 65 ans [30] (fig 12).

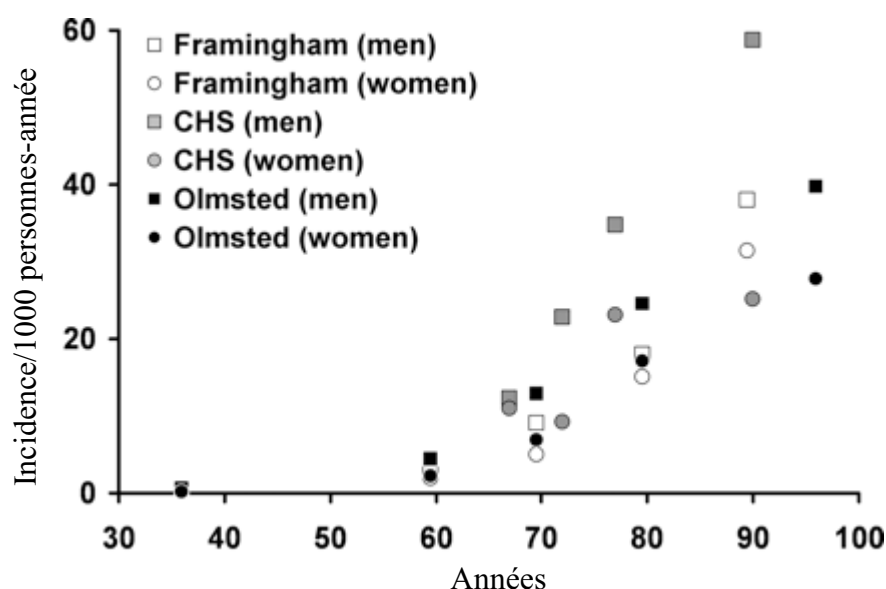


Figure 12: Incidence de la fibrillation atriale pour 1000 personnes-année stratifiée selon l'âge dans la Framingham Heart Study [34], dans la Cardiovascular Health Study (CHS) [35], et dans la Olmsted County Study [2]. Les valeurs représentées sont les milieux des tranches d'âge [2]

Le risque de développer une fibrillation atriale à partir de l'âge de 40 ans est de 25%, que ce soit chez les hommes ou les femmes [36]. L'étude de Framingham a montré que l'inflation de

la fibrillation atriale concerne aussi bien la fibrillation atriale paroxystique que permanente, avec une incidence plus élevée chez les hommes [30]. Pour des raisons encore inconnues, les hommes ont un risque plus élevé de développer une fibrillation atriale par rapport aux femmes, soit une incidence plus élevée de 50% [34] (fig 13 et 14).

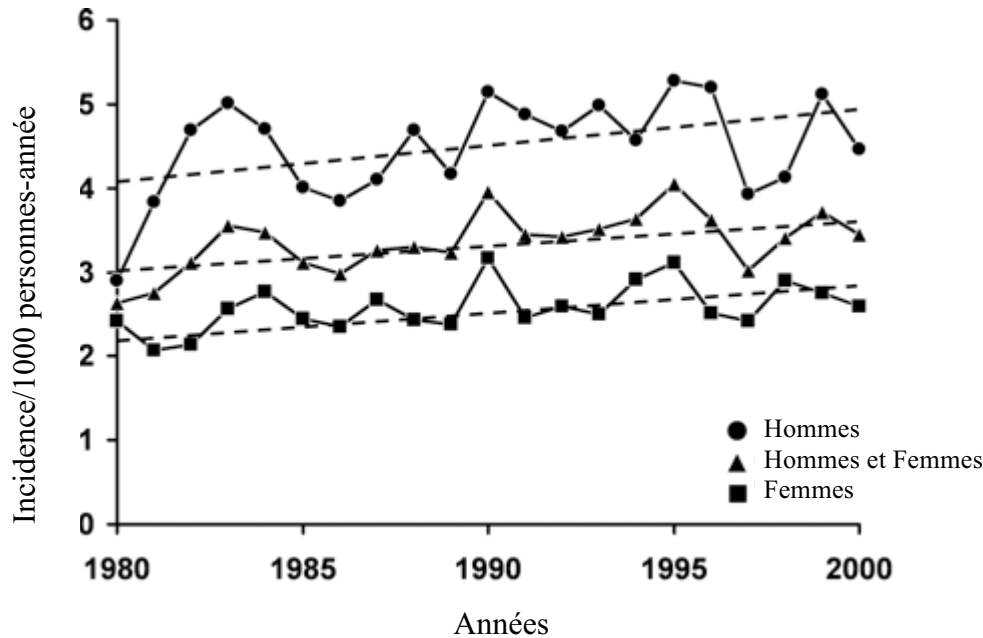


Figure 13: Tendence, spécifique au sexe, de l'incidence de la fibrillation atriale entre 1980 et 2000 (ajustement selon l'âge de la population de 1990 des États-Unis). La ligne en pointillé indique le modèle de régression linéaire [2].

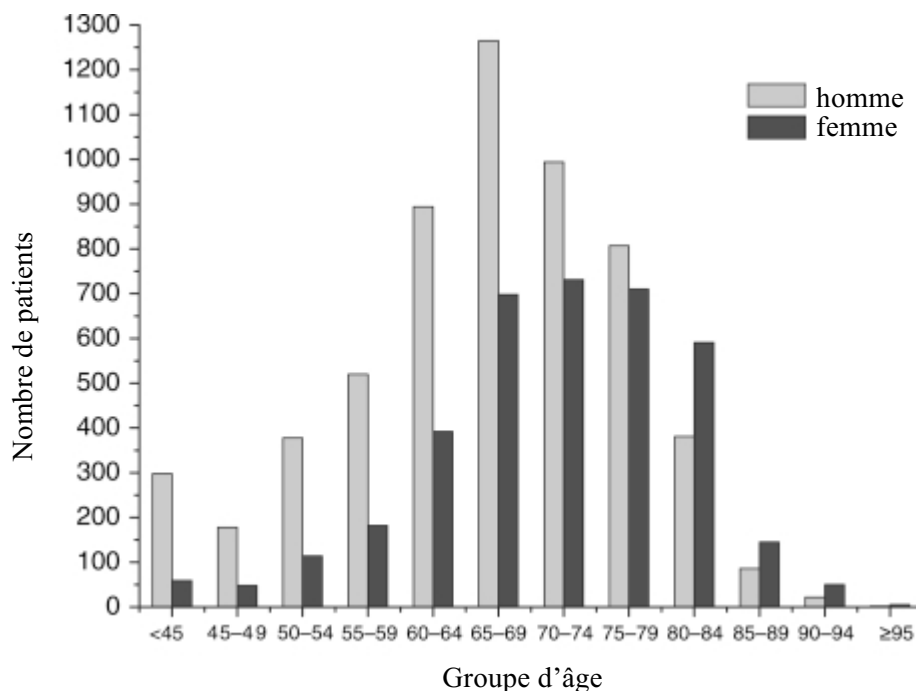


Figure 14: Répartition du nombre de patients en fibrillation atriale par âge pour les hommes et les femmes inscrits dans le Registre central des patients de l'AFNET allemand. Le ratio hommes / femmes est de 1,6; 22,2% d'hommes et de 40,1% des femmes avaient 75 ans ou plus [23].

La prévalence de la fibrillation atriale est en progression dans la population générale, notamment, du fait du vieillissement de la population. On retrouve plus facilement, dans cette population, les différentes pathologies favorisant son développement [37]. La prévalence de la fibrillation atriale est de 2,3% chez les sujets de plus de 40 ans et de 5,9% chez ceux de plus de 65 ans. Environ 70% des patients en fibrillation atriale ont entre 65 et 85 ans [1, 38-39]. Une étude récente a estimé que 10% de la population développera de la fibrillation atriale à partir de l'âge de 75 ans [52].

4. Fibrillation atriale post-opératoire

La fibrillation atriale post-opératoire est l'arythmie la plus courante après une chirurgie cardiaque. Elle correspond ainsi à un facteur de risque important contribuant à la morbidité et mortalité post-opératoire.

Dans l'étude de AA. Motsinger et al, sur 940 patients opérés d'une chirurgie cardiaque, 255 ont développé une fibrillation atriale post-opératoire [40].

Une corrélation a notamment été établie entre une densité élevée de courant calcique I_{CaL} et la propension des patients en rythme sinusal à développer de la fibrillation atriale paroxystique post-opératoire [9].

E. Epidémiologie des co-morbidités

Plusieurs facteurs de risque peuvent être impliqués dans l'augmentation progressive de la prévalence de la fibrillation atriale. Il est difficile de déterminer si l'association d'une fibrillation atriale à une autre affection cardiovasculaire est un facteur de risque supplémentaire ou un marqueur de risque.

1. Risque de morbi-mortalité

Plusieurs grandes études épidémiologiques ont fourni un état des lieux sur le suivi des patients en fibrillation atriale. Elles ont ainsi établi que la fibrillation atriale constitue un facteur pronostique indépendant de morbi-mortalité, multipliant par deux le risque de décès et par quatre le risque d'accident embolique artériel cérébral dans la population générale [41-43].

Dans l'étude de Framingham, les patients masculins, avec fibrillation atriale, âgés de 55 à 64 ans ont une espérance de vie de 12.6 ans, ce qui est moindre par rapport aux patients en

rythme sinusal dont l'espérance de vie est de 18.1ans (chez les femmes : 12.1 ans vs 21.3 ans) [43].

2. Cardiopathies associées – Facteurs de risque

Les causes précises de la fibrillation atriale sont difficiles à identifier. Cependant, les fibrillations atriales surviennent souvent en association avec certaines cardiopathies.

Les études AFFIRM [44] et RACE [45] ont présenté les causes cliniques de la fibrillation atriale en étudiant prospectivement un large nombre de patients aux Etats-Unis et en Europe. Les principales pathologies associées à la fibrillation atriale sont donc les hypertensions artérielles (71%), l'insuffisance coronaire (38%), l'insuffisance cardiaque (23%), le diabète (20%), les pathologies pulmonaires (15%), les antécédents d'AVC (13%) et les valvulopathies (12%) [46].

En France, l'étude observationnelle ALFA révèle les mêmes pathologies de co-morbidités : l'hypertension artérielle, la maladie coronaire, les cardiopathies valvulaires, les cardiomyopathies dilatées, les dysfonctions sinusales [20].

Les quatre principaux facteurs indépendants pouvant mener à un développement précoce de la fibrillation atriale chronique sont ainsi les pathologies cardiaques ischémiques, valvulaires, l'âge et la taille de l'oreillette gauche [22, 34, 35, 47]; les autres facteurs tels que l'insuffisance cardiaque congestive, le diabète et l'hypertension sont plutôt décrits comme des facteurs de risque significatifs ; leur rôle dans la fibrillation atriale serait lié à la dilatation de l'oreillette gauche observée dans ces pathologies [34].

Des facteurs de risque tels que l'aspect familial, l'aspect génétique, les facteurs socio-économique, l'alcool, l'activité sportive, les marqueurs biochimiques sont considérés comme de nouveaux facteurs de risque de la fibrillation atriale isolée [25].

3. Fibrillation atriale et hypertension

Actuellement les cohortes de sujets recrutés pour les études épidémiologiques ou pour les grands essais thérapeutiques révèlent toutes le même phénomène : une proportion de plus en plus grande d'hypertendus chez les sujets en fibrillation atriale.

D'après les données de l'étude de Framingham, 14% des fibrillations atriales sont attribuables à l'hypertension [34]. Plusieurs études confirment cette observation selon laquelle les individus hypertendus ont un risque plus élevé de développer une fibrillation atriale [35, 48, 49]. La rigidité aortique pourrait être un facteur important dans la pathogénèse de la fibrillation atriale. Une élévation de la pression sanguine est en effet liée à une augmentation de la fibrose de l'oreillette gauche [50-52]. L'hypertrophie ventriculaire gauche et la taille de l'oreillette gauche sont deux paramètres pouvant expliquer le lien entre la pression artérielle et l'incidence de la fibrillation atriale [53-54].

A partir de la cohorte de Framingham, Lyod-Jones et al, ont montré que l'espérance de vie des patients en fibrillation atriale avec une pression artérielle élevée était plus faible chez les personnes âgées par rapport à la population jeune [36].

4. Fibrillation atriale et insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est une étiologie importante de la fibrillation atriale. Une augmentation de la fibrose associée à une conduction électrique hétérogène dans les veines pulmonaires de patients en insuffisance cardiaque peut induire une anomalie du couplage cellulaire et ainsi augmenter la propension de l'activité du courant réentrant et non-réentrant.

L'étude de Framingham a montré que l'incidence de la fibrillation atriale chez les patients avec insuffisance cardiaque est estimée à 33‰ personnes-année, avec un risque légèrement plus important chez les femmes (RR : 3,1) que chez les hommes (RR : 2,7) [55].

L'étude Euro Heart Survey – Atrial Fibrillation (EHS-AF) a évalué chez les patients en fibrillation atriale l'ancienneté de l'insuffisance cardiaque. Dans la majorité des cas, le diagnostic d'insuffisance cardiaque remonte à plus de six mois. Les fibrillations atriales permanentes sont le plus souvent associées à l'insuffisance cardiaque [56].

Par ailleurs, l'insuffisance cardiaque augmente les activités nerveuses autonomes et changent les dynamiques de calcium intracellulaire.

5. Fibrillation atriale et obésité / syndrome métabolique

L'obésité est un facteur de risque majeur dans le développement de la fibrillation atriale [2-3]. Un lien a été mis en évidence entre l'indice de masse corporelle et la fibrillation atriale (tableau 1).

Mesure de l'IMC	Nombre de cas	Nombre de contrôles	Risque relatif (intervalle de confiance 95%)	Significativité (p)
Normal (18.5 – 24.9)	100	147	1.00	0.002
Surpoids (25.0 – 29.9)	138	252	0.97 (0.68 – 1.38)	0.002
Obèse classe 1 (30.0 – 34.9)	99	171	1.18 (0.80 – 1.73)	0.002
Obèse classe 2 (35.0 – 39.9)	44	82	1.34 (0.82 – 2.18)	0.002
Obèse classe 3 (\geq 40.0)	44	55	2.31 (1.36 – 3.91)	0.002
Par unité incrémentée	425	707	1.03 (1.01 – 1.05)	0.001

Tableau 1: Risque d'installation de nouvelle fibrillation atriale en fonction de l'IMC. (Abréviations: IMC = indice de masse corporelle (calculé en divisant le poids en kilogrammes par la taille en mètres au carré); IC = intervalle de confiance. Les modèles sont ajustés pour le sexe, l'hypertension traitée, et l'âge. Tableau adapté de [57].

On note une augmentation du risque de 3 à 8% d'installation de la fibrillation atriale pour toute augmentation d'unité de l'indice de masse corporelle. 45 à 50% des patients obèses de la population de la cohorte de Framingham ont une incidence de fibrillation atriale, et ce de manière indépendante de l'âge et des antécédents cardiovasculaires (dosage lipidique, diabète, pression sanguine) [57-59]. L'obésité peut également influencer sur l'évolution de la forme paroxystique en forme permanente de la fibrillation atriale [60]. Elle est liée à un désordre métabolique ; Or, une étude récente menée au Japon a montré que les patients avec un désordre métabolique ont 88% de risque de développer une fibrillation atriale [61].

Les mécanismes par lesquels l'obésité peut mener à la fibrillation atriale restent inconnus. Il est cependant supposé que la taille de l'oreillette gauche soit un facteur important car les dimensions de l'oreillette sont fortement corrélées avec l'indice de masse corporelle. Ceci peut être dû au lien entre la dysfonction diastolique et l'épaississement du myocarde [62], au volume élevé de plasma [63], et à une augmentation de l'activation neuro-hormonale [64]. D'autres facteurs tels que la dysfonction autonome et l'apnée du sommeil peuvent être liées au développement de la fibrillation atriale.

Les patients avec fibrillation atriale ont une haute prévalence à l'apnée du sommeil obstructive et inversement la prévalence de la fibrillation atriale est augmentée chez les patients avec apnée du sommeil obstructive, également en l'absence de pathologie cardiaque sous-jacente [65-67]. L'apnée du sommeil obstructive est considérée par AS. Gami et al comme un prédicateur fort d'incidence de la fibrillation atriale (rapport de risque = 2.18 ; intervalle de confiance 95%) [65, 68]. L'étude du profil de ces patients montre que plus leur indice de masse corporelle est élevé, plus l'indice d'apnée est élevé et plus la survenue de la fibrillation atriale est fréquente (figure 15) [65]:

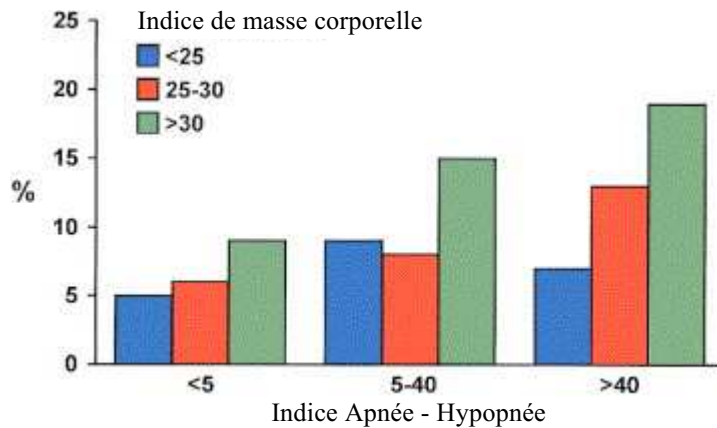


Figure 15: Fréquence cumulée d'incidence de fibrillation atriale basée sur les interactions entre l'indice de masse corporelle (IMC) et l'indice Apnée-Hypopnée. Le suivi moyen est de 4.7 années. Un indice Apnée-Hypopnée <5 représente une apnée du sommeil non obstructive ; un indice entre 5-40 une apnée du sommeil moyennement à modérément obstructive, et un indice >40 une apnée du sommeil obstructive. Un IMC < 25 représente un poids normal, entre 25-30 un surpoids et >30 une obésité. Figure adaptée de [65].

F. Complications de la fibrillation atriale

Le risque lié à la fibrillation atriale est notamment une conduction rapide vers les ventricules qui peut s'avérer dangereuse. Heureusement, le nœud atrio-ventriculaire limite le nombre de signaux atteignant effectivement les cavités inférieures, de sorte que l'ensemble du cœur se contracte à une fréquence bien inférieure. Comme les autres formes d'arythmie, la fibrillation atriale peut empêcher le cœur de pomper suffisamment de sang et d'oxygène pour répondre aux besoins de l'organisme.

Le retentissement hémodynamique de la fibrillation atriale est lié d'une part à la perte de la systole atriale mécanique, et d'autre part à l'accélération de la fréquence ventriculaire. En rythme sinusal, la contraction atriale en fin de diastole assure le remplissage ventriculaire gauche, et intervient pour environ 5% du débit cardiaque au repos, alors que cette proportion peut monter jusqu'à 30 % à l'effort. Ceci explique que la survenue d'une fibrillation atriale puisse être mal tolérée lorsque la systole atriale assure une part importante du remplissage ventriculaire (tachycardie, effort, cardiopathie hypertrophique...).

1. Risques à long terme

L'étude Renfrew/Paisley, étude écossaise de population sur les risques associés à la fibrillation atriale, a montré sur un suivi de 20ans, une élévation significative du risque cardiovasculaire à la fois chez les hommes et chez les femmes en fibrillation atriale. Alors que

89% des femmes en fibrillation atriale ont eu un évènement cardiovasculaire (hospitalisation ou décès), seulement 27% des femmes sans fibrillation atriale ont subi le même sort. La différence est plus faible chez les hommes avec respectivement 66% et 45% d'évènements. La fibrillation atriale est associée à long terme à une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance cardiaque et de mortalité quelle qu'en soit la cause [69].

Les patients de l'étude de la Framingham Heart Study ont été suivis pendant 5 ans. Une plus grande mortalité a été observée chez les patients en fibrillation atriale aussi bien à 60 qu'à 70 ans par rapport aux patients sans fibrillation atriale [69]. Cette étude de Framingham a montré que la mortalité sur trois ans, aussi bien chez les hommes que chez les femmes, est plus élevée chez les patients avec fibrillation atriale quelle que soit la tranche d'âge (65-74 ans / 75-84 ans / 85-89 ans). Par ailleurs, la mortalité des patients en fibrillation atriale avec une pathologie cardiaque associée est plus élevée que celles des patients qui n'ont pas de fibrillation atriale [70].

Les données de cette même étude de Framingham, pour laquelle les patients ont été suivis pendant 10 ans, ont montré que la mortalité est plus importante au début de l'évolution de la fibrillation atriale, quel que soit l'âge. Cette mortalité peut être due à la cause de la fibrillation atriale telle que l'infarctus du myocarde, l'embolie pulmonaire, ou l'accident vasculaire cérébral [43].

Une prise en charge précoce permettrait notamment d'éviter le développement de tout risque de co-morbidité associé qui joue un rôle primordial. Les décès décrits ne sont pas forcément liés à la fibrillation atriale car après la première année le pourcentage de décès tend à diminuer [43].

2. La fibrillation atriale engendre la fibrillation atriale

Une donnée fondamentale est l'entretien de la fibrillation atriale par la fibrillation atriale. Dans le modèle de la chèvre de MA. Alessie, et chez le chien, l'induction expérimentale d'épisodes répétés de fibrillation atriale, bien qu'initialement réversible, induit une fibrillation atriale persistante. Sur le plan thérapeutique, il est essentiel d'interrompre ce cycle rapidement pour empêcher le remodelage et ses conséquences délétères [71-74].

3. Complications thromboemboliques

La cadence anarchique des oreillettes nuit à leur efficacité de pompage. Ainsi, à chaque battement du cœur, une partie du sang peut rester dans l'oreillette. Le sang accumulé peut éventuellement coaguler, ce qui accroît le risque d'accident vasculaire cérébral.

La perturbation de l'activité mécanique atriale favorise la formation de thrombi atriaux, particulièrement dans l'oreillette gauche. Ces thrombi peuvent migrer spontanément, ou à la faveur d'une reprise de la contraction atriale lors d'un retour spontané en rythme sinusal (figure 16). Le risque d'embolie de la circulation systémique est d'autant plus élevé qu'il existe une lésion valvulaire mitrale, ou une dilatation de l'oreillette gauche. Les localisations les plus habituelles sont les migrations cérébrales.

L'étude de Copenhague (Copenhague City Heart Study) a montré que le risque d'AVC ischémique est cinq fois plus élevé en cas de fibrillation atriale, et de manière plus significative chez les femmes [75]. On retrouve la même conclusion avec les données de l'étude de Framingham [54].

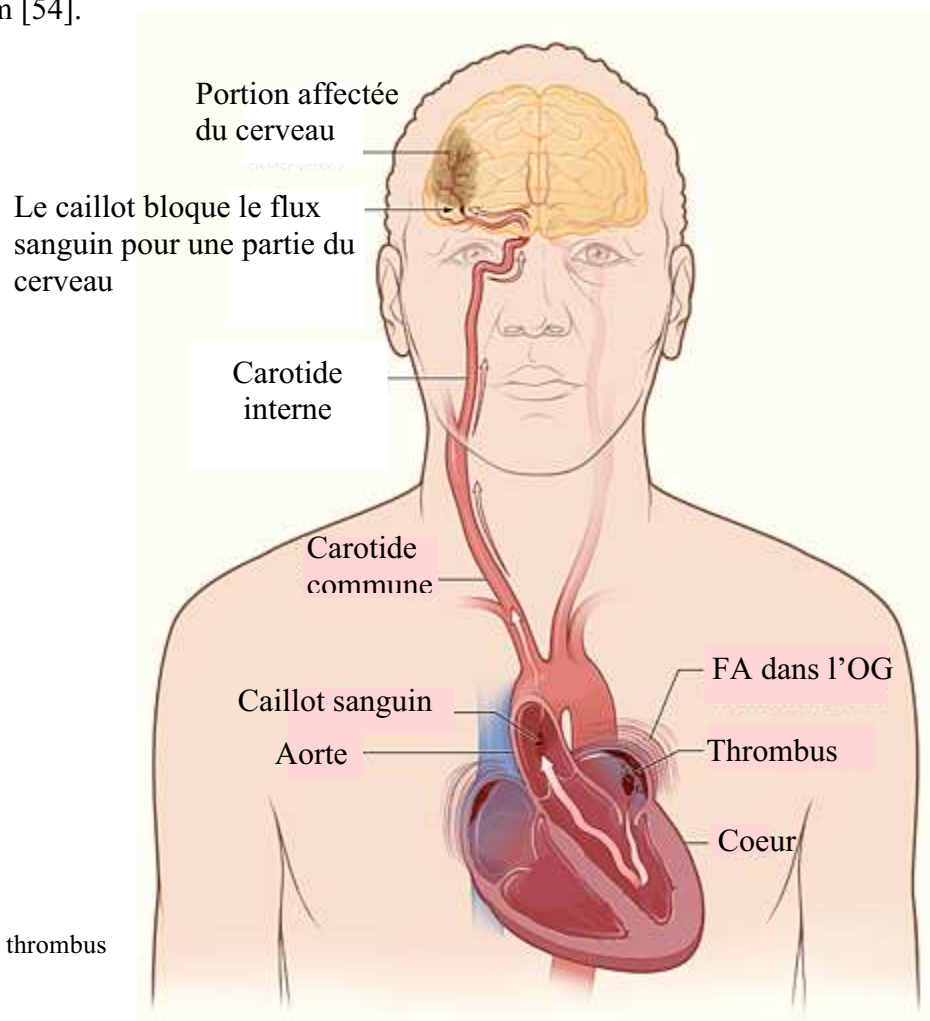


Figure 16: Migration d'un thrombus de l'oreillette au cerveau

4. Insuffisance cardiaque

Lorsque la fibrillation atriale est installée depuis longtemps, elle s'accompagne souvent d'une insuffisance cardiaque congestive et peut aboutir à une cardiopathie rythmique. Cette insuffisance cardiaque est le plus souvent en rapport avec une cardiopathie sous-jacente. Toutefois, dans certains cas, la fibrillation atriale peut être responsable de l'apparition d'une insuffisance cardiaque, notamment lorsque la conduction atrio-ventriculaire est bonne, et qu'un accès prolongé de fibrillation atriale s'accompagne alors d'une fréquence ventriculaire élevée.

G. Traitements

La cardioversion externe et interne, les traitements médicamenteux et de nombreux types de procédures d'ablation par cathéter sont actuellement utilisés pour contrôler la fibrillation atriale.

Le traitement actuel de la fibrillation atriale repose sur des approches pharmacologiques ou non pharmacologiques qui visent à rétablir le rythme sinusal ou à prévenir la récurrence des épisodes paroxystiques. Le traitement de l'étiologie de la fibrillation atriale reste un élément important car il peut favoriser les récurrences, soit par l'émergence d'autres foyers, soit par la réactivation du foyer précédemment ablaté.

1. Thérapie médicamenteuse

Deux approches peuvent être envisagées : soit une restauration du rythme sinusal avec des anti-arythmiques, soit un contrôle de la fréquence cardiaque avec des ralentisseurs du nœud auriculo-ventriculaire. Les différentes études (AFFIRM, STAF, RACE, HOT CAFE, AF-CHF) n'ont pas montré de différence de mortalité ni d'événements cardiovasculaires entre ces deux stratégies [76-77]. Par ailleurs, le bénéfice du traitement médicamenteux de fond après retour en rythme sinusal est discuté, en raison, d'une part, du manque de résultats d'efficacité convaincants, et, d'autre part, du risque arythmogène ventriculaire et de l'effet inotrope négatif de la quasi-totalité des anti-arythmiques.

Les moyens thérapeutiques les plus utilisés pour la restauration du rythme sinusal sont les médicaments anti-arythmiques et le choc électrique externe ou endocavitaire. Les indications

et les modalités d'utilisation et d'association de ces deux méthodes de cardioversion demeurent toutefois encore imprécises. Par rapport aux médicaments anti-arythmiques, la cardioversion électrique externe semble être la méthode de réduction des fibrillations atriales la mieux tolérée et la plus efficace, mais elle reste essentiellement réservée aux fibrillations atriales mal tolérées sur le plan hémodynamique et nécessite une anesthésie générale. Le succès d'une cardioversion d'une fibrillation atriale est d'autant plus important qu'elle est faite précocement.

2. Technique d'ablation

L'ablation au sein des veines pulmonaires permet d'éliminer ou de modifier le foyer déclencheur qui est le plus souvent localisé au niveau des veines pulmonaires.

La fibrillation atriale peut être initiée par des foyers ectopiques localisés à 2-4 cm à l'intérieur des veines pulmonaires. Comme l'ablation des différents foyers dans les veines pulmonaires s'accompagne de taux élevés de sténoses pulmonaires, le groupe de M. Haissaguerre a développé la technique d'ablation à la jonction veine pulmonaire - oreillette gauche pour isoler électriquement les veines pulmonaires. Une telle approche se sert de la nature des connections musculaires entre l'oreillette gauche et les veines pulmonaires et conduit à une déconnection électrique de la veine pulmonaire (figure 17).

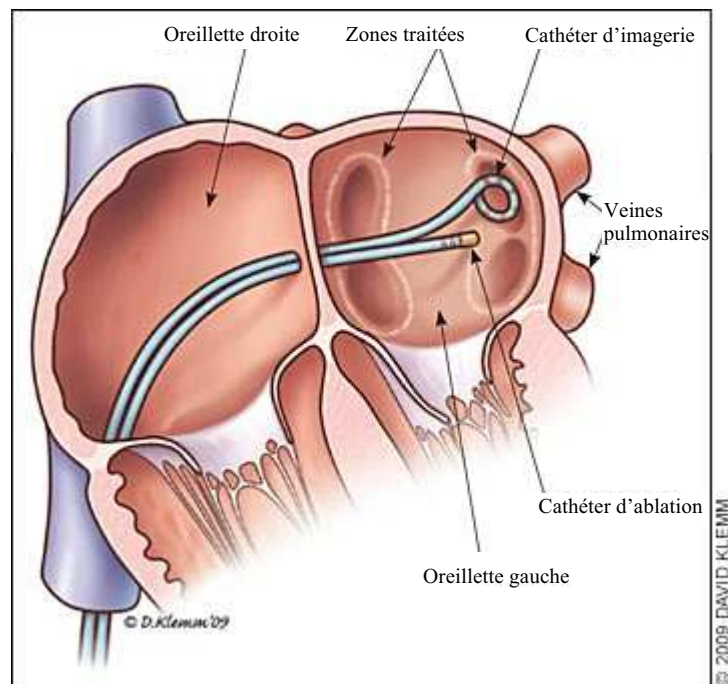


Figure 17: Principe de la technique d'ablation par radiofréquence

Le traitement de la fibrillation atriale par ablation chirurgicale des nerfs végétatifs a actuellement des résultats temporaires (50 à 80% des patients ayant eu une radiofréquence ont une récurrence dans les deux ans). L'ablation de tels foyers arythmogènes permet le plus souvent de prévenir la récurrence de la fibrillation atriale chez des patients qui étaient par ailleurs résistants à plusieurs anti-arythmiques à dose optimale.

De nombreuses études ont montré que les tachyarythmies atriales dont l'origine est les veines pulmonaires peuvent être traitées par ablation par radiofréquence [78-80]. Cependant, le taux de récurrence est assez élevé (15-45%) [81-83] et peut causer de sérieuses complications telles que la sténose pulmonaire [84-85]. L'ablation par radiofréquence a également pour conséquence une diminution importante des afférences vagales atriales.

Enfin, il faut savoir que l'ablation par radiofréquence ne permet pas de rétablir une fonction atriale hémodynamique normale. En effet, Thomas et al ont montré que la récupération est moins bonne qu'en cas de cardioversion réussie en comparant 47 patients ayant bénéficié d'une ablation par radiofréquence pour une fibrillation atriale, 33 sujets traités avec succès par cardioversion et 42 sujets normaux. Les résultats étaient inférieurs à ceux résultant d'une cardioversion réussie [86]

H. Coût de la prise en charge

La fibrillation atriale est l'arythmie cardiaque qui entraîne le plus grand nombre d'hospitalisations.

Au cours des 10 à 20 dernières années, les admissions pour fibrillation atriale ont augmenté de 66% et la fibrillation atriale est responsable du tiers des hospitalisations pour trouble du rythme cardiaque [1, 30].

La fibrillation atriale représente un coût de prise en charge très important pour la société. En 2004, l'étude COCAF (Cost of care in atrial fibrillation) a permis d'estimer le coût moyen en France à 3209€ par patient. La moitié des coûts sont attribuables aux coûts d'hospitalisations ; Ces patients sont principalement hospitalisés pour insuffisance cardiaque ou pour les thérapeutiques telles que les cardioversions et les ablations). Le quart du coût est attribuable aux médicaments [87].

Une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation de la fibrillation atriale pourrait permettre de diminuer à terme ces coûts élevés.

II. Facteurs de prédisposition à la fibrillation atriale

A. Les trois principaux facteurs de prédisposition– Triangle de Coumel

Outre ses fonctions physiologiques normales [88], le myocarde pulmonaire est une source majeure de fibrillation atriale [89].

La fibrillation atriale soutenue altère les propriétés électrophysiologiques et structurales du myocarde atrial. Ce remodelage atrial confère à l'oreillette une plus forte susceptibilité à l'initiation et à la maintenance de cette arythmie.

D'un point de vue physiopathologique, Philippe Coumel a montré que trois facteurs peuvent jouer un rôle dans la prédisposition à la fibrillation atriale (fig. 18) [90] :

- le système nerveux autonome,

Une prédominance vagale est en effet observée dans les premières minutes qui précèdent le début d'un épisode de fibrillation atriale chez certains patients.

- les phénomènes de micro-réentrée,

Un déclencheur focal ou de multiples vaguelettes de réentrée associées à des modifications des périodes réfractaires peuvent être à l'origine de l'initiation de la fibrillation atriale.

- les foyers de décharge ectopiques

La plupart des patients présentent des foyers d'activation ectopique localisés dans les veines pulmonaires. Ces foyers peuvent générer et conduire un courant électrique.

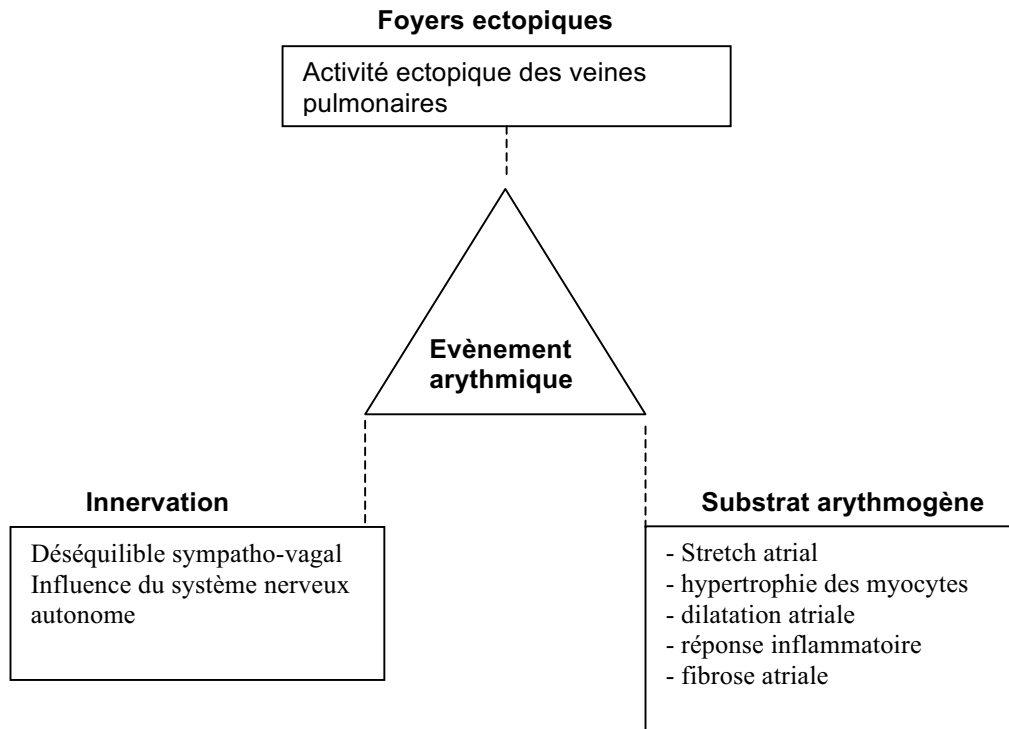


Figure 18: Facteurs de prédisposition à la fibrillation atriale

L'importance relative de ces facteurs est variable selon les formes cliniques [91].

B. Importance des veines pulmonaires dans la fibrillation atriale

De nombreuses études ont démontré l'importance de l'oreillette gauche et des veines pulmonaires dans la genèse de la fibrillation atriale. Cependant, le mécanisme de base sous-jacent à l'activité électrique anormale de ces structures reste mal connu.

Pour la majorité des patients, des foyers d'initiation de fibrillation atriale sont localisés au niveau de l'une ou plusieurs veines pulmonaires (figure 19) [89, 92-94]. Dans certains cas, l'arythmie peut prendre son origine au niveau la veine cave supérieure [95], ou du ligament de Marshall (une veine restante au niveau de l'oreillette gauche) [96].

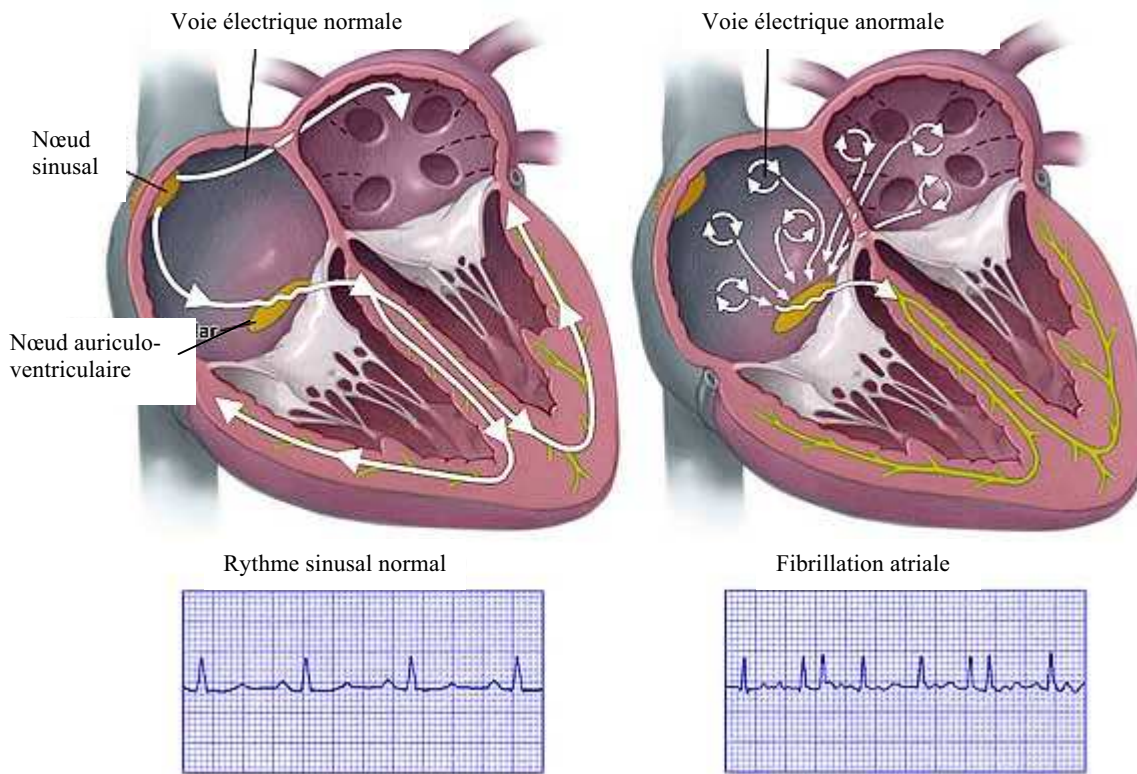


Figure 19: Foyers arythmogènes et fibrillation atriale

DM. Todd et al [97] ont démontré que lorsque l'oreillette gauche postérieure et les veines pulmonaires étaient chirurgicalement isolées, la région de la veine pulmonaire pouvait encore fibriller. En revanche, la région atriale restante maintient un rythme sinusal, prouvant ainsi le rôle critique de la veine pulmonaire dans la genèse de la fibrillation atriale. K. Kumagai et al ont cartographié l'activité de plusieurs veines pulmonaires au cours d'un épisode de fibrillation atriale, ils ont ainsi noté qu'une activité de décharge rapide dans une veine pulmonaire peut induire de manière similaire une décharge rapide dans les autres veines pulmonaires [98].

Un grand nombre de patients possédant des foyers de fibrillation atriale au niveau des veines pulmonaires n'a pas d'autres pathologies cardiaques sous-jacentes ou associées [89, 93-94, 99-100]. Les patients avec fibrillation atriale paroxystique ont généralement plusieurs foyers arythmogènes dans les veines pulmonaires et dans plusieurs veines pulmonaires et plusieurs de ces foyers peuvent être localisés distalement dans les veines pulmonaires (figure 20) [94]. De plus, chez les patients avec fibrillation atriale paroxystique, l'origine des principaux foyers de déclenchement est généralement localisée dans les veines pulmonaires supérieures gauches [89].

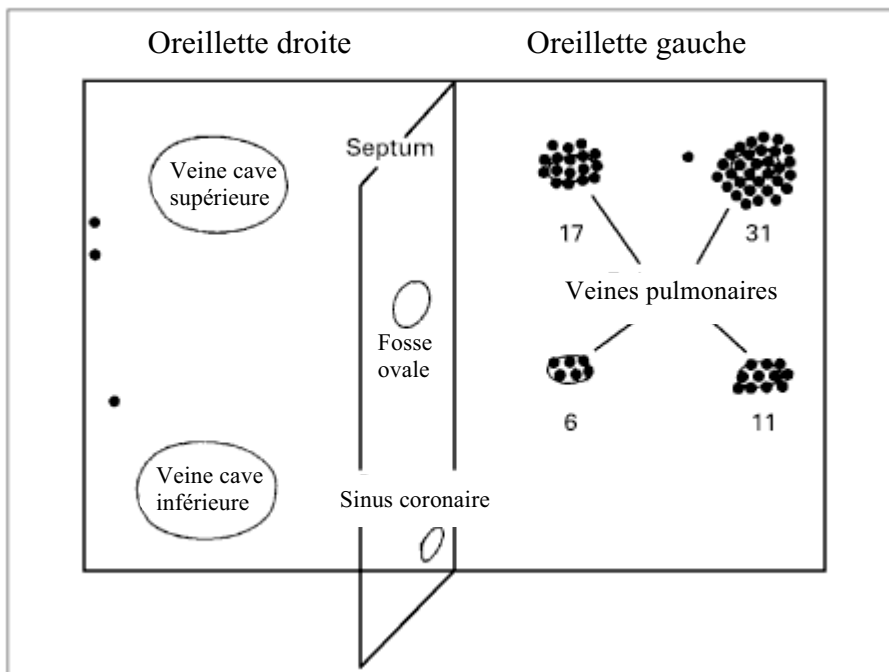


Figure 20: Diagramme représentant les sites de 69 foyers de déclenchement de fibrillation atriale chez 45 patients. Les nombres indiquent la distribution des foyers dans les veines pulmonaires (figure issue de [89]).

C. Innervation

Plusieurs équipes ont ainsi étudié l'origine nerveuse de la fibrillation atriale [101-104]. Il est bien établi, tant sur le plan expérimental que sur le plan clinique, que le système nerveux autonome (SNA) joue un rôle crucial dans la genèse, la maintenance et l'arrêt de la fibrillation atriale. Philippe Coumel a ainsi été le premier à décrire des arythmies atriales dites vagales et des arythmies atriales adrénergiques [105]. Il a également décrit une innervation végétative des veines pulmonaires et du toit de l'oreillette gauche [90]. Des facteurs modulateurs, avec un rôle important joué par le système nerveux autonome, peuvent d'une part favoriser le déclenchement des foyers arythmogènes et d'autre part moduler l'évolution de la fibrillation notamment en modifiant l'hétérogénéité des périodes réfractaires [90].

Ainsi, aussi bien le bras adrénergique que le côté vagal du système nerveux autonome peut être impliqué dans l'instabilité électrique atriale [101].

1. Le système nerveux cardiaque

Le système nerveux autonome innervé les organes assurant les fonctions homéostasiques du corps humain dont le cœur.

Le système nerveux autonome est constitué de deux versants, le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique (ou vague), dont les effets sont médiés par les neuromédiateurs libérés par la terminaison nerveuse dans l'espace synaptique au niveau de l'organe innervé.

Les médiateurs du système nerveux sympathique sont la noradrénaline et l'adrénaline. Cette dernière stimule les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques. L'activation de ces récepteurs va entraîner une activation de la cascade protéine Gs - adényl cyclase – AMPc - PKA qui va aboutir à une phosphorylation de certains canaux ioniques.

Le neuromédiateur du système nerveux parasympathique est l'acétylcholine qui va stimuler les récepteurs muscariniques (surtout M2) qui, via la protéine Gi, vont entraîner une diminution de l'adényl-cyclase, de l'AMPc et de la PKA. L'activation parasympathique va donc diminuer la phosphorylation des canaux ioniques. Par ailleurs, l'amplitude des effets du système nerveux parasympathique va dépendre du niveau d'activation du système nerveux sympathique. L'interaction des deux bras du système nerveux autonome est décrite comme la balance sympatho-vagale [106].

Les oreillettes sont innervées par les nerfs parasympathiques et sympathiques alors que les ventricules sont principalement innervés par les nerfs sympathiques [107] (figure 20). Par ailleurs, l'innervation cholinergique apparaît prédominante dans l'oreillette gauche, contrairement au ventricule [108-110].

Les terminaisons vagues se situent principalement dans l'endocarde, alors que les terminaisons sympathiques sont à la fois endocardiques et épicaudiques [110]. Par ailleurs, l'endocarde de l'oreillette gauche est moins innervé que l'endocarde des autres chambres cardiaques [110]. Un gradient de l'innervation épicaudique a été observé des ventricules aux oreillettes [111].

Chez l'homme, les terminaisons vagues sont localisées au niveau de deux panicules graisseuses ; l'un situé entre l'artère pulmonaire droite, l'aorte et la veine cave supérieure (innervation du nœud sinusal, des oreillettes et du nœud AV), l'autre situé entre la veine cave

inférieure, la face postérieure de l'oreillette gauche et l'ostium du sinus coronaire (innervation des oreillettes) [112].

L'innervation sympathique est complexe et asymétrique avec des axones prenant leur origine à partir des corps cellulaires neuronaux dans les ganglions stellaires et les troncs cervicaux sympathiques (chaîne sympathique cervicale), et coursant sur le mur ventriculaire gauche.

A la dispersion anatomique des fibres, correspond une distribution asymétrique de la réponse physiologique, en millisecondes pour les fibres cholinergiques, et en secondes pour les terminaisons adrénérgiques. Sur le plan électrophysiologique, la stimulation cholinergique raccourcit la période réfractaire des oreillettes et la durée du PA, augmente la dispersion des périodes réfractaires et provoque une hyperpolarisation cellulaire. En revanche, la stimulation adrénérgique raccourcit la période réfractaire atriale et le potentiel d'action mais n'a pas d'effet sur l'hétérogénéité des périodes réfractaires.

De plus, une population de récepteurs mécano-sensibles et chimio-sensibles envoie des signaux afférents en retour au système nerveux central si bien qu'il influence la fonction cardiaque via les circuits locaux intra-thoraciques (figure 20).

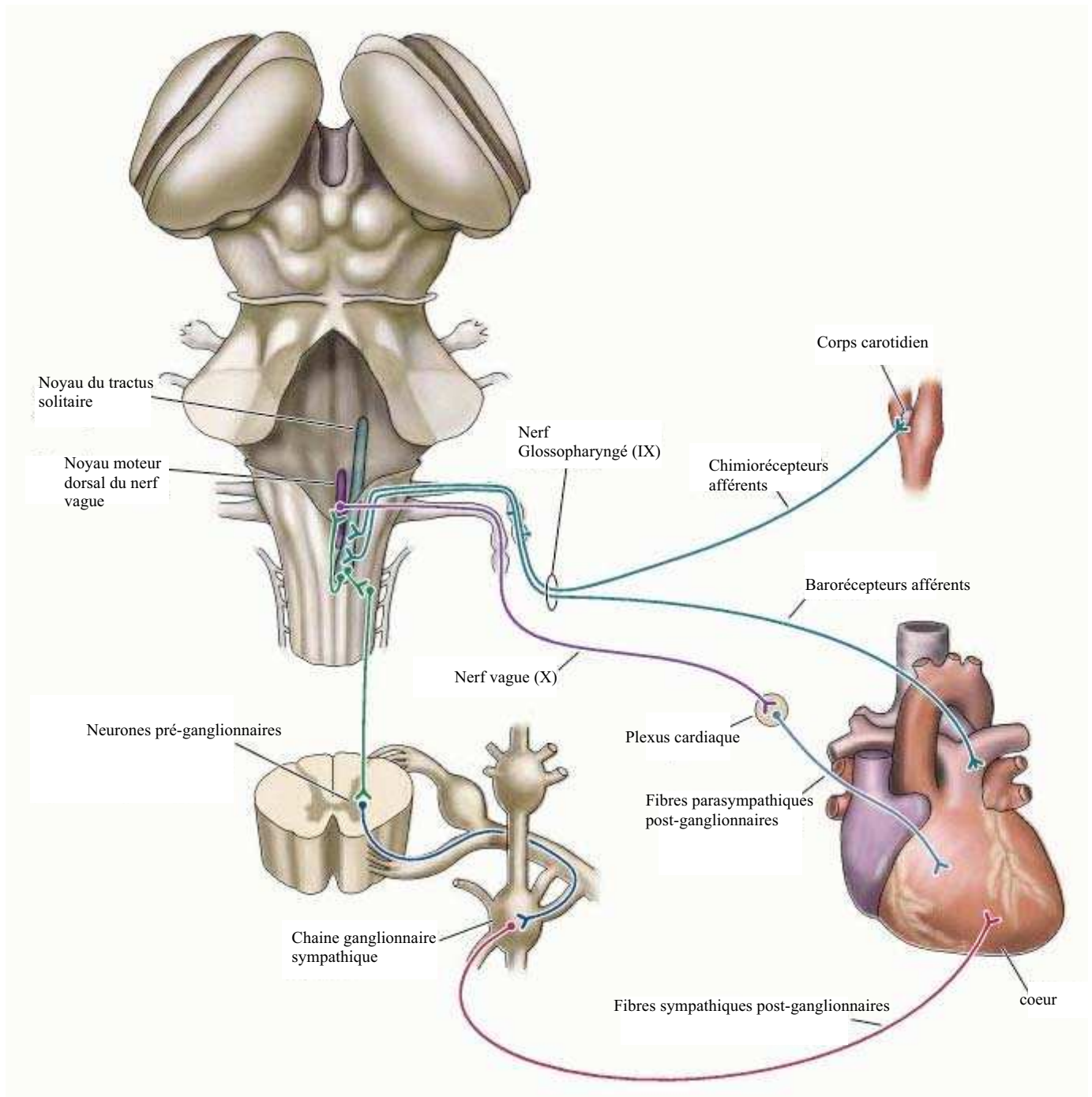


Figure 21: Régulation autonome de la fonction cardiovasculaire (Copyright © 2001 Sinauer Associates, Inc.)

➤ *Effet du système nerveux autonome sur les courants ioniques cardiaques*

Les canaux ioniques transmembranaires à l'origine des courants ioniques responsables du potentiel d'action cardiaque constituent les premiers effecteurs des effets électrophysiologiques du système nerveux autonome. Des récepteurs sensibles aux influx du système nerveux autonome modifient le rythme cardiaque normal et le rythme cardiaque pathologique en interférant avec le fonctionnement des pompes et des canaux.

La stimulation des récepteurs β -adrénergiques (surtout β_1) par l'adrénaline aboutit à une augmentation du courant dépolarisant calcique lent (I_{CaL}), du courant repolarisant sortant retardé (I_{ks}) et du courant dit Pacemaker (I_f) par la phosphorylation des canaux [113-115].

L'acétylcholine relarguée par les extrémités nerveuses parasympathiques va stimuler les récepteurs muscariniques (surtout M2) et va diminuer I_{CaL} et I_f mais augmenter le courant potassique repolarisant acétylcholine dépendant (I_{KAch}) [116-117].

Chacun des deux versants du système nerveux autonome va donc pouvoir à la fois jouer un rôle sur les courants dépolarisants et sur les courants repolarisants.

Au cours de la fibrillation atriale, la pression de remplissage cardiaque augmente pendant que la pression sanguine artérielle diminue, envoyant des messages contradictoires à la moelle. L'effet résultant est une augmentation de l'activité sympathique pour assurer la stabilité hémodynamique adéquate [107].

Dans la fibrillation atriale, notamment sur cœur sain, les principales anomalies du substrat atrial influençables par l'état du système nerveux autonome sont :

- des périodes réfractaires courtes
- une non-adaptation des périodes réfractaires à la fréquence cardiaque
- une dispersion anatomique des périodes réfractaires.

Les deux aspects du système nerveux autonome sont activés au cours d'un épisode d'arythmie, mais ce serait leur décalage dans le temps qui serait à l'origine du rôle arythmogène. Plusieurs travaux ont démontré le rôle arythmogène d'une prédominance vagale ou, à l'inverse, d'une prédominance sympathique [118].

2. Fibrillation atriale vagale et Fibrillation atriale adrénergique

L'altération du tonus autonome, impliquant à la fois le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique, est impliquée dans l'initiation de la fibrillation atriale paroxystique [119], que ce soit seul ou en lien avec d'autres anomalies [118].

Les fibrillations atriales vagues se voient plus fréquemment chez l'homme, débutent souvent vers l'âge de 30-50ans et se retrouvent en général chez des patients à cœur sain, dans un contexte de bradycardie progressive, avec des accès qui débutent la nuit, après les repas ou la consommation d'alcool [119]. Ce type de fibrillation atriale est également prédominant chez les patients dont les accès de fibrillation atriale sont initiés par des foyers arythmogènes au

niveau des veines pulmonaires [120-121]. Par ailleurs, l'implication du bras vagal semble prédominant dans la fibrillation atriale de part notamment les canaux $I_{K_{ACh}}$ et le gradient d'acétylcholine qui réduit la période réfractaire [122-123].

Au contraire, les fibrillations atriales adrénurgiques surviennent après un effort ou en période de stress ou de fortes émotions [124]. Il n'y a pas de prédominance masculine ni de tranche d'âge plus touchée. Cependant, une cardiopathie sous-jacente est souvent observée [105, 120, 121, 125].

M. Zimmermann et al. ont analysé l'activité du système sympathique avant le début d'un épisode de fibrillation atriale paroxystique. Le travail a porté sur treize patients atteints d'une fibrillation atriale focale dont l'origine se situe dans les veines pulmonaires. La variabilité sinusale a été étudiée par Holter ECG. Ils ont ainsi noté quinze minutes avant la crise de fibrillation atriale une augmentation de l'activité sympathique, suivie d'une modulation et d'une prédominance vagale juste avant le début de la fibrillation atriale [119, 125].

Dans un modèle canin de fibrillation atriale, il a été montré que le système nerveux sympathique module et maintient la fibrillation atriale induite cholinergiquement [126]. P.A. Gould et al ont montré une augmentation de l'innervation sympathique atriale en association avec une fibrillation atriale persistante [127]. Cette étude arrive aux mêmes constatations que les expériences réalisées chez le chien par C.M. Chang et al [128] et J.V. Jayachandran [129]. La stimulation des nerfs vagues déclenche une augmentation de l'hétérogénéité de la repolarisation atriale [103].

En fait, le rôle clinique du système vague n'est pas tout à fait clair. C. Pappone et coll, ont montré lors de l'ablation circonférentielle des veines pulmonaires par radiofréquence un meilleur résultat à long terme si l'ablation était associée à une dénervation vagale [130]. En effet, l'ablation par cathéter au niveau de ces sites peut potentiellement entraîner une dénervation. Toutefois, en raison à la plasticité neurale, une croissance neuronale et une hyperinnervation sympathique peuvent suivre [131].

Le rôle du système vague a été étudié par P. Schauerte. En effet, P. Schauerte et al ont montré, sur une série expérimentale de 21 chiens appareillés, que la stimulation parasympathique à haute fréquence dans la veine cave supérieure était capable d'induire d'authentiques

fibrillations atriales focales en déclenchant une activité de foyers automatiques au niveau des veines pulmonaires [132]. Les mêmes auteurs ont montré que l'ablation par radiofréquence des terminaisons vagales au niveau de l'artère pulmonaire droite ou au niveau des veines caves supérieure ou inférieure permet de réduire la diminution de la période réfractaire observée sous stimulation vagale et donc de prévenir la survenue d'une fibrillation atriale vagale [133].

L'activation vagale réduit en effet la période des réfractions atriales et augmente leur dispersion.

3. Rôle du baroréflexe

Le baroréflexe est un élément majeur de la régulation du système cardiaque mettant en jeu les effets des systèmes sympathique et parasympathique sur le cœur et les vaisseaux périphériques. Les barorécepteurs sont stimulés par une augmentation de la pression artérielle, ce qui induit une augmentation de l'activité parasympathique et une diminution de l'activité sympathique ; L'ensemble résultant à la fois en une diminution de la fréquence cardiaque, du débit cardiaque, et une augmentation de la vasodilatation périphérique afin de ramener la pression artérielle à son état initial.

Il a été montré que l'activité nerveuse sympathique augmente suivant l'induction de la fibrillation atriale. Le baroréflexe artériel peut jouer un rôle majeur en médiant la sympathoexcitation avec une contribution minimale à partir du baroréflexe cardiopulmonaire. Ces changements du réflexe apparaissent comme étant appropriés pour assurer une stabilité hémodynamique adéquate. Cependant, chez certains patients, le baroréflexe cardiopulmonaire peut jouer un rôle plus grand permettant ainsi un plus haut degré d'inhibition sympathique et d'activation vagale [134].

La présence d'un gain baroréflexe anormal et ainsi un tonus vagal diminué peut être associé avec une susceptibilité augmentée à la fibrillation atriale, au moins chez les patients avec une fibrillation atriale non-vagale. Ceci a été démontré par F. Lombardi et al [135-136] qui a montré que le temps de première réapparition de fibrillation atriale était plus long chez les patients avec un haut gain baroréflexe comparé avec patient avec faible gain baroréflexe.

YJ. Chen et al ont montré que la sensibilité baroréflexe était un puissant déterminant de l'occurrence de la fibrillation atriale. L'augmentation de la modulation de l'activité vagale, secondairement à l'activation des récepteurs cardiopulmonaires, peut jouer un rôle important dans la maintenance de la fibrillation atriale [137].

Finalement, il est aussi possible que l'arythmie elle-même puisse avoir un impact sur ces réflexes. Lorsque la fibrillation atriale est persistante et faiblement contrôlée, elle résulte de tachycardie induite par une cardiomyopathie qui est souvent associée avec un affaiblissement du baroréflexe cardio-pulmonaire. Dans une moindre mesure, il a été montré que la fibrillation atriale récurrente est associée avec une dilatation atriale, ce qui peut mener à un affaiblissement du baroréflexe cardio-pulmonaire.

L'implication du système nerveux autonome dans la survenue de la fibrillation atriale pourrait expliquer le lien entre apnée du sommeil et la fibrillation atriale. En effet, plusieurs observations cliniques ont suggéré que l'installation d'un épisode de fibrillation atriale est souvent associée à des variations du tonus autonome. Une altération du tonus autonome peut être un important mécanisme intermédiaire sous-jacent à l'association de désaturation en oxygène nocturne survenant chez les patients avec apnée du sommeil et incidence de fibrillation atriale [138]. Ce rôle de l'apnée du sommeil est suggéré mais n'est pas formellement établi.

Plusieurs facteurs promoteurs de la fibrillation atriale sont en effet impliqués dans le mécanisme d'apnée du sommeil (hypoxémie intermittente, oscillations de la pression intrathoracique, augmentation du stress de la paroi cardiaque, augmentation de l'activité sympathique). En effet, une pression intra-thoracique élevée cause un gradient de pression transmurale élevé qui peut à son tour mener à un stretch atrial. L'apnée du sommeil obstructive est associée avec un déséquilibre autonome [139] et une dysfonction diastolique [140].

4. Relation entre le système nerveux autonome, l'hypertension et la fibrillation atriale

La fibrillation atriale liée au stretch a aussi été rapportée comme étant liée aux changements dans l'électrophysiologie de la veine pulmonaire supérieure gauche [141]. Les veines pulmonaires sont en effet soumises au stretch de part le flux sanguin pulsatile. Les neurones sont couplés aux mécanorécepteurs et sont modulés par ces dernières structures. Ainsi, les changements hémodynamiques peuvent modifier la vulnérabilité arythmique via le système nerveux intrinsèque.

Il est suggéré que le stress barométrique chronique peut promouvoir une excitabilité anormale de l'oreillette gauche. Les récepteurs du stretch ont été décrits comme un composant du processus arythmogénique atrial chez les patients hypertendus. Expérimentalement, il a été démontré qu'une augmentation de la pression atriale au cours de la tachycardie peut activer les mécano-récepteurs cardiaques menant à une augmentation de l'activité vagale. Ceci souligne la théorie du « stretch atrial », où le stretch atrial, secondairement à une augmentation des pressions atriales, augmente la dispersion de la période de réfraction effective atriale, et favorise le développement de la fibrillation atriale [137].

D. Foyers de décharge ectopiques

L'origine focale pourrait être le mécanisme prédominant en cas de fibrillation atriale paroxystique par rapport à la fibrillation atriale permanente [90]. Cependant, ce mécanisme reste encore assez peu connu [142-143].

La détection endocavitaire de foyers d'activité spontanée au cours des traitements par radiofréquence suggère la présence de cellules capables d'activité électrique rythmique spontanée. Ces foyers de décharge ectopiques seraient créés par des cellules douées d'une autorythmicité. La nature de ces cellules n'a jusque là pas été clairement identifiée. Plusieurs hypothèses ont cependant été émises.

M. Haïssaguerre a ainsi montré que les foyers de déclenchement sont dans 89 à 96 % des cas localisés au niveau des veines pulmonaires, et plus précisément au sein des extensions musculaires du tissu atrial. Il a montré que l'ablation par radiofréquence permet d'isoler ces foyers et donc de traiter efficacement la maladie chez 75 — 85 % de ces patients [89]. Cependant, la fibrillation atriale dite focale ne représente qu'une faible part des fibrillations atriales rencontrées en pratique clinique. L'émergence d'autres foyers arythmogènes à distance de l'ablation est ainsi envisagée [144-145].

Par ailleurs, des études de microscopie électronique ont décrit la présence de cellules P, de cellules de Purkinje et de cellules transitionnelles dans les veines pulmonaires [146-147] ; Récemment, des ces cellules de conduction spécialisée pourraient jouer ce rôle de cellules pacemaker mais aucune donnée n'a pu le montrer.

Plus rarement, les foyers sont localisés en dehors des veines pulmonaires, au niveau de l'auricule droit, de la veine cave supérieure ou du sinus coronaire [90].

L'activité focale dans les veines pulmonaires a été étudiée par plusieurs études d'électrophysiologie de cellules musculaires cardiaques des veines pulmonaires. Ces études ont notamment porté sur les délais de conduction du potentiel d'action [148-149], les modifications de la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire effective [150-152], la décharge à haute fréquence, la surcharge calcique intracellulaire causant les post-dépolarisations précoces [132, 153-154], les modifications au niveau des canaux ioniques qui peuvent causer une automaticité anormale [155-157] de myocytes dans les veines pulmonaires [146-147, 158].

E. Micro-réentrées

Des circuits de micro-réentrées ont été suggérés à partir d'études de modélisation.

De nombreuses études expérimentales et cliniques ont montré que quelque soit la cause initiale et les déclencheurs, la fibrillation atriale cause des altérations des propriétés électriques atriales (remodelage électrique) [159-164]. Ces altérations mènent à des changements de la durée du potentiel d'action, des périodes réfractaires effectives et de la vitesse de la conduction, ce qui facilite l'apparition de multiples ondes de ré-entrée [164-165].

1. Circuits de re-entrée

La période réfractaire dépend de la durée du potentiel d'action, qui est lui-même gouverné par les propriétés intrinsèques des courants ioniques du tissu atrial. Les propriétés de conduction sont déterminées principalement par les canaux sodiques et les connexines.

La réduction des courants sortants augmentent la période réfractaire, empêchent la ré-entrée et s'opposent à la fibrillation atriale.

Les réductions du courant entrant et les augmentations des courants sortants réduisent la période réfractaire et permettent ainsi de promouvoir la fibrillation atriale. L'augmentation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ promeut l'activité ectopique liée à des post-dépolarisations [166-167], qui peut également avoir un rôle dans la maintenance de la fibrillation atriale [98, 168]. L'activation des canaux mécano-sensibles par le stretch peut faciliter à la fois l'activité ectopique et le phénomène de ré-entrée.

Des études chez le chien ont montré qu'une organisation musculaire et une orientation des fibres musculaires spécifiques étaient plus favorables à la création de courant de micro-réentrée en bloquant ou retardant la conduction électrique dans les myocytes atriaux. Un

substrat atrial vulnérable, qui présente un seuil de déclenchement bas, favorise les multiples réentrées du fait d'une hétérogénéité des périodes réfractaires, de l'irrégularité et d'une vitesse de conduction lente due à la fibrose interstitielle [90].

La présence de plusieurs courants de réentrée dans les veines pulmonaires a également été montrée *in vitro* [148, 169]. Les multiples réentrées d'ondelettes peuvent avoir un rôle pivot dans l'interaction des veines pulmonaires et de la fibrillation atriale. Des études de cartographie ont suggéré que la réentrée dans les veines pulmonaires est très probablement responsable de leur arythmogénicité, bien que le rôle d'une activité focale ou déclenchée ne puisse être exclue [92].

2. Nœud sino-atrial et fibrillation atriale

On peut retrouver des associations entre les anomalies de la fonction du nœud sino-atrial et la fibrillation atriale. La faible conduction caractéristique dans le nœud sino-atrial peut être impliquée dans la maintenance de l'arythmie. Cette association entre la fibrillation atriale et le nœud sino-atrial serait probablement due à une pathologie qui affecte simultanément le nœud sino-atrial et l'oreillette plutôt qu'une simple participation d'une pathologie du nœud sino-atrial dans la fibrillation atriale [135, 170-172].

3. Anisotropie

La structure de l'anatomie des veines pulmonaires et de la jonction VP-OG est importante pour comprendre les propriétés électriques des veines pulmonaires.

Des études expérimentales ont montré que les cardiomyocytes en fibrillation atriale subissent des changements structuraux dramatiques incluant notamment une hypertrophie cellulaire, une désintégration de l'appareil contractile, une accumulation de glycogène, et des changements de la taille et de la forme des mitochondries [173-177]. Lors de fibrillation atriale, en plus de ces changements complexes, les myocytes atriaux, montrent des signes de dégénération et d'apoptose [178-180]. Toutes ces études suggèrent l'implication d'un second facteur dans la pathogénèse de la fibrillation atriale [181], qui est le remodelage structural.

α. Jonctions intercellulaires

Parmi les composants du myocarde atrial, les plus déterminants sont la taille et l'organisation des myocytes individuels et la composition de la matrice extracellulaire [165, 182] et les jonctions intercellulaires [183-186].

La fibrillation atriale permanente chronique est associée à des changements distincts dans le pattern de distribution des jonctions formants les disques intercalés atriaux [187]. Ces jonctions étant formées de connexines (figure 22). Dans le tissu cardiaque, les connexines les plus abondantes sont les connexines 40, 43 et en moindre quantité la connexine 45 [188-192].

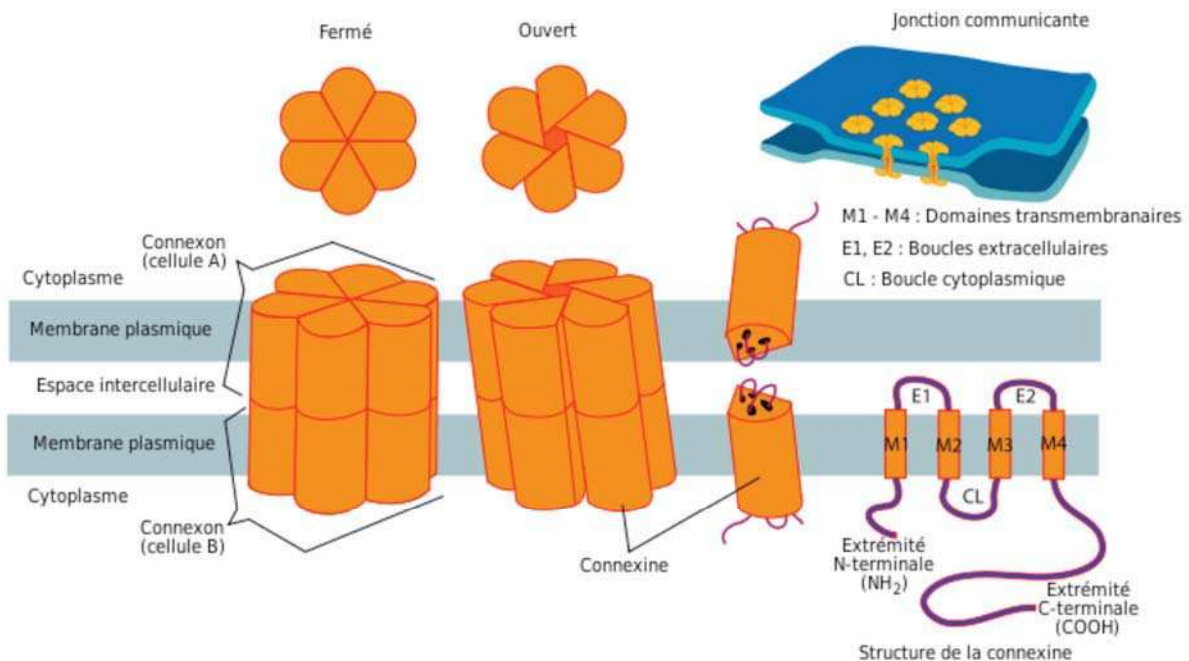


Figure 22 : Schéma d'une jonction gap. Le principal élément, le connexon, est composé de connexines.

Des études sur la chèvre ont montré que lors de l'induction de la fibrillation atriale persistante, les myocytes atriaux réactivent un programme d'expression génique fœtale concernant les jonctions entre myocytes [173, 175, 176, 179].

Chez les patients en fibrillation atriale, on note :

- Un changement de la répartition des connexines. Les rapports entre les connexines 40, 43 et 45 sont modifiés [192-195].
- Une modification de la distribution des connexines au sein de la cellule [194, 196-197].

- que ces modifications peuvent avoir un retentissement sur la conduction intra ou intercellulaire [198].

L'expression anormale des connexines mène à une conduction intercellulaire perturbée et réduit la conductance entre les cellules qui peuvent être liées à la fibrillation atriale [199].

La fibrillation atriale étant une arythmie de ré-entrée [163, 165], le lien entre le remodelage structural des jonctions intercellulaires et la fibrillation atriale est aussi supportée par le fait que de tels réarrangements des jonctions intercellulaires ont été décrites dans d'autres types d'arythmie de réentrée comme celles associant les infarctus du myocarde [200-202], les cardiomyopathies [203-204] et les hypertrophies du myocarde [183-185, 205-206].

La distribution de ces jonctions intercellulaires, responsables du couplage cellule-cellule, aurait une importance dans la conduction normale ou anormale dans les différentes régions du cœur dont le myocarde atrial [192, 207-208] et autour de la jonction atrio-veineuse [209]. En général, l'expression clairsemée des connexines est retrouvée dans des structures de vélocité de faible conduction montrant une automaticité spontanée telles que le nœud sino-atrial [210-211], et le nœud atrio-ventriculaire [187]. Au contraire, des niveaux d'expression élevée des protéines de ces jonctions sont retrouvés dans des tissus de conduction rapide tels que le système de conduction ventriculaire et le myocarde [209].

β. Manchon musculaire des veines pulmonaires

DW. Cheung a montré en 1981 que les tissus cardiaques des manchons musculaires des veines pulmonaires peuvent générer des potentiels d'actions et présentent ainsi une activité spontanée lente [212].

On retrouve dans les veines pulmonaires proximales une organisation multicouche musculaire (manchon myocardique) provenant de l'oreillette gauche. Cette organisation complexe se dissémine le long des veines pour se retrouver en cluster jusque dans la partie distale des veines pulmonaires [88, 149, 213-214]. La plupart des études ont montré que les fibres myocardiques couvrent plus de 100% de l'ostium des veines pulmonaires, cependant la longueur et l'épaisseur des manchons myocardiques varient beaucoup à l'intérieur des veines

pulmonaires. De la même manière que dans l'oreillette, les gap-jonctions (connexine 43) sont fortement exprimées entre les cardiomyocytes des veines pulmonaires.

Ces structures ont notamment été étudiées chez le chien dont la morphologie et la structure des veines pulmonaires sont similaires à l'homme. S. Verheule et al a ainsi mis en évidence que les myocytes des manchons musculaires des veines pulmonaires sont similaires à ceux des myocytes atriaux normaux. Il a alors suggéré que l'orientation circumférentielle des myocytes des manchons pourrait être un substrat pour une réentrée circulaire rapide [149].

Les cardiomyocytes isolées des veines pulmonaires contiennent un ou deux noyaux et possèdent des striations régulières contenant de l' α -actinine [215].

On retrouve des variations de ces compositions dans les cas pathologiques, notamment entre les patients avec et sans fibrillation atriale. RJ Hassink et al, dans une étude anatomique post-mortem, a montré que les manchons myocardiques sont retrouvés chez tous les patients avec fibrillation atriale, alors qu'ils ne sont retrouvés que chez 85% des patients sans fibrillation atriale [216]. I. Kholova et J. Kautzner ont aussi montré que la longueur et l'épaisseur du manchon myocardique sont plus élevées dans les VPSG chez les patients avec fibrillation atriale par rapport aux patients contrôles [217].

La présence d'amylose et de cicatrices a été retrouvée plus fréquemment par I. Steiner et al dans les manchons myocardiques des veines pulmonaires des personnes âgées avec fibrillation atriale, suggérant un qu'il peut s'agir d'un substrat arythmogène pour la fibrillation atriale [218].

➤ **Origine du manchon musculaire des veines pulmonaires**

La morphologie et la physiologie du myocarde ont été beaucoup étudiées. En revanche, peu de choses sont connues sur l'origine du développement et les mécanismes moléculaires contrôlant sa formation et son phénotype. Deux hypothèses ont été formulées et restent controversées:

- le manchon est formé à partir du myocarde atrial, qui migre autour de la veine pulmonaire après sa jonction avec l'oreillette ;
- les cellules myocardiques du manchon sont formées à partir de la différenciation des cellules mésenchymateuses pulmonaires.

L'étude de MT. Mommersteeg et al 2007 a montré que la formation du manchon myocardique chez la souris est un processus en deux phases qui unit les deux précédentes hypothèses [219] (figure 23).

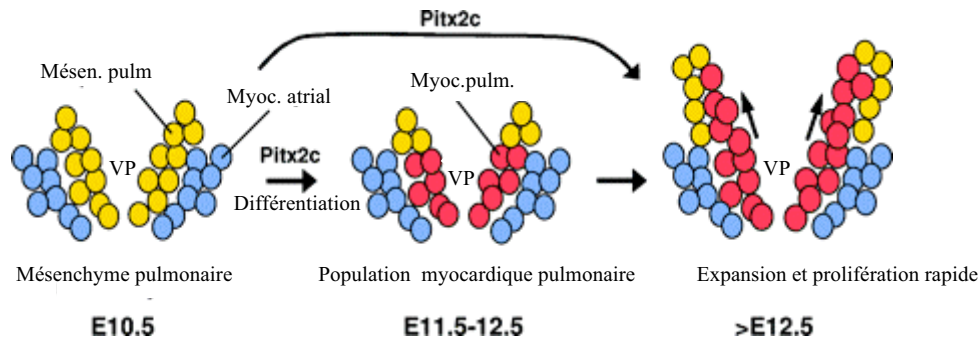


Figure 23: Modèle à deux étapes pour la formation du myocarde pulmonaire. Le mésenchyme pulmonaire (Mésén. Pulm.) se différencie dans le myocarde ou, alternativement, mais de manière moins probable, est envahi par le myocarde atrial (myoc.atrial). Ce processus dépend de Pitx2c. Le myocarde pulmonaire nouvellement formé entame alors une phase de prolifération rapide et se développe pour former la feuille du myocarde autour des branches des veines pulmonaires (VP) [219].

Une population de cellules myocardiques se forme *de novo* à la jonction VP-OG. Des marquages génétiques ont révélé que les cellules atriales ne contribuent pas à cette population de cellules, indiquant qu'elles se forment à partir de la différenciation des cellules mésenchymateuses pulmonaires. Ces cellules myocardiques pulmonaires initient alors une phase de prolifération rapide et forment le manchon musculaire pulmonaire. Nkx2.5 et son gène cible codant pour la connexine 40, sont exprimés dans l'oreillette et le myocarde pulmonaire mais pas dans le retour veineux systémique, qui lui exprime le canal pacemaker HCN4. Cette équipe a suggéré un mécanisme cellulaire pour la formation du myocarde pulmonaire et a mis en évidence les rôles clés joués par Pitx2c et Nkx2-5 dans sa formation et son identité [219].

Ainsi, deux populations de cellules diffèrent dans leur sensibilité aux perturbations génétiques : les cardiomyocytes des veines pulmonaires étant plus sensibles à un changement de phénotype de type nodal. MT. Mommersteeg et al suggèrent ainsi que chez l'homme, des variations génétiques inter-individus peuvent déclencher un shift du phénotype des cardiomyocytes des veines pulmonaires, l'automatisme et donc la fibrillation atriale [219].

L'hypothèse émise par MT. Mommersteeg est appuyée par les travaux de J. Mueller-Hoecker [220]. Dans un premier temps, ils ont constaté que les cardiomyocytes des veines pulmonaires humaines possèdent le même phénotype que dans le myocarde, comme cela a été prédit par les études de MT. Mommersteeg basées sur l'embryologie. Dans un second temps, la forte variabilité individuelle et la distribution des cardiomyocytes des veines pulmonaires humaines correspondent bien avec un modèle de variation génétique comptant pour une susceptibilité variable à la fibrillation atriale. Ainsi, il suggère que les cardiomyocytes des veines

pulmonaires humaines peuvent représenter un vestige de l'embryogenèse des veines pulmonaires, constituant une source de production ectopique d'ondelettes de ré-entrée indépendante dans un sous-groupe de patients ayant une prédisposition génétique [220].

γ. Dilatation des veines pulmonaires

La dilatation des veines pulmonaires est un facteur important de l'arythmogénèse des veines pulmonaires [221]. Une augmentation de la pression atriale augmenterait l'activité arythmogénique des veines pulmonaires avec une accélération du taux de décharge des veines pulmonaires. Le stretch augmente l'automatisme et l'activité déclenchée dans les veines pulmonaires. Ces effets pro-arythmogéniques peuvent être supprimés par les bloqueurs du canal du stretch [141, 222]. Ces données peuvent expliquer qu'il est retrouvé une plus haute incidence de fibrillation atriale chez les patients avec des veines pulmonaires dilatées [141]. WS. Lin et al, par des études d'angiographie des veines pulmonaires, ont suggéré que les patients avec fibrillation atriale paroxystique ont des veines pulmonaires dilatées par rapport aux patients sans fibrillation atriale paroxystiques [223].

Ainsi, le courant cationique induit par le stretch permet l'entrée de sodium Na^+ ou la sortie de potassium K^+ . Il permet de dépolariser la cellule au potentiel de repos (favorisant l'activité ectopique) et de la repolariser au cours de la phase positive de dépolarisation à 0mV, diminuant la durée du PA et promouvant la re-entrée. Ce courant cationique induit par le stretch peut avoir un rôle dans l'initiation de la fibrillation atriale dans les veines pulmonaires et les autres tissus atriaux sujets au stretch. Il a été montré que la toxine de la mygale Tarantula, bloqueur des canaux stretch-dépendant, inhibe spécifiquement la fibrillation atriale liée au stretch aigu sur des cœurs de lapin [224].

δ. Propriétés électriques des veines pulmonaires

Les cardiomyocytes des veines pulmonaires contiennent les mêmes courants ioniques membranaires que ceux présents sur les cellules cardiaques. Cependant, on peut noter des différences sur la caractéristique des canaux dans les cardiomyocytes des veines pulmonaires comparés à ceux de l'oreillette gauche [157]:

- les courants rectifiants entrants des veines pulmonaires sont plus petits
- les courants rectifiants retardés sont plus longs

que dans l'oreillette gauche.

Le seul courant pacemaker connu dans les cardiomyocytes des veines pulmonaires est le courant I_f [150, 225]. La faible incidence de courants pacemaker dans les veines pulmonaires suggère que les cellules pacemaker des veines pulmonaires sont différentes de celles du nœud sinusal, qui a un courant pacemaker proéminent [226]. Certains cardiomyocytes des veines pulmonaires ont des courants transitoires entrants [150, 225] qui sont similaires aux cardiomyocytes du sinus coronaire [227]. DW. Cheung et al [228] ont été les premiers à démontrer que l'administration de digitaliques dans les veines pulmonaires de cobaye peut induire une activité de déclenchement, résultant en une tachyarythmie atriale. Ils ont obtenu le même résultat avec l'administration d'isoproterenol, un agoniste de la famille des récepteurs adrénergiques [148, 225].

ε. Lien entre anisotropie et conduction électrique

Des changements brutaux dans la direction des fibres des veines pulmonaires peuvent induire une baisse de la conduction. Une anisotropie non uniforme due à la complexité de la structure myocardique peut faciliter les réentrées dans les veines pulmonaires. A. Hamabe et al [229] ont suggéré que la rupture de l'activité électrique à la jonction VP-OG étaient corrélés avec les structures anatomiques sous jacentes. Des études histologiques ont montré que le délai de conduction était secondaire aux espaces de tissus conjonctifs entre les muscles entourant les veines pulmonaires et l'oreillette. Comme cela a été montré dans l'étude de M. Hocini, les blocs de conduction à l'intérieur des veines pulmonaires sont associés à des changements abrupts dans l'orientation des fibres [229-230]. Les patients avec fibrillation atriale ont un substrat dans les veines pulmonaires propice à la réentrée avec une période réfractaire courte et des régions de délai de conduction [231]. Chez les patients avec fibrillation atriale originaire des veines pulmonaires, les anti-arythmiques de classe I, II, III peuvent supprimer l'activité focale des veines pulmonaires et la fibrillation atriale [121, 134].

ζ. Apoptose et fibrose

La fibrose interstitielle induit une non-uniformité de la propagation contribuant au bloc de la conduction locale et à des ré-entrées même dans les petites régions du tissu atrial [182]. Elle peut ainsi former un substrat de conduction très lente [232]. Elle peut aussi engendrer un réarrangement des connections entre les myocytes atriaux.

D. Li et al ont comparé les changements atriaux induits par une stimulation rapide des oreillettes (remodelage électrique) à ceux secondaires à une tachymyocardiopathie induite par

la stimulation ventriculaire rapide (remodelage anatomique) [233]. Ainsi, outre un temps passé en fibrillation atriale plus long par rapport au groupe contrôle, les chiens en insuffisance cardiaque présentaient des signes de remodelage atrial à la biopsie. Sur le plan histologique, en cas d'insuffisance cardiaque, les auteurs retrouvaient une fibrose interstitielle extensive avec un aspect de dégénérescence cellulaire. Ainsi, les agrégats de myofibrilles étaient moins denses que chez les animaux du groupe contrôle avec une destruction focalisée ou extensive du sarcomère. Les cellules étaient séparées par d'épaisses couches de tissu fibreux accompagné d'une augmentation du nombre de fibroblastes, de la quantité de collagène ainsi que parfois du nombre de cellules graisseuses. À noter que les changements histologiques semblaient similaires dans les deux oreillettes, avec néanmoins une prédominance au niveau de l'oreillette gauche [233].

Le système angiotensine joue un rôle dans la progression de la fibrose interstitielle [234] et dans la promotion du remodelage jonctionnel cellulaire [216, 235].

A. Goette et al ont montré que le système rénine angiotensine jouerait également un rôle important dans la genèse et l'évolution de la fibrose [236]. Des biopsies atriales ont été effectuées chez trente patients à l'occasion d'une chirurgie cardiaque. Onze patients présentaient une fibrillation atriale persistante depuis au moins six mois. Huit patients présentaient une fibrillation atriale paroxystique, alors que onze patients étaient en rythme sinusal. Les récepteurs de l'angiotensine II, AT1-R et AT2-R, ont été localisés dans le tissu atrial par immunohistochimie et quantifiés. Le taux de AT1-R était réduit de 34,9 % dans les fibrillations atriales persistantes ($p < 0,01$) et de 51,7 % dans les fibrillations atriales paroxystiques ($p < 0,05$) en comparaison au groupe en rythme sinusal. Par ailleurs, le taux d'expression des récepteurs AT2- R était augmenté de façon non significative dans le groupe en fibrillation atriale persistante (246 % ; mais $p = \text{NS}$) alors que son élévation était significative dans le groupe avec fibrillation atriale paroxystique (505 % ; $p < 0,01$). Il semble ainsi que l'expression des sous-types de récepteurs à l'angiotensine ressemble à celle observée chez les patients en insuffisance ventriculaire gauche terminale. On pourrait dès lors penser que les modifications observées pendant la fibrillation atriale pourraient évoquer une myopathie atriale terminale, ce qui est conforté par les anomalies tant morphologiques que fonctionnelles observées dans les fibrillations atriales permanentes [236].

L'angiotensine II apparaît comme un élément clé du remodelage atrial en association avec la fibrillation atriale. Ceci permet d'ouvrir des possibilités d'exploitation de thérapies en amont pour prévenir ou retarder le remodelage atrial.

La forte activité liée à la fibrillation atriale peut mener à une surcharge calcique du myocyte et dans certains cas peut mener à l'initiation de la perte de myocytes atriaux par apoptose [220]. Cette perte de myocytes est typiquement accompagnée par un remplacement par du tissu fibreux. Ainsi, un certain nombre de ces myocytes dystrophiques sont probablement éliminés du myocarde auriculaire lors de l'activation d'un programme de mort et, ainsi, une partie de ce remodelage cellulaire est irréversible [180].

Dans le myocarde d'oreillette pathologique, l'expression de la caspase 3, protéase qui joue un rôle déterminant dans l'exécution du programme de mort cellulaire, est augmentée, ainsi que l'expression de la protéine Bax, une protéine régulatrice qui favorise l'apoptose. En revanche, l'expression de la protéine Bcl-2, protéine régulatrice qui protège de l'apoptose, est diminuée. Cependant, l'absence de noyau fragmenté et d'ADN régulièrement dégradé suggèrent l'activation d'un programme biologique aboutissant à des altérations irréversibles des cellules mais d'une manière distincte d'une véritable mort par apoptose [180, 237].

L'activation atriale rapide de la fibrillation atriale résulte en une surcharge calcique dans les myocytes atriaux menant à une mort de ces cellules [180]. L'apoptose liée à la fibrillation atriale induit une faible réponse inflammatoire, incluant la cicatrisation et la réparation tissulaire qui peuvent mener à un remodelage structural et électrique atrial.

F. Inflammation

L'inflammation peut jouer un rôle important dans la genèse de la fibrillation atriale [238-239]. Le concept de l'implication de l'inflammation dans la fibrillation atriale est supporté par l'occurrence fréquente (25-40%) de la fibrillation atriale après une chirurgie cardiaque [240] et par les études génétiques [241]. L'inflammation peut perpétuer le remodelage électrique et structural et promeut la chronicité de la pathologie, notamment après une chirurgie cardiaque [242].

L'hypothèse du syndrome inflammatoire pro arythmique repose sur des constatations cliniques et expérimentales. Des études chez l'animal et sur l'homme ont montré qu'au cours des arythmies atriales, des niveaux plus élevés de stress oxydatif et d'inflammation pouvaient être mesurés localement et en systémique et que l'expression de gène pro-thrombotique est

altérée [243]. Notamment, chez l'animal, l'application d'acide arachidonique sur l'épicaire provoque une fibrillation atriale qui est prévenue par l'ibuprophène, un anti-inflammatoire. Chez l'homme, des biopsies myocardiques atriales réalisées chez douze patients en fibrillation atriale ont mis en évidence une infiltration de type inflammatoire dans le tissu cardiaque présentant une myocardite atriale chez huit patients [178]. RB. Schnabel et al ont établi une relation temporelle entre l'inflammation et l'incidence de la fibrillation atriale à long terme [244].

Malgré l'évidence liant la fibrillation atriale et l'inflammation, il est encore débattu si l'inflammation est un évènement initiateur de la fibrillation atriale ou une conséquence de la fibrillation atriale. Les observations en faveur d'un rôle initiateur repose sur l'incidence accrue de fibrillation atriale dans les états inflammatoires (tels que la chirurgie cardiaque) et sur les niveaux de base de protéine C réactive comme prédicateur de l'occurrence de la fibrillation atriale [242]. Au contraire, l'observation de niveaux décroissants de protéine C réactive suivant la restauration du rythme sinusal font plutôt pencher l'inflammation vers une conséquence de la fibrillation atriale [245]. La protéine C-réactive agit comme une osponine et peut participer à l'élimination des myocytes apoptotiques [246]. Ces deux mécanismes semblent toutefois être interdépendants : une inflammation pré-existante est impliquée dans l'initiation de la fibrillation atriale et l'arythmie génère en conséquence une réponse inflammatoire qui augmente le remodelage, promouvant ainsi la persistance de la fibrillation atriale. Il a également été observé des infiltrats inflammatoires, une nécrose des myocytes et une fibrose dans les tissus atriaux de biopsies atriales de patients avec fibrillation atriale isolée réfractaire aux thérapies anti-arythmiques [178, 242]. L'inflammation semble également altérer les propriétés de conduction atriale [247]. Dans un modèle animal, l'inflammation atriale est associée à une augmentation de l'inhomogénéité de la conduction atriale et une augmentation de l'incidence et de la durée de la fibrillation atriale [248]. L'inflammation est également associée avec une distribution altérée des connexines 40 et 43 [249].

Les mécanismes qui sous-tendent la fibrillation atriale post-opératoire semblent multifactoriels et sont influencés par les facteurs pre-opératoire, intra-opératoire et post-opératoire incluant des bases génétiques. Il a récemment été mis en évidence une anomalie de la régulation de la balance oxydant / anti-oxydant, des facteurs inflammatoires et une altération discordante des métabolites énergétiques dans la pathogénèse de la fibrillation

atriale [246]. Le remodelage électrique semble être lié à la génération d'espèces oxydantes réactives et de facteurs inflammatoires notamment au cours de la phase de reperfusion ischémique. La NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydase est une source primaire de super-oxyde dans le myocarde atrial humain et est lié à la fibrillation atriale paroxystique et chronique. Ces substances oxydantes peuvent ainsi déclencher une peroxydation lipidique, une rupture de la membrane cellulaire, une diminution de la fonction mitochondriale, une surcharge en calcium et de l'apoptose. Tous ces effets sont réversibles par des donneurs exogènes d'oxyde nitrique (sodium nitroprusside).

Au contraire, il a été récemment montré que les statines ont à la fois des propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire et que leur utilisation peut réduire l'incidence de fibrillation atriale post-opératoire (57% de fibrillation atriale dans le groupe contrôle vs 35% dans le groupe atorvastatine). De même, les patients traités avec des stéroïdes (aux propriétés anti-inflammatoires) ont une plus faible incidence de fibrillation atriale post-opératoire (21% de fibrillation atriale dans le groupe stéroïde et 51% dans le groupe placebo) [246].

Il a été montré que le TNF α pouvait induire une activité déclenchée dans les cardiomyocytes de veines pulmonaires et ainsi produire de la fibrillation atriale au cours d'un état septique [222].

G. Aspects génétiques de la fibrillation atriale

1. Aspect génétique

Ces dernières années, l'aspect génétique a été intégré comme un facteur de risque de fibrillation atriale. Selon les études, 30 à 40% des fibrillations atriales isolées sont des fibrillations atriales familiales [250-251].

L'investigation de familles avec des syndromes arythmiques a permis d'identifier des mutations¹ et des polymorphismes² au niveau de gènes impliqués dans la variabilité électrophysiologique cardiaque, dans la réponse aux stress exogènes et dans le contrôle de l'excitabilité cardiaque [252]. Les polymorphismes ont des effets fonctionnels significatifs

¹ Une mutation est une modification dans la séquence d'ADN

² Un polymorphisme génétique correspond donc à une variation dans la séquence d'ADN au sein d'une population. Les polymorphismes sont généralement non pathogènes

sur les produits de gènes. Plusieurs études montrent l'intérêt des polymorphismes dans la survenue de la fibrillation atriale dans la population générale. Il est supposé que les polymorphismes dans les pathologies à cause génétique sont distribués différemment parmi les individus sains et malades [253].

D'après l'étude de PT. Ellinor et al en 2005, les membres d'une famille ont un risque relatif de fibrillation atriale (comparé à la population générale) de 8.1 pour les fils (intervalle de confiance 95% : 2.0-32), de 9.5 pour les filles (1.3-67), de 70 pour les frères (47-102), de 34 pour les soeurs (14-80), de 4.0 pour les mères (2.5-6.5) et de 2.0 pour les pères (1.2-3.6). Les proches du probant avec fibrillation atriale isolée ont un risque substantiel élevé de développer cette arythmie, ce qui suggère une contribution génétique mendélienne de l'étiologie de cette pathologie [251]. Une étude sur le caractère héréditaire de la fibrillation atriale dans une population islandaise a montré que les apparentés au premier degré de cas de fibrillation atriale diagnostiquée avant l'âge de 60 ans sont près de cinq fois plus nombreux à développer de la fibrillation atriale par rapport à la population générale [254].

Les interactions gènes-environnement semblent également jouer un rôle clé. Des études cliniques suggèrent que les profils génétiques héréditaires peuvent déterminer la réponse thérapeutique à la fibrillation atriale. La détermination du caractère génétique de la fibrillation atriale pourra aider à apprécier la pathophysiologie sous-jacente et fournir de nouvelles approches pour le diagnostic, la prévention et le traitement de cette pathologie [255].

La connaissance du développement embryonnaire normal du myocarde auriculaire, en particulier des manchons musculaires du myocarde des affluents veineux systémique et des veines pulmonaires à leurs jonctions avec les chambres atriales, peuvent contribuer à la compréhension des origines de la stimulation ectopique observée dans la fibrillation atriale. À cet égard, il est maintenant bien établi que les manchons myocardiques des affluents veineux systémique ont une origine et un programme de l'expression des gènes distincts par rapport au myocarde veineux pulmonaire [256] (rôle du gène *pitx2*).

2. Les différents locus

Un locus correspond à l'emplacement physique invariable d'un gène sur un chromosome, Il ne faut pas confondre allèle et locus. Un allèle est une « version » d'un gène et peut se

retrouver à différents endroits sur un même chromosome. Un locus correspond à un fragment séquentiel invariant : par exemple (figure 24) on peut décider de s'intéresser au locus 6p21.3. Le 6 indique la sixième paire de chromosomes ; le p indique qu'il se situe sur le bras court du chromosome (au contraire q, correspond au bras long et le 21.3 révèle la position exacte du locus par rapport à l'extrémité du centromère.

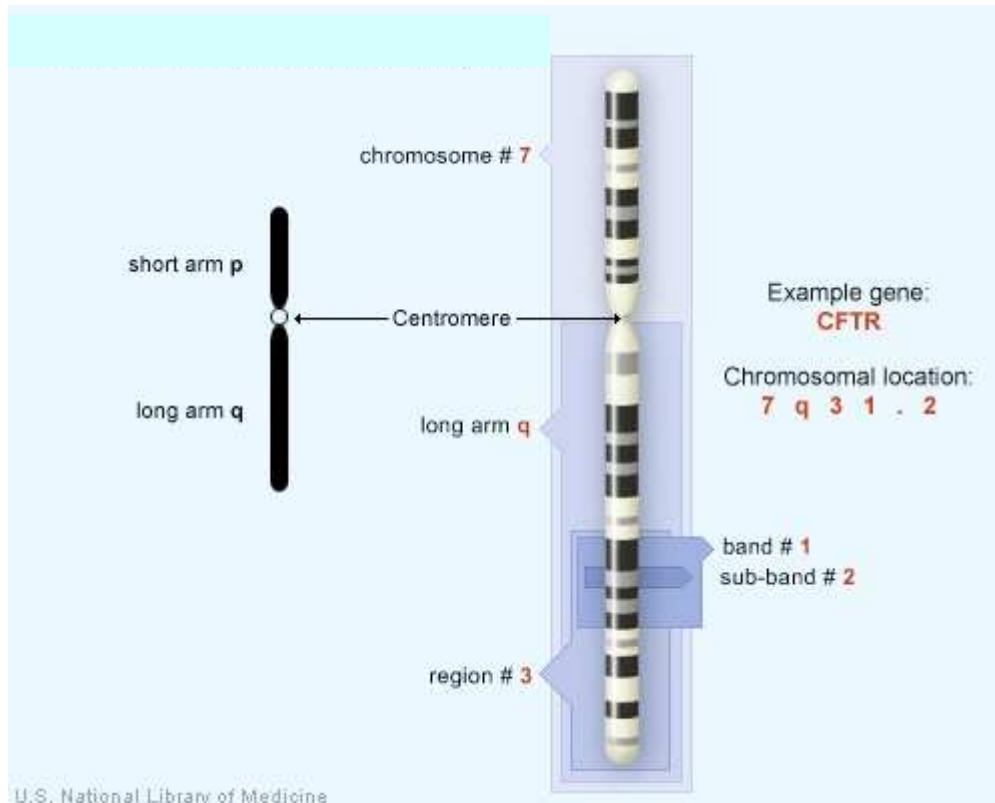


Figure 24: Localisation chromosomique d'un gène

L'identification de locus permet de cibler des zones d'intérêt sur un chromosome et l'étude sur les gènes environnants à cette région.

En 1997, Brugada et al ont identifié le premier locus de la fibrillation atriale familiale sur le chromosome 10 (10q22-24) au sein de trois familles espagnoles différentes [250]. Depuis, plusieurs loci et gènes ont été identifiés comme étant potentiellement impliqués dans la fibrillation atriale. Ainsi, des locus sur les chromosomes 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 16, 17, 21 ont notamment été identifiés. Cependant, les locus actuellement identifiés représentent moins de 10% de la part héréditaire de cette arythmie, les 90% restant restent à être identifiés [250].

Récemment, plusieurs loci ont été mis en évidence chez des personnes atteintes de fibrillation atriale monogénique par des analyses de liaison. Certains de ces loci codent pour des sous-unités de canaux potassiques (KCNQ1, KCNE2, KCNJ2, et KCNH2) et les autres ne sont pas encore identifiés. Toutes les mutations connues correspondent à des mutations gain de

fonction des courants potassium repolarisants résultant en un raccourcissement de la durée du potentiel d'action, ce qui facilite les multiples circuits de réentrée [257]. De nombreux autres variants ont aussi été identifiés au niveau du chromosome 4 [258], du locus 16q22 [259], du locus 5p15 [260], du locus 10p11-q21 [261] et du locus 6q14-16 [262]. Des variants à la fois dans les gènes codant pour des canaux ioniques et pour des canaux non-ioniques ont été identifiés comme des déterminants potentiels de la fibrillation atriale [253, 255, 263].

Une récente étude d'analyse du génome entier a identifié un bloc d'haplotype³ sur le chromosome 4q25 associé à la fibrillation atriale. Deux polymorphismes non codants (rs2200733 and rs10033464) sont fortement associés avec la fibrillation atriale dans les cohortes de descendants européens (Framingham, Vanderbilt, AFNet). Ces résultats confirment les relations significatives entre la fibrillation atriale et les variants intergeniques sur le chromosome 4 [264]. L'association du polymorphisme rs2200733 avec la fibrillation atriale et le flutter a également été confirmée dans une population italienne [265].

Différents locus ont ainsi été mis en évidence. Cependant, peu de gènes communs sont retrouvés entre les différentes familles étudiées. En effet, près de 40 gènes ont déjà été décrits comme étant potentiellement impliqués dans la fibrillation atriale. Dans la majorité des études, seule une famille est identifiée comme porteuse de la mutation ou du polymorphisme. Plusieurs gènes peuvent jouer des rôles critiques dans l'initiation de la perpétuation de la fibrillation atriale et la pathophysiologie du remodelage atrial.

3. Principales mutations identifiées

Le développement des nouvelles technologies, dont le criblage à haut débit des polymorphismes (SNP) et du génome entier permettent d'envisager de nouveaux candidats en utilisant des puces capable de génotyper jusqu'à 500 000 SNPs à la fois [251]. Les études d'association cas-contrôle pour établir des corrélations phénotype-génotype restent la voie d'étude la plus courante pour évaluer les bases de facteurs de prédisposition génétique.

³ L'haplotype correspond à la combinaison des allèles (des gènes différents) qui se trouvent en étroite collaboration sur le même chromosome et qui tendent à être transmis ensemble

En plus des fibrillations atriales familiales, les fibrillations atriales surviennent souvent en association avec les maladies acquises telles que l'hypertension, les maladies valvulaires, l'insuffisance cardiaque. Par des études génétiques d'association, plusieurs variants génétiques ou polymorphismes liés au mécanisme de fibrillation atriale ont été identifiés incluant les gènes codant pour les sous-unités des canaux potassium ou sodium, le gène de la sarcolipine, le gène du système rénine-angiotensine, le gène de la connexine 40, le gène de la nitric oxyde synthase, endothéliale (eNOS), et le gène de l'interleukine 10 (IL-10). Ces observations suggèrent que les gènes en lien avec les courants ioniques, la protéine de fixation du Calcium, la fibrose, la conduction et l'inflammation jouent des rôles important dans la pathogénèse de la fibrillation atriale commune [257].

Une méta-analyse réalisée à partir d'étude de génome entier sur l'intervalle PR (délai entre la dépolarisation des oreillettes et celle des ventricules) a été réalisée à partir de sept études européennes de population au sein du consortium CHARGE (AGES, ARIC, CHS, FHS, KORA, Rotterdam study, SardiNIA) (N=28517). Neuf loci ont été identifiés comme étant associés avec l'intervalle PR. Ils ont ainsi identifiés des gènes candidats, *cav1-cav2*, *nkx2-5*, *sox5*, *scn5a*, *scn10a* (N=5741, p<0,0056) comme étant associés à la fibrillation atriale. Ils ont ainsi suggéré des variations communes sur des gènes des canaux ioniques et du développement pouvant être impliquées dans la susceptibilité à la fibrillation atriale [266].

La plupart des études définissent la transmission de la fibrillation atriale comme étant autosomique dominante.

En revanche, l'étude d'C. Oberti et al a montré en 2004 que la fibrillation atriale peut aussi être héritée d'une manière autosomale récessive et définit un nouveau locus génétique pour la fibrillation atriale sur le chromosome 5p13 (*arAF1*). Un lien génétique entre la fibrillation atriale et l'allongement de l'onde P a été identifiée démontrant un intérêt du gène *arAF1* dans la fibrillation atriale [267].

a. Mutations sur des gènes codant pour les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont les acteurs privilégiés de l'excitabilité cellulaire.

Au cours de la dernière décennie, l'identification de modifications génétiques affectant les courants ioniques chez de rares cas de fibrillation atriale familiale, a été la clé de la compréhension de la pathophysiologie des formes héréditaires des arythmies [258].

Dans une cohorte de patients ayant une histoire de fibrillation atriale familiale plusieurs polymorphismes communs ont été identifiés dans les gènes *kcnj2* et *kcne1-5*, mais aucune mutation n'a cependant été identifiée ; ce qui montre que les mutations dans ces gènes causent rarement une fibrillation atriale typique dans une population clinique référente [268]

Pour rappel, le potentiel d'action au niveau des oreillettes et des ventricules est gouverné par plusieurs courants ioniques (fig 25). Le courant potassique voltage-dépendant, I_{Kur} , a un rôle prédominant dans la repolarisation de l'oreillette. Ce courant est notamment basé sur l'expression des canaux $K(v)1.5$. Le potentiel de repos des myocytes atriaux est maintenu par différents courants entrants rectifiants dont une faible densité de courant I_{k1} , la présence constitutivement active de I_{KACH} , et une régulation de ce courant I_{KACH} [269]. Trois types de courants potassiques sont responsables de la repolarisation :

- le courant I_{To} qui génère un courant sortant précoce et transitoire entraîne une repolarisation précoce incomplète
- le courant I_{Kr} qui est un courant entrant rectificateur qui laisse entrer le potassium mais ne le laisse pas sortir. Il laisse seulement sortir les potentiels membranaires plus bas.
- le courant I_{Ks} qui est un courant rectificateur retardé à activation lente.

Ensemble, les courants I_{Ks} et I_{Kr} forment un petit courant sortant net qui augmente avec le temps et entraîne la repolarisation.

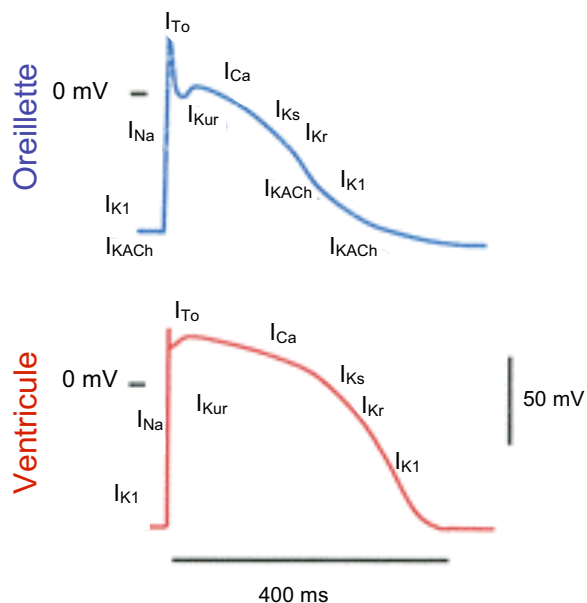


Figure 25 : potentiel d'action au niveau de l'oreillette et du ventricule

➤ Canaux potassiques

Des mutations apportant un gain de fonction des canaux potassiques peuvent causer des fibrillations atriales familiales en raccourcissant la durée du potentiel d'action atrial. Ces mutations peuvent être sous-jacentes au mécanisme de fibrillation atriale.

☞ **Modification du courant I_{Ks}**

Le courant potassium rectifiant lent retardé I_{Ks} est un déterminant majeur du potentiel d'action de la repolarisation cardiaque. Les canaux du courant I_{Ks} sont formés par le co-assemblage des sous-unités alpha de KCNQ1 avec les sous-unités ancillaires de KCNE. Les différentes mutations identifiées engendrent un gain de fonction du courant potassique I_{Ks} .

- KCNQ1

Dans le registre de fibrillation atriale Vanderbilt, regroupant 231 participants, une mutation dans le gène *kcnq1* et une mutation dans le gène *nppa*, codant pour le peptide natriurétique atrial, ont été retrouvés dans des fibrillations atriales précoces isolées dans différentes familles. Par des expérimentations de co-expression sur cellules et simulations par ordinateur, ils ont trouvé des similitudes fonctionnelles frappantes dues aux mutations dans ces gènes menant à un gain de fonction du courant I_{Ks} , à des raccourcissements du potentiel d'action atrial. En effet, les mutations entraînent une augmentation considérable du courant repolarisant potassique I_{Ks} alors que les courants dépolarisants ne changent pas, ce qui peut ainsi aboutir à un raccourcissement du potentiel d'action. Par conséquent, elles conduisent à des courants calciques altérés, c'est-à-dire à un mécanisme commun entre les divers syndromes de fibrillations atriales familiales [270].

L'étude de S. Das et al portant sur quatorze membres d'une famille atteints de fibrillation atriale a permis d'identifier une mutation dans le domaine S3 hautement conservé de la protéine KCNQ1, région du canal non impliqué jusque là dans la pathogénèse de la fibrillation atriale. Ce mutant S209P active plus rapidement et désactive plus lentement le canal et a un shift hyperpolarisant dans la courbe d'activation du voltage. Une fraction de ces canaux mutés est constitutivement ouverte à tous les voltages, résultant en une augmentation nette du courant I_{Ks} [271].

La fibrillation atriale et le syndrome du QT long peuvent être liés à une dysfonction de la sous-unité Kv7.1 du canal potassique voltage-dépendant codé par le gène *kcnq1*. La mutation

Q247R sur ce gène forme le substrat moléculaire pouvant conduire à diverses arythmies. Le mécanisme peut être lié à une distribution hétérogène des sous-unités accessoires de Kv7.1 dans le cœur, résultant en un gain de fonction de Kv7.1 dans l'oreillette (pour la fibrillation atriale) et une perte de fonction de Kv7.1 dans les ventricules (allongement du QT) [272].

L'environnement peut avoir un lien dans l'expression des mutations dans la pathogénèse de la fibrillation atriale. La seule mutation R14C dans le gène *kcnq1* serait insuffisante pour causer une fibrillation atriale. Il est ainsi suggéré qu'un modèle avec un second déclencheur est requis pour que la fibrillation atriale se manifeste, par exemple un facteur de l'environnement comme l'hypertension promouvant le stretch atrial va démasquer un défaut héréditaire dans les cinétiques de canal ionique (le « 1^{er} hit »). Un tel modèle est aussi valable pour l'augmentation du développement de la fibrillation atriale de manière âge-dépendant [273].

- Sous-unités régulatrices de KCNQ1

- Sous-unité KCNE1

La protéine Mink, une sous-unité β du courant I_{Ks} module l'électrophysiologie cellulaire cardiaque.

Le polymorphisme G38S du gène *kcne1* semble être associé avec une incidence de fibrillation atriale isolée dans la population étudiée. Le génotype GG semble être significativement relaté à un risque accru de fibrillation atriale [274-278].

- Sous-unité KCNE2

Y. Yang et al ont identifié la mutation R27C sur le gène *kcne2*. Cette mutation est associée à un gain de fonction modéré du courant potassique I_{Ks} . Cependant, les patients porteurs de cette mutation ont un phénotype moins sévère que ceux porteurs d'une mutation sur le gène *kcnq1* [279].

- Sous-unité KCNE3

Une mutation faux-sens V17M sur le gène *kcne3* a été identifiée chez un proband avec une fibrillation atriale isolée précoce. Cette mutation peut mener à un gain de fonction de plusieurs courants cardiaques et notamment induite une fibrillation atriale [280].

- Sous-unité KCNE4

Des expérimentations ont montré que le polymorphisme E145D sur le gène *kcne4* exerce un effet gain de fonction sur le canal KCNQ1 [281].

- Sous-unité KCNE5

Le polymorphisme 97T sur le gène *kcne5* codant pour la sous-unité β , MiRP4, du canal KCNQ1, est significativement plus présent dans 96 contrôles vs 158 patients avec fibrillation atriale. Or, le gène *kcne5* est localisé sur le chromosome X. Ce polymorphisme pourrait aider à expliquer la différence liée au genre dans le risque de fibrillation atriale [282].

➔ **Courant I_{Kur}**

Un contexte génétique peut être impliqué dans la survenue de fibrillation atriale post-opératoire. Ainsi, les polymorphismes R87Q et P307S dans le gène *kcna5*, codant pour la protéine Kv1.5, du courant I_{Kur} peuvent influencer le développement de la fibrillation atriale postopératoire [283]. Trois autres SNPs dans le gène *kcna5* ont également été identifiés par B. Drolet et al [284].

Un premier rapport d'une canalopathie induisant une perte de fonction de Kv1.5 établit une mutation sur le gène *kcna5* comme un nouveau facteur de risque pour une déficience de la repolarisation pouvant mener à la fibrillation atriale. La mutation hétérozygote E375X sur le gène *kcna5* est présente dans un cas familial de fibrillation atriale, elle introduit un codon stop précoce perturbant la protéine du canal Kv1.5 [285].

Deux autres mutations sur le gène *kcna5* ont été identifiées au sein de quatre des 120 familles analysées par Y. Yang et al ; L'effet des mutations T527M et A576V est une perte de fonction du canal [286].

➔ **Courant I_{KACH}**

Les polymorphismes C171T and G810T dans le gène *knj5*, codant pour la sous-unité Kir3.4 du canal du courant I_{KACH} peuvent être des facteurs de risque pour les fibrillations atriales paroxystiques isolées dans la population chinoise [287].

➔ **Courant potassium calcium dépendant**

Un variant dans la région intronique du gène *kcnj3* (rs13376333) est impliqué dans la repolarisation atriale dans la fibrillation atriale isolée [288]

➤ **Protéine G**

Le polymorphisme correspondant à la substitution C825T dans le gène codant la sous-unité de la protéine G (3) (*gnb3*) est associé avec des courants potassium entrant dans l'oreillette humaine au regard du génotype TT. Le génotype TT du gène *gnb3* est ainsi associé à un risque réduit de l'occurrence de la fibrillation atriale [289].

➤ **Canaux sodiques**

Plusieurs mutations dans le gène *scn5A* sont associées à la fibrillation atriale mais également à d'autres pathologies associées.

➤ **SCN5A [290]**

Le gène *scn5a* code pour un canal sodique voltage dépendant.

Des mutations dans ce gène ont été identifiées dans les pathologies du syndrome de Brugada et du syndrome du QT long.

Les patients avec fibrillation atriale spontanée ont des contextes cliniques plus sévères dans les cas de syndrome de Brugada. Les mutations dans le gène *scn5a*, identifié dans le syndrome de Brugada, sont associées à une anomalie électrique, mais pas à la sévérité de la maladie [291].

Plusieurs mutations dans le gène *scn5a* ont été identifiées au sein de famille atteinte de fibrillation atriale, et non atteinte du syndrome de Brugada ou du syndrome du QT long. Ces mutations (K1493R et N1986K) entraînent une hyperexcitabilité cardiaque [292-293].

Il a également été montré que les défauts dans le gène *scn5a* peuvent être associés avec une susceptibilité de la survenue précoce de la cardiomyopathie dilatée et la fibrillation atriale [294].

L'allèle R558 du gène *scn5a*, présent chez un tiers de la population, constitue un facteur de risque de fibrillation atriale isolée et peut augmenter la susceptibilité pro-arythmique induite par les bloqueurs du canal sodique [295].

La mutation Y1795C a été mise en évidence chez tous les membres d'une famille porteurs d'un syndrome de QT long de type 3 (LQT3) et de fibrillation atriale. Les mutations gain de fonction dans le gène *scn5a* sont en général associées à un LQT3 [296]. Or, la mutation faux-sens M1875T dans le gène *scn5a* identifiée dans une famille japonaise avec une fibrillation atriale à transmission autosomique dominante est une mutation gain de fonction qui n'est pas associé à un LQT3 [297] et semble donc liée seulement à la fibrillation atriale.

➤ *SCN1 à SCN4*

L'équipe de H. Watanabe et al a testé les quatre gènes *scn1* à *scn4*, codant pour la sous-unité β du canal sodique du courant I_{Na} , dans la susceptibilité à la fibrillation atriale. Ils ont ainsi identifié quatre polymorphismes chez des patients avec fibrillation atriale, dont deux dans le gène *scn1b* (R85H, D153N) et deux dans le gène *scn2b* (R28Q, R28W) menant à des pertes de fonction des sous-unités β du canal sodique. Ceci leur a donc permis de suggérer qu'une diminution du courant sodique peut induire une susceptibilité à la fibrillation atriale [298].

➤ Voie du calcium

L. Hove-Madsen et al ont notamment montré une augmentation du relargage spontané de calcium due à une régulation positive de l'activité des canaux du réticulum sarcoplasmique, ce qui peut contribuer au développement de la fibrillation atriale [299].

Peu d'études ont montré l'implication de mutations de la voie calcique dans la fibrillation atriale. Il a seulement été montré que quelques mutations dans la région codante de la sarcolipine, petite protéine de la membrane du réticulum sarcoplasmique exerçant un effet inhibiteur sur les pompes à calcium des muscles striés squelettiques et cardiaque, en association avec la protéine phospholambane, ne sont pas fréquemment impliquées dans la fibrillation atriale [300].

b. Métalloprotéases (MMP)

Les métalloprotéases peuvent jouer un rôle dans la pathogénèse du remodelage atrial arythmogène, et peuvent contribuer au développement et à la persistance de la fibrillation atriale. Les polymorphismes fonctionnels du gène de la MMP9 menant à la production de protéines MMP9 altérées peuvent moduler la susceptibilité à la fibrillation atriale. Le polymorphisme -1562C>T du gène de la MMP9 est ainsi associé de manière significative à un

risque de fibrillation atriale chez les patients chinois Han ayant une pathologie cardiaque hypertensive. L'allèle -1562T associé à une expression accrue de MMP9 peut être un facteur de risque génétique pour le développement de la fibrillation atriale dans cette cohorte [301].

La MMP2 et son inhibiteur TIMP2 jouent un rôle important dans la pathogénèse du remodelage atrial arythmogénique et peuvent contribuer au développement de la persistance de la fibrillation atriale. Le polymorphisme 1306C-->T du gène de la MMP2 est significativement associé avec la prévalence de la fibrillation atriale. L'allèle T du polymorphisme représenterait un facteur de risque de fibrillation atriale [302]. Le polymorphisme -418G>C sur le gène du TIMP2 est significativement associé à une susceptibilité accrue à la fibrillation atriale dans une population chinoise hypertensive [303].

d. Système nerveux

La canalopathie sur le courant potassium ATP dépendant, $I_{K(ATP)}$, causée par la mutation faux-sens (Thr1547Ile) dans le gène *abcc9* confère une prédisposition à la fibrillation atriale adrénérique originaire de la veine de Marshall [304].

Les données expérimentales démontrent que le monoxyde d'azote, NO, est impliqué dans l'activité vagale cardiaque et dans l'inhibition de l'activité sympathique. Une différence significative dans les fréquences alléliques des patients et des contrôles a été observée pour le polymorphisme -786T>C dans le gène *enos*, codant pour l'oxyde nitrique synthase endothéliale, mais pas pour le polymorphisme 894G>T du même gène, suggérant ainsi un rôle du gène *enos* comme facteur de prédisposition à la fibrillation atriale non valvulaire [275, 305].

La présence simultanée des allèles S38G du gène *kcnq1* et T-786C du gène *enos* ont été identifiés dans la prédisposition de la fibrillation atriale non-valvulaire dans la population Han de la province de Zhejiang [278].

S. Nikulina et al ont suggéré le variant hétérozygote Ser49Gly du gène de l'adrenorecepteur beta en tant que facteur de prédiction génétique après l'étude de 103 probands avec fibrillation atriale et 301 apparentés [306].

e. Système aldostérone – Système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine peut jouer un rôle dans la pathogénèse de la fibrillation atriale [269-270]. Il est connu que les bloqueurs du système rénine-angiotensine réduisent le risque de fibrillation atriale. Une implication du système rénine angiotensine dans la fibrillation atriale a été suggérée suite à l'observation de l'augmentation de l'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le tissu atrial de patients avec fibrillation atriale [235].

L'angiotensine II peut induire la prolifération des fibroblastes via l'activation des MAP kinases, telle que Erk1/Erk2 et ainsi l'accumulation de protéine de la matrice extracellulaire [50]. Il a ainsi été suggéré que l'activation de la voie des Erk dans l'interstitium atrial pouvait être un mécanisme moléculaire expliquant les changements fibrotiques du tissu atrial chez les patients avec fibrillation atriale.

L'étude de DN. Tziakas suggère que la présence de l'allèle D sur le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*ace*) chez les patients hypertendus souffrant de fibrillation atriale est associée à une atténuation de la dégradation du collagène de type-I, et que le traitement par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) augmente la dégradation du collagène de type I [307].

Les gènes de l'IEC jouent un rôle dans la prédisposition à la fois de la fibrillation atriale isolée et de la fibrillation atriale secondaire non valvulaire. La prédisposition du génotype DD sur le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*ace*) en tant que facteur de fibrillation atriale a été montré par F. Gensini et al chez 148 patients avec fibrillation atriale persistante vs 210 contrôles [308]. L'allèle D du gène *ace* est associé à une prédisposition à la fibrillation atriale non valvulaire [309].

Le polymorphisme T-344C du gène de l'aldostérone synthase prédispose à la fibrillation atriale chez les patients insuffisants cardiaques [310]. Le polymorphisme rs3802228 localisé dans la région 3'UTR du gène *cyp11b2* codant pour l'aldostérone synthase peut être associé à un remodelage structural atrial [311].

QS. Wang et al ont observé une association significative entre le polymorphisme M235T, localisé dans l'exon 2 du gène de l'angiotensinogène (AGT), et la fibrillation atriale dans une population chinoise. Ils ont notamment montré que le génotype AA de ce polymorphisme augmentait le risque de fibrillation atriale de 70% (p=0,044) dans un modèle récessif (AA vs AG + GG). La significativité de cette association atteint même 90% en tenant compte des

comorbidités de la fibrillation atriale telles que l'âge, la masse corporelle, l'hypertension, le diabète, la taille de l'oreillette gauche. La présence de polymorphisme au sein du gène de l'angiotensinogène peut donc conférer une prédisposition à la fibrillation atriale au sein de cette population chinoise [312].

Par ailleurs, l'allèle A985 du gène de l'endothéline 2, qui est considéré comme étant protecteur contre les maladies cardiovasculaires, peut être un facteur de risque de fibrillation atriale chez les patients porteurs d'une cardiomyopathie hypertrophique [313].

f. Protéine de stress, Hsp

Une mutation dans le gène *hsp70*, codant pour la protéine de stress HSP70, est associée à une incidence plus élevée de fibrillation atriale post-opératoire. Ces données peuvent suggérer que les patients présentant la substitution Met493Thr dans le gène *hsp70* auront moins de protection myocardique endogène contre la fibrillation atriale dans des situations de stress [314].

g. Protéines de l'inflammation

Le polymorphisme 592A-->C du gène de l'interleukine 10 est significativement associé avec la prévalence de la fibrillation atriale. L'allèle C du polymorphisme de l'interleukine 10 serait un facteur protecteur contre la fibrillation atriale [302].

AA. Motsinger et al ont étudié les polymorphismes de trois gènes candidats (*interleukine-6*, *ace*, *apoE*), tous précédemment impliquées dans les risques de fibrillation atriale post-opératoire, et une variété de facteurs environnementaux. Ils ont mis en évidence l'effet d'un locus de l'interleukine 6 qui est capable de prédire le statut de la maladie avec une précision de 58,8%. Ils ont aussi trouvé une interaction entre l'histoire de la fibrillation atriale et la longueur de l'hospitalisation, prédisant ainsi le statut de la maladie avec une précision de 68% [315].

h. Connexines (Cx)

La connexine 40 (Cx40) est exprimée sélectivement dans les myocytes atriaux et médie l'activation électrique de l'oreillette. Deux polymorphismes de la région promotrice du gène de la connexine 40 sont significativement associés avec la fibrillation atriale. L'haplotype (-44A +71G) du gène de la Cx40 est associé à un risque plus élevé de fibrillation atriale. Cet haplotype a aussi une activité promotrice plus faible dans les myocytes atriaux [316-317].

Le polymorphisme -44G-->A sur le promoteur du gène de la Cx40 est associé avec des arythmies spécifiques du tissu atrial, est localisé entre les sites de liaison des facteurs de transcription TBE-NKE-Sp et GATA qui sont des sites importants pour la régulation du gène de la Cx40 de la souris. La présence de l'allèle A à la position -44 dans le construit reporter-promoteur réduit significativement l'activité du promoteur. Ils ont aussi montré que le polymorphisme -44 G-->A affecte négativement la régulation du promoteur par les facteurs de transcription Sp1 et GATA4 [318].

Quatre mutations faux-sens hétérozygotes ont été identifiées chez quatre des quinze patients étudiés par MH. Gollob et al. Chez trois patients, les mutations ont été trouvées seulement dans le tissu cardiaque et non dans les lymphocytes, indiquant une origine somatique⁴ du défaut génétique. Pour le quatrième patient, le variant a été détecté dans le tissu cardiaque et les lymphocytes d'où une origine germinale de cette mutation. L'analyse de l'expression des protéines mutantes révèle un transport intracellulaire affaibli ou un couplage électrique intercellulaire réduit [319-320].

i. Morphogénèse atriale

Les analyses de génétique moléculaire des désordres héréditaires humains qui affectent la structure et la fonction atriale cardiaque ont récemment identifié plusieurs gènes qui régulent la morphogénèse atriale. Les mutations dans les gènes pour les protéines TBX5 (facteur de transcription T-box 5), NKX2.5 (protéine homeobox), et α PRKAR1 (R1 α regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase A) résultent tous en des anomalies de la croissance et du développement atrial humain. Les mutations dans au moins un gène résulte en une fibrillation atriale familiale [321].

L'analyse des gènes *pitx2* et *nkx2-5* dans la fibrillation atriale idiopathique a révélé la présence de plusieurs polymorphismes, cependant, aucune mutation n'a pu être identifiée dans la région codante de ces gènes [322].

La mutation p.G125R du gène *tbx5* est une mutation gain de fonction. Il est spéculé que ce mécanisme gain de fonction est sous-jacent à la fibrillation atriale paroxystique et suggère ainsi un rôle possible de TBX5 dans le développement de la fibrillation atriale paroxystique

⁴ Mutations d'origine somatique : Les mutations somatiques touchent des cellules particulières. Elles peuvent apparaître tout au long de la vie sur l'ADN de n'importe quelle cellule, alors transmises à la lignée des cellules filles. Contrairement aux mutations de la lignée germinale, mutations, elles ne peuvent pas être transmises à la descendance

soit au travers de la stimulation directe de gènes cibles ou indirectement via la stimulation de TBX5 par TBX3 [323].

Pour résumer ces données, le tableau 2 récapitule les principaux gènes mis en évidence dans différents cas de fibrillation atriale familiale ainsi leur retentissement au niveau de l'électrophysiologie de la cellule.

<i>Gène</i>	<i>Protéine</i>	<i>Type de mutation</i>	<i>Effet électrophysiologique de mutation</i>	<i>Référence</i>
<i>kcnq1</i>	Canal du courant potassique I_{Ks}	S209P, Q247R, R14C	↗ I_{Ks}	[270-273]
<i>kcne1</i>	Sous-unité Mink du courant potassique I_{Ks}	G38S	↗ I_{Ks}	[274-278]
<i>kcne2</i>	Sous-unité Mirp1 du courant potassique I_{Ks}	R27C	↗ I_{Ks}	[279]
<i>kcne3</i>	Sous-unité Mirp2 du courant potassique I_{Ks}	V17M	↗ I_{Ks}	[280]
<i>kcne4</i>	Sous-unité Mirp3 du courant potassique I_{Ks}	E145D	↗ I_{Ks}	[281]
<i>kcne5</i>	Sous-unité Mirp4 du courant potassique I_{Ks}	97T	↗ I_{Ks}	[282]
<i>kca5</i>	Canal $Kv1.5$ du courant I_{Kur}	R87Q, P307S, T527M, A576V, ...	↘ I_{Kur}	[283-286]
<i>kcnj5</i>	Sous-unité Kir3.4 du courant I_{KAch}	C171T, G810T	↗ ou ↘ I_{KAch}	[287]
<i>kccn3</i>	Canal du courant K^+ calcium-dépendant	Rs13376333	Hyperpolarisation atriale	[288]
<i>gnb3</i>	Protéine G 3	C825T	↗ courants potassium entrants	[289]
<i>scn5a</i>	Canal Na^+ voltage dépendant	K1493R, N1986K, M1875T	Hyperexcitabilité cardiaque	[292 293, 297]
<i>scn1b</i>	Sous-unité β du canal du courant I_{Na}	R85H, D153N	↘ I_{Na}	[298]
<i>scn2b</i>	Sous-unité β du canal du courant I_{Na}	R28Q, R28W	↘ I_{Na}	[298]
<i>mmp9</i>	Métalloprotéase 9	-1562C>T	↗ remodelage atrial	[301]
<i>mmp2</i>	Métalloprotéase 2	1306 C>T	↗ remodelage atrial	[302]
<i>timp2</i>	Inhibiteur de MMP2	418 G>C	↗ remodelage atrial	[303]
<i>abcc9</i>	Sous-unité SUR du canal de I_{KATP}	T1547I	↘ I_{KATP}	[304]
<i>hsp10</i>	Protéine de choc thermique 10	M493T	↘ protection myocardique	[314]
<i>gja5</i>	Connexine 40	P88S, M163V, G38D, A96S	↘ assemblage des gap junctions et ↘ du couplage électrique	[319-320]
<i>tbx5</i>	Facteur de transcription	G125R	↗ transcription	[323]

Tableau 2 : Principales mutations mises en évidence dans la fibrillation atriale [251, 258, 325]

H. Perpétuation de la fibrillation atriale

Les conséquences de la fibrillation atriale sont pour la plupart connues avec une diminution du remplissage ventriculaire, une fibrose atriale et une perte de la masse musculaire atriale. Elles contribuent ainsi à l'inhomogénéité de la conduction, à la récurrence et à la perpétuation de la fibrillation atriale.

Les fibrillations atriales paroxystiques, persistantes et permanentes, par le biais d'anomalies calciques, induisent différents remodelages qui interagissent entre eux. La plupart sont initiés au début de l'accès de l'arythmie. Des anomalies calciques engendrent en quelques minutes un remodelage électrique puis en quelques jours, un remodelage tissulaire, soit directement, soit en induisant une modification du phénotype du myocyte [326]. Ces remodelages sont par ailleurs modulés par les processus neuro-hormonaux tant locaux que généraux qui accompagnent la fibrillation atriale.

La maintenance de la fibrillation atriale est associée à un remodelage électrique stimulé par l'arythmie elle-même [159] et à un remodelage structural [197] qui a été démontré par P. Gould et al par une augmentation de la fibrose au sein d'une cohorte de patients avec fibrillation atriale [127].

1. Remodelage électrique

La survenue d'un épisode de fibrillation atriale, même paroxystique, favorise la récurrence d'autres épisodes de fibrillation atriale. Ces derniers épisodes sont souvent plus prolongés qu'au départ [160].

Le remodelage électrique se développe dans les heures suivant l'installation de la fibrillation atriale, et implique des altérations électrophysiologiques incluant un raccourcissement de la période réfractaire effective et de la durée du potentiel d'action.

En 1995, MC. Wijffels et al ont montré, sur un modèle animal de fibrillation atriale, que la répétition de stimuli atriaux rapides (représentant expérimentalement les foyers arythmogènes) entraîne la survenue d'épisodes de fibrillation atriale de plus en plus fréquents et de plus en plus prolongés. Ils ont montré qu'après 24 heures de fibrillation atriale soutenue par des stimuli atriaux rapides, le nombre de foyers excitables augmentaient au niveau de l'oreillette, déclenchant ainsi la fibrillation atriale (13 sur 17 sites versus 4 sur 17 à l'état

basal). La multiplicité de ces sites témoigne d'une augmentation de la vulnérabilité atriale [159].

Cette homéostasie calcique conduisant à une surcharge de la cellule en calcium, elle-même inductrice du remodelage atrial [327].

Si un rythme rapide de courte durée est imposé quelques instants, le calcium entrant est fortement augmenté. Il s'ensuit une contraction cellulaire puissante. Ces deux actions sont très brèves. Si la fréquence revient à la normale, l'entrée du calcium ainsi que la possibilité de contraction cellulaire décroissent de 64 ± 5 et $49\pm 7\%$ respectivement par rapport aux valeurs précédant l'augmentation de fréquence. Il faut près de quinze minutes pour restaurer une fonction calcique normale et donc une contraction normale. Si l'augmentation de fréquence perdure, bien que le calcium entrant via le canal calcique de type L diminue, le calcium diastolique augmente progressivement. Il s'ensuit une redistribution du calcium le long du sarcolemme. Le raccourcissement de la diastole induit une réduction de la capacité à évacuer le calcium intracytosolique, qui devrait être réabsorbé, en particulier dans le réticulum endoplasmique pendant cette phase du cycle cardiaque [327].

Au-delà d'un certain seuil (environ 15% de la valeur de base, variable suivant les myocytes), la cellule, face à la surcharge calcique, va réagir de façon à s'adapter si la fibrillation atriale persiste. On observe notamment une modulation des canaux calciques de type L [326].

L'une des premières adaptations est en effet la diminution de la densité des canaux calciques de type L [326-328].

2. Remodelage anatomique

Il existe de nombreuses données à la fois cliniques et histo-pathologiques montrant l'importance du substrat anatomique. Ainsi, à titre d'exemple, dans l'insuffisance cardiaque, la fibrillation atriale peut soit précéder, soit être devancée par l'apparition des signes d'une insuffisance cardiaque.

Lors d'épisodes de fibrillation atriale, l'oreillette subit un remodelage anatomique. Le remodelage structural est un processus lent impliquant la dégénération des myocytes, une fibrose myocardique, une dilatation de l'oreillette gauche et résultent ainsi en une hétérogénéité de la conduction.

Ce remodelage se caractérise par :

- une hypertrophie myocytaire,
- des anomalies structurelles cellulaires dont particulièrement des anomalies du noyau, du réticulum endoplasmique et des mitochondries ainsi qu'un accroissement de la matrice extracellulaire avec accumulation de glycogène,
- une réduction de l'expression de certaines connexines, particulièrement de la connexine 40 [329].

Ces modifications ne sont pas complètement irréversibles. Ainsi, il faudra environ quatre mois après la fin d'un épisode de fibrillation atriale pour que le diamètre du myocyte retrouve une taille normale. Cependant, il persistera une certaine myolyse ainsi que des altérations des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique. De plus, une fibrose restera, caractérisée par un rapport de matrice extracellulaire / Myocytes plus élevé [329].

Ces anomalies de structure cellulaire et de la matrice extra-cellulaire, qui perdurent à distance de la survenue de la fibrillation atriale, constituent des éléments favorisant l'apparition de la fibrillation atriale permanente ou persistante particulièrement si le foyer arythmogène de départ n'a pas été isolé par ablation par radiofréquence.

Dans un modèle expérimental de fibrillation atriale, la chèvre, MC. Wijffels a montré qu'une chèvre sur onze ne présente plus de fibrillation atriale à l'arrêt de la stimulation atriale (après trois semaines de stimulation atriale) et que quatre chèvres sur les dix avec fibrillation atriale récupèrent un rythme sinusal après une semaine d'arrêt de la stimulation. Ainsi l'élément déclenchant qui est le foyer arythmogène, ne peut expliquer à lui seul toutes les formes de fibrillation atriale [159].

3. La fibrose

Anatomiquement, les altérations structurelles du myocarde atrial ont été retrouvées sur des biopsies atriales per-opératoires. Ainsi, en cas de fibrillation atriale persistante ou permanente, une apoptose a été retrouvée, ainsi qu'une fibrose et une distorsion de l'architecture cellulaire [176].

La fibrose ne se développe pas de la même manière chez tous les patients. Ainsi, J. Xu et al, ont comparé le tissu atrial prélevé sur des cœurs explantés à l'occasion d'une transplantation cardiaque chez des patients en insuffisance cardiaque terminale sur cardiopathie dilatée (n =

53), dont seize n'avaient pas présenté de fibrillation atriale et trente-sept avaient un antécédent de fibrillation atriale (dix-neuf patients en fibrillation atriale permanente et dix-huit en fibrillation atriale persistante). La fibrose évaluée par la quantité de collagène de type I est très faible en rythme sinusal, modérée en fibrillation atriale persistante et majeure en cas de fibrillation atriale permanente [330]. La quantité de fibrose interstitielle est corrélée avec l'expression des métalloprotéases. Dans ce même travail, J. Xu et al, ont montré une diminution d'expression des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases TIMP-2 en cas de fibrillation atriale, persistante ou permanente, en comparaison au groupe en rythme sinusal. Les métalloprotéases atriales MMP-2 sont pour leur part surexprimées en cas de fibrillation atriale permanente, par rapport au groupe sans fibrillation atriale documentée. Les auteurs ont également montré que le type de collagène varie suivant les formes ou les expressions cliniques des fibrillations atriales. Le collagène de type I croît graduellement dans le groupe sans fibrillation atriale documentée, dans le groupe avec fibrillation atriale persistante et est maximum dans le groupe avec fibrillation atriale permanente, alors que le collagène de type III reste stable, et ce quelle que soit l'étiologie de l'insuffisance cardiaque, qu'elle soit ischémique ou non. Cette répartition disparate des collagènes augmente l'hétérogénéité de la conduction atriale et jouerait un rôle important dans la perpétuation de la fibrillation atriale [330].

4. Surcharge hémodynamique

La surcharge hémodynamique est le plus souvent associée à une dilatation cavitaire. Ainsi, la dilatation de l'oreillette gauche et des veines pulmonaires pourrait participer à la perpétuation de la fibrillation atriale. HM. Tsao a étudié par imagerie par résonance magnétique (IRM) quarante-sept patients dont quinze étaient en rythme sinusal, vingt-quatre présentaient une fibrillation atriale paroxystique documentée et réfractaire en attente d'ablation et huit avaient présenté une fibrillation atriale persistante traitée avec succès par cardioversion électrique. Ils ont mesuré le diamètre de chaque veine pulmonaire à sa jonction avec l'oreillette gauche et de l'oreillette gauche elle-même et ont retrouvé une dilatation significative des veines pulmonaires supérieures ($p < 0,01$) et de l'oreillette gauche (diamètre transverse) ($p < 0,01$) proportionnelle à la durée de la fibrillation atriale par rapport au groupe en rythme sinusal [221].

« Le substrat apparaît donc à la fois comme un facteur secondaire aux facteurs déclencheurs et modulateurs mais aussi, comme un promoteur de la récurrence et de la perpétuation de la fibrillation atriale ».

III. Etude physiopathologique de la fibrillation atriale : approche multifacette

L'étude se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord une banque de tissus de veines pulmonaires et d'oreillettes cardiaques humaines est constituée avec la collaboration des chirurgiens cardiothoraciques, d'anatomopathologistes et du centre de ressources biologiques Cardiobiotec. Des patients avec et sans fibrillation atriale sont sélectionnés pour participer à la constitution de cette tissuthèque. Les tissus ainsi prélevés et conditionnés de manière adéquate sont ensuite utilisés pour les études histologiques, cellulaires et transcriptomiques.

En parallèle, un screening de famille dont plusieurs membres sont atteints de fibrillation atriale sur au moins deux générations a été effectué pour identifier une région d'intérêt voire un gène impliqué dans cette pathologie. Egalement une banque de prélèvements sanguins issus de patients avec et sans fibrillation atriale permet d'étudier les différents sites de l'inflammation dans la fibrillation atriale.

Ces différentes approches permettent ainsi d'étudier la fibrillation atriale sous les aspects de l'anisotropie structurale, de l'innervation, des foyers ectopiques, de l'inflammation et des facteurs génétiques.

A. Etude histologique

1. Constitution de la banque de tissus humains

Des échantillons de veines pulmonaires, d'oreillettes gauches et de jonctions oreillette gauche-veine pulmonaire ont été recueillis soit au cours d'autopsie cardiaque, soit lors de chirurgie cardiothoracique.

Dans un premier temps, les prélèvements ont été uniquement réalisés à partir de prélèvements autoptiques. Puis, afin d'améliorer l'étude des structures cellulaires et d'étudier les cellules fraîches en culture, les prélèvements tissulaires ont ensuite également été effectués lors de chirurgie cardiothoracique.

a. Prélèvements autoptiques

Des échantillons de veines pulmonaires, d'oreillettes gauches et de jonctions veine pulmonaire-oreillette gauche ont été collectés au cours d'autopsie cardiaque. Ces prélèvements ont été réalisés par les médecins anatomopathologistes du Centre de Biologie et de Pathologie Est (Pr Françoise Thivolet-Bejui, Dr David Meyronet, Dr Lara Chalabreysse, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon).

b. Prélèvements per-opératoires

Chaque patient a préalablement donné son accord par la signature d'un consentement (annexe 1) pour l'utilisation et la conservation de ses tissus per-opératoires à des fins de recherche.

Les échantillons de veines pulmonaires, d'oreillettes gauches et de jonctions veine pulmonaire-oreillette gauche ont également été collectés au cours de chirurgie thoracique et de chirurgie cardiaque de patients hospitalisés pour des lobectomies pulmonaires (Dr François Tronc, département de chirurgie cardiothoracique, Hospices civils de Lyon) ou des remplacements de valve mitrale (Pr Olivier Jegaden, Pr Jean-François Obadia, Service de chirurgie cardiaque, Hospices Civils de Lyon).

c. Collection des données cliniques

Les prélèvements ont été obtenus à partir de vingt-trois patients avec fibrillation atriale et vingt-et-un patients sans fibrillation atriale. Des données cliniques dont l'âge, le genre, la pathologie cardiaque, l'incidence des pathologies coronariennes et des pathologies valvulaires, le diamètre de l'oreillette gauche, et la cause du décès si nécessaire, ont été collectées. Le type d'arythmie (paroxystique, persistante ou permanente) aussi bien que l'occurrence de la fibrillation atriale post-opératoire ont également été mentionnées (Tableau 3).

		FA	FA post-opératoire	RS
	Nombre	15	8	21
	ratio Homme/Femme	6/9	2/6	12/9
	Age au prélèvement	70.4 +/- 10.6	67.0 +/-9.7	53.6 +/-16.8
	IMC	24.6 +/-4.9	24.1+/-3.8	26.3 +/- 4.7
FA	Age au diagnostic	64.0 +/-10.0 (N=7)	67.0 +/-9.7 (N=8)	
	Permanente	7 (46.6%)		
	Persistante	0		
	Paroxystique	8 (53.3%)		
	post-op	9 (60%)	8 (100%)	
Facteurs de risque	Hypertension artérielle	6 (40.0%)	1 (12.5%)	4 (19.0%)
	Diabète	1 (6.6%)	1 (12.5%)	2 (9.5%)
	Dyslipidémie	4 (26.6%)	1 (12.5%)	2 (9.5%)
	Tabac	3 (20.0%)	2 (25%)	7 (33.3%)
	Antécédents familiaux de FA	0	0	0
Pathologie(s) associée(s)	Cardiopathie ischémique	1 (6.7%)	1 (12.5%)	2 (9.5%)
	Cardiomyopathie hypertrophique	0	0	0
	Cardiomyopathie dilatée	1 (6.7%)	0	0
	Cardiopathie valvulaire	13 (86.7%)	8 (100%)	2 (9.5%)
	Syndrome de Brugada	0	0	1 (4.8%)
	Syndrome du QT long	0	0	0
	Dysplasie arythmogène du ventricule droit	0	1 (12.5%)	0
	Autre trouble du rythme/conduction	5 (33.3%)	2 (25%)	2 (9.5%)
	Thyroïdisme	4 (26.7%)	1 (12.5%)	2 (9.5%)
Données échocardiographie	taille de l'OG	46.5mm +/- 12.5 (N=11)	34.5 cm ² +/- 4.7 (N=6)	39.8mm +/- 6.9 (N=4)
	Fraction d'éjection du ventricule gauche	56.1 +/- 18.1(N=14)	70.0 +/- 9.6 (N=7)	61.7 +/-16.3 (N=7)
Dosage biologique	Protéine C réactive	31.2 +/-35.5 (N=11)	2.3 +/- 2.1 (N=5)	75.5 +/- 84.0 (N=10)

Tableau 3: Données cliniques des patients participants à la banque de tissus cardiaques (FA : fibrillation atriale ; RS : rythme sinusal ; OG : oreillette gauche ; IMC : indice de masse corporelle)

d. Traitements des échantillons

Les échantillons sont conditionnés de trois manières possibles selon l'analyse ultérieure :

- conditionnement en AFA (alcool, formol, acide acétique) puis inclusion du tissu en paraffine : étude histologique et immunohistochimique
- conditionnement en glutaraldéhyde 4 % puis inclusion du tissu en résine Epon : étude en microscopie électronique
- conditionnement en tube sec puis congélation immédiate à -80°C : étude du transcriptome
- conditionnement en milieu HBSS puis mise en culture cellulaire : étude d'immunocytochimie.

2. Analyse structurale

a. Protocole d'étude

Pour chaque bloc de paraffine, une lame est colorée au Hematoxyline Phloxine Safran (HPS) pour accentuer la coloration des fibres musculaires et du tissu conjonctif.

Les prélèvements proximaux de veine pulmonaire ont été effectués transversalement à l'ostium au plus près de la jonction avec l'oreillette gauche. Les prélèvements distaux à 1 cm de la jonction.

Une section transversale (ie perpendiculaire à la direction du flux sanguin) est réalisée pour chaque veine pulmonaire: Ces échantillons seront utilisés pour observer l'organisation du manchon musculaire autour de la circonférence de la veine pulmonaire.

Egalement, une section est coupée longitudinalement à partir de l'oreillette gauche vers la veine pulmonaire, c'est-à-dire que la section est orientée parallèlement au flux sanguin. Un total de vingt segments a été obtenu pour observer la jonction VP-OG.

Les prélèvements autoptiques de sept patients sont ainsi étudiés. Les prélèvements autoptiques ont permis de recueillir des jonctions OG-VP, ce qui est plus difficile sur les

prélèvements per-operatoires. Plusieurs caractéristiques ont été observées sur les lames de chaque patient :

- la disconnection musculaire,
- les changements d'orientation des fibres musculaires,
- la variation de l'épaisseur du manchon musculaire,
- la présence de fibrose.

L'analyse de l'organisation structurale des fibres est réalisée sous un microscope optique.

b. Organisation du manchon musculaire atrial autour de la circonférence des veines pulmonaires

La paroi du cœur et la plupart des vaisseaux comprennent trois couches dont l'épaisseur relative et la constitution varient avec la fonction particulière accomplie par la structure (Tableau 4).

<i>Localisation histologique</i>	<i>cœur</i>	<i>Vaisseaux</i>	<i>Composition</i>
<i>Interne</i>	Endocarde	Intima	Epithéliale et conjonctive
<i>Moyenne</i>	Myocarde	Media	Musculaire et conjonctive
<i>Externe</i>	Epicarde	Adventice	Conjonctive

Tableau 4: Organisation des couches de la paroi du cœur et des vaisseaux

Toutes les veines pulmonaires ont le même arrangement de base organisé en plusieurs couches [214, 230] (Figure 26) :

- l'endothélium
- la media : constituée de tissu fibreux et élastique et de cellules musculaires lisses
- l'adventice : constituée de tissu fibreux, élastique et adipeux. L'épaisseur varie considérablement mais est généralement plus épaisse que la media et le manchon musculaire réuni.

Les cellules myocardiques sont généralement situées entre la media et l'adventice.

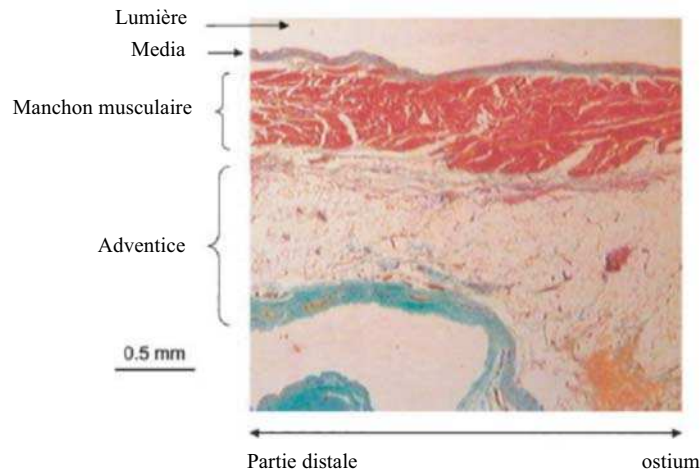


Figure 26: Coupe d'une veine pulmonaire – Coloration au Trichrome [230]

➤ Etude des extensions proximale et distale du manchon musculaire

Pour cette observation, nous disposons seulement des coupes d'un patient pour lequel des prélèvements proximaux et distaux ont été effectués. Ainsi, deux sections ont été réalisées au niveau des régions distales et proximales de la veine pulmonaire supérieure gauche (VPSG), de la veine pulmonaire supérieure droite (VPSD) et de la veine pulmonaire inférieure droite (VPID). Le manchon musculaire s'étend seulement dans la partie distale de la VPID. Aucun manchon myocardique n'est retrouvé dans la partie distale de la VPSG et de la VPSD. Dans la circonférence de la VPID distale, le manchon musculaire s'étend moins autour de la veine pulmonaire que dans la partie proximale. Il s'étend ainsi sur approximativement 10% de la circonférence de la VPID alors que dans la partie proximale, il s'étend sur 45% de la circonférence. L'organisation et l'orientation des fibres myocardiques sont identiques dans ces deux zones proximales et distales.

➤ Etude de la répartition du manchon musculaire atrial dans la circonférence des veines pulmonaires proximales

Les caractéristiques de ce manchon varient selon les individus et pour un même individu. Il ne s'étend pas autour de toute la surface de la veine pulmonaire. La longueur de l'extension varie entre les veines pulmonaires d'un même patient et entre les mêmes types de veines pulmonaires (VPSG, VPSD, ...) de différents patients. Le tableau 5 récapitule le pourcentage de la circonférence de la veine pulmonaire recouverte par l'extension du manchon musculaire atrial chez les sept patients. On peut noter que ces pourcentages sont très variables entre les patients et entre chaque veine pulmonaire.

Patients	VPSD	VPSG	VPID	VPIG	Moyenne totale (+/-EC) (sur toutes VP)
1	90%		75%	45%	68.3+/-20.9 %
2	0	75%	45%	30%	37.5 +/- 27.0%
3	25%	15%	20%	50%	27.5% +/-13.5%
4	90%	0	50%	0	35.0 +/- 37.7%
5	100%	40%	80%	90%	77.5% +/-22.8
6	95%	0	0	40%	33.8 +/- 39.0%
7		100%	0	100%	66.7 +/-47.1%
Moyenne	66.7 +/- 39.1%	38.3 +/-37.9 %	38.6 +/- 30.6%	50.0 +/- 32.1 %	

Tableau 5: Pourcentage de la circonférence de la veine pulmonaire recouverte du manchon myocardique (EC : Ecart-type ; VPSD : veine pulmonaire supérieure droite ; VPSG : veine pulmonaire supérieure gauche ; VPID : veine pulmonaire inférieure droite ; VPIG : veine pulmonaire inférieure gauche ; les cases grisées correspondent à des veines pulmonaires non prélevées).

Des discontinuités dans la largeur de l'extension du manchon myocardique peuvent être observées sur une coupe. Ainsi, le manchon peut apparaître en plusieurs parties sur les coupes. Cette observation confirme le modèle évoqué par SY. Ho qui a fait la représentation suivante de l'extension du manchon sur les veines pulmonaires (figure 27) [214]:

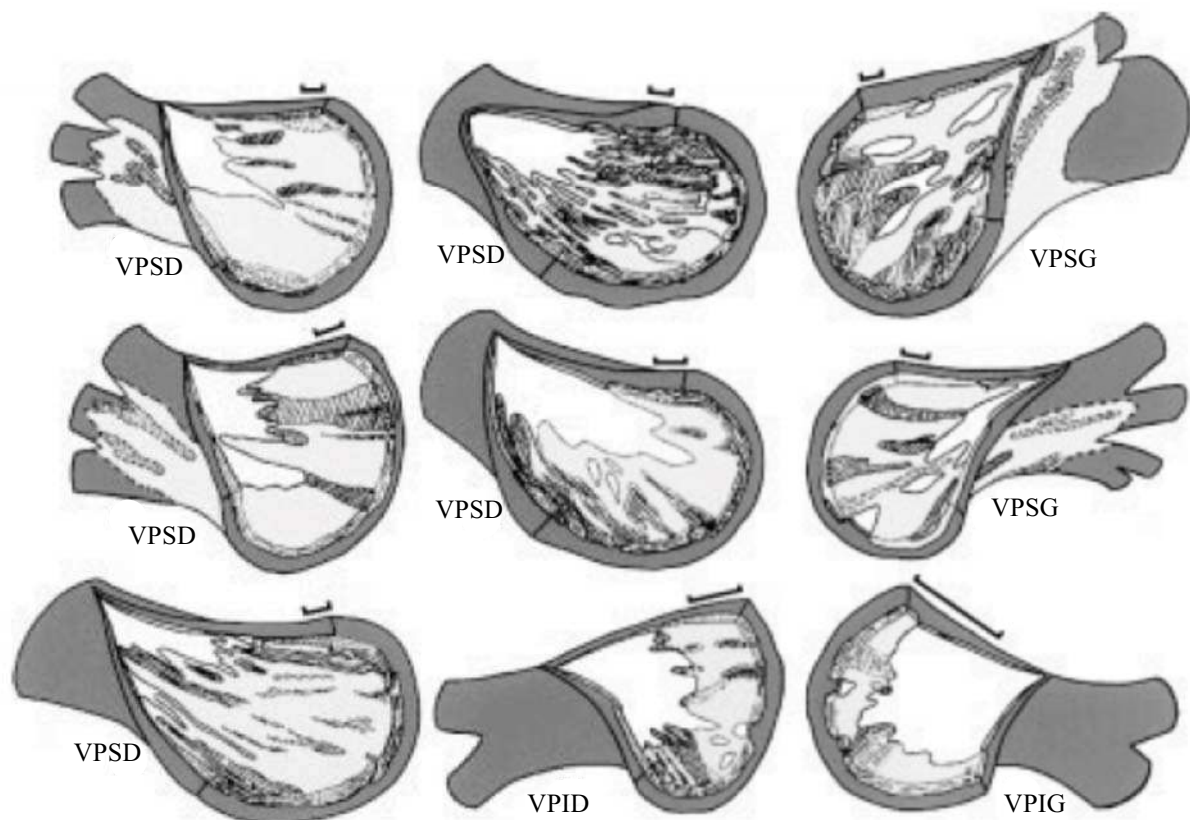


Figure 27: Reconstructions graphiques de veines pulmonaires. La paroi veineuse (blanc) est éliminée du côté endothélial pour montrer les extensions des manchons musculaires (gris clair). La barre représente une longueur de deux millimètres le long de la veine. Les zones de gris clair représentent les myocytes circulaires ou arrangés en spirale ; les zones hachurées représentent les myocytes longitudinaux ou arrangés obliquement. Le gris foncé représente les tissus fibro-adipeux de l'adventice, la couche qui est externe aux manchons. Les zones blanches dans les zones de gris clair représentent les espaces dans la paroi veineuse de manchons myocardiques. VPID : veine pulmonaire inférieure droite ; VPIG : veine pulmonaire inférieure gauche ; VPSD : veine pulmonaire supérieure droite ; VPSG : veine pulmonaire supérieure gauche [214].

L'organisation de l'extension myocardique est différente selon les veines pulmonaires et les patients. Ce manchon myocardique peut être présent dans les quatre veines pulmonaires ou dans seulement une, deux ou trois des veines pulmonaires d'un patient. Sur l'ensemble de ces patients, au moins une veine pulmonaire avec une extension musculaire est observée. Etant donné le nombre d'échantillons, aucune différence significative n'a pu être établie sur l'organisation de ce manchon musculaire en fonction du type de veine pulmonaire.

Toutes les extensions autour des veines pulmonaires n'ont pas la même organisation. L'épaisseur, le nombre de couches superposées et l'orientation des fibres musculaires diffèrent.

Au niveau de l'épaisseur de l'extension myocardique sont retrouvées le plus d'orientation différente des fibres myocardiques. L'orientation des fibres tout au long de la veine pulmonaire reste rarement le même sur la longueur.

A l'extrémité du manchon, on retrouve une ou deux couches de fibres musculaires orientées longitudinalement et/ou transversalement. L'arrangement des fibres y est plus lâche. Des changements d'orientation sont aussi observés dans cette région ; certaines orientations sont prédominantes selon les patients.

L'épaisseur de la couche musculaire se réduit au niveau de la jonction VP-OG. Le manchon myocardique est plus épais avant la jonction (du côté atrial), puis son épaisseur se réduit jusqu'à disparaître dans la veine pulmonaire.

L'extension des manchons myocardiques dans les veines pulmonaires seraient ainsi favorable à la distribution de foyers ectopiques pour l'initiation spontanée de la fibrillation atriale [79]. RJ. Hassink et al (2003) ont retrouvé une différence significative de la longueur de l'extension myocardique dans les veines pulmonaires des patients avec fibrillation atriale (15.1mm) vs les patients sans fibrillation atriale (8.8mm). Ces patients avec fibrillation atriale présentaient également un degré de fibrose intercellulaire plus important et progressif vers la partie proximale des veines pulmonaires, des discontinuités myocardiques et une hypertrophie cellulaire. Ils ont aussi observé que les myocytes de l'oreillette gauche et ceux présents dans la paroi des veines pulmonaires étaient semblables [52].

➤ Etude l'organisation des fibres du manchon musculaire à la jonction VP-OG

Différents patterns peuvent être mis en évidence en tenant compte de:

- la continuité de la couche musculaire myocardique entre la veine pulmonaire et l'oreillette gauche,
- l'orientation des fibres musculaires myocardiques.

Dans notre étude, vingt jonctions VP-OG ont pu être étudiées chez sept patients. Pour trois de ces patients, ont été étudiées les jonctions OG-VPID et OG-VPIG. Pour le quatrième patient, l'analyse a porté sur les jonctions OG-VPIG et OG-VPSD. Pour les trois autres patients, les jonctions avec les quatre veines pulmonaires ont pu être observées.

Quatre pattern ont ainsi pu être mis en évidence :

☛ Pattern 1 : Trois des veines pulmonaires (15%) présentent un manchon musculaire atrial discontinu au niveau de la jonction VP-OG (figure 28). Une courte déconnection musculaire est observée, sous la media, entre la couche myocardique de l'oreillette gauche et la couche musculaire myocardique dans la veine pulmonaire. On note également quelques fibres de tissu conjonctif entre les fibres myocardiques et au niveau sous-endothélial. L'épaisseur du manchon diminue fortement après la jonction. Le tissu adipeux devient plus abondant après la jonction dans la partie de la veine pulmonaire.



Figure 28: Jonction OG-VP de type 1 : Discontinuité entre les manchons myocardiques dans l'oreillette gauche et dans la veine pulmonaire (OG : oreillette gauche ; VP : veine pulmonaire ; la flèche indique le lieu de la jonction)

☞ Pattern 2 : Au niveau de huit veines pulmonaires (40%), le manchon musculaire est légèrement déconnecté au niveau de la jonction VP-OG (figure 29). La déconnection est localisée juste en dessous de la media. L'espace entre les deux manchons musculaires est complété par du tissu fibreux. Quelques dizaines de μm sous cet espace, on retrouve les faisceaux myocardiques. Dans ce modèle, les fibres transversales sont les plus proches de la media. Quelques cellules musculaires longitudinales orientées obliquement sont localisées entre les deux couches de faisceaux musculaires transversaux. Par ailleurs, l'épaisseur de la couche myocardique diminue fortement après la jonction.

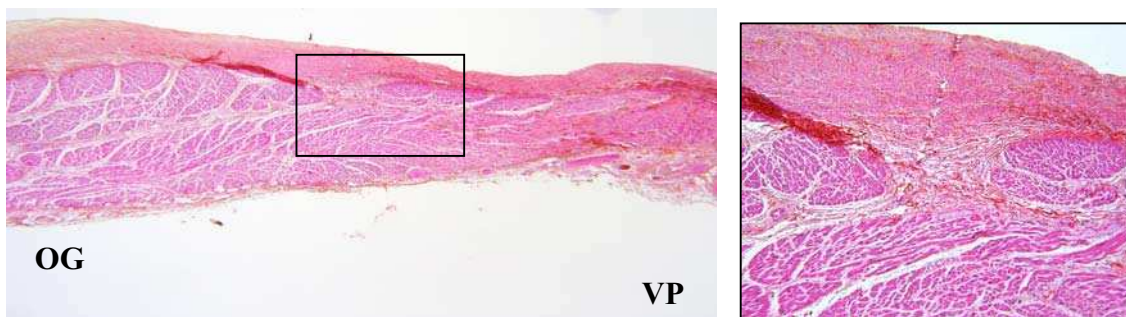


Figure 29: Jonction OG-VP de type 2 : Courte discontinuité dans le manchon myocardique sous la media mais continuité en profondeur pulmonaire (OG : oreillette gauche ; VP : veine pulmonaire ; la flèche indique le lieu de la jonction)

☞ Pattern 3 : Au sein de sept veines pulmonaires (35%), le manchon musculaire est continu et l'orientation des fibres est multiple au niveau de la jonction (figure 30). Des changements brutaux surviennent dans l'orientation musculaire dans une région assez restreinte. Sur la même largeur de tissu, l'orientation des faisceaux de cellules myocardiques se retrouve longitudinale, transversale et intermédiaire. Tous ces faisceaux musculaires orientés diversement sont proches les uns des autres; on ne note pas de présence de tissu fibreux ou de cellules adipeuses entre eux.

Avant la jonction, les cellules musculaires ont une structure plus organisée avec une seule orientation (longitudinale et transversale). Après la jonction, plusieurs orientations (différents degrés d'orientation) sont retrouvées mais à des degrés moindres qu'au niveau de la jonction.

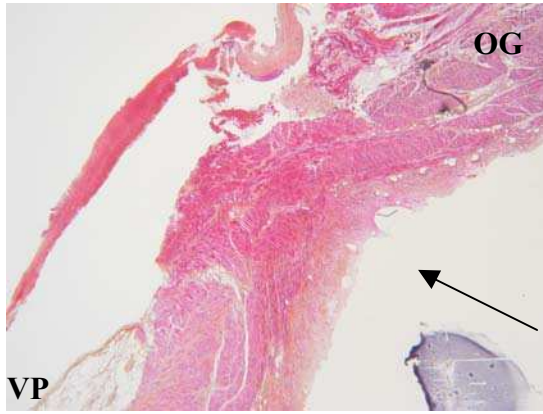


Figure 30: Jonction OG-VP de type 3 : Continuité dans le manchon myocardique à la jonction. Orientation multiple des fibres musculaires (OG : oreillette gauche ; VP : veine pulmonaire ; la flèche indique le lieu de la jonction).

☞ Pattern 4 : Dans deux veines pulmonaires (10%), le manchon musculaire est ininterrompu et l'orientation des fibres musculaires est uniforme à la jonction (figure 31). Une adipose se développe dans l'adventice de la veine pulmonaire.

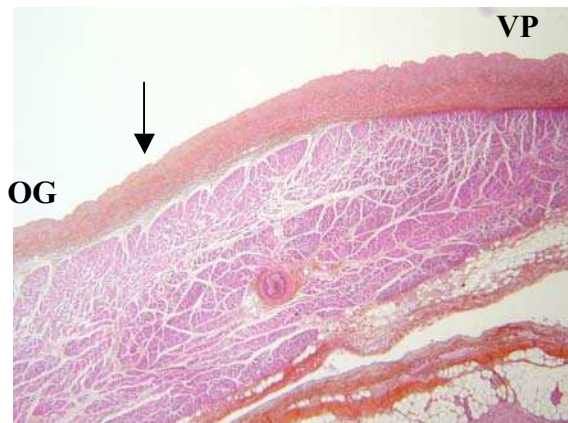


Figure 31: Jonction OG-VP de type 4 : Continuité dans le manchon musculaire. Orientation uniforme et continue des fibres musculaires (OG : oreillette gauche ; VP : veine pulmonaire ; la flèche indique le lieu de la jonction).

A la jonction VP-OG, la diversité de l'organisation des veines pulmonaires est telle que chaque veine pulmonaire a une organisation musculaire qui lui est propre et différente des autres, que ce soit au niveau de l'épaisseur musculaire ou de l'orientation des cellules musculaires.

La distribution des différents patterns est résumée dans le tableau 6 ci-dessous :

Patient	FA	PV	Pattern 1	Pattern 2	Pattern 3	Pattern 4	Présence de fibrose
1	Non	VPID					
		VPIG					
		VPSD					
2	Oui	VPID					
		VPIG					
		VPSG					
3	Non	VPID					
		VPIG					
		VPSD					
		VPSG					
4	Non	VPID					
		VPSD					
5	Oui	VPID					
		VPIG					
		VPSD					
		VPSG					
6	Non	VPIG					
		VPSD					
7	Non	VPIG					
		VPSG					
Distribution (%)			15%	40%	35%	10%	

Tableau 6: Tableau récapitulatif des patterns des veines pulmonaires des sept patients

Pour un même patient, le pattern de la structure histologique des différentes veines pulmonaires peut être différent ou identique.

Concernant les veines pulmonaires anatomiquement de même localisation, différents patterns sont également retrouvés entre les patients. Il semble ne pas y avoir de pattern systématique pour un patient ou pour un type de veines pulmonaires.

Les faisceaux de cellules transversales sont retrouvés à la frontière de la media et dans l'épaisseur de la veine pulmonaire. Les cellules musculaires longitudinales sont parfois retrouvées dans l'épaisseur du tissu. Ainsi, les manchons sont principalement composés de faisceaux de myocytes orientés circulairement et interconnectés entre eux ou avec des faisceaux des cellules musculaires orientées longitudinalement.

Au niveau de chaque jonction, on note une réduction de l'épaisseur musculaire visible par une légère courbure, liée à la différence d'épaisseur, au niveau de la jonction de l'endothélium de la veine et de l'endocarde atrial. D'une part l'épaisseur des muscles lisses de la paroi veineuse est plus étroite, et d'autre part, à partir de la jonction, le muscle de l'oreillette gauche devient plus épais. Juste avant la jonction, du côté de l'oreillette, les faisceaux de cellules

myocardiques sont moins compacts que dans l'oreillette. Au niveau de la jonction et après la jonction (du côté de la veine pulmonaire) les fibres du manchon myocardique redeviennent plus compactes.

AY Tan et al ont observé ces caractéristiques histologiques d'organisation au niveau de la jonction OG-VP de patients [331]. Ils avaient alors observé sur huit cœurs de patients post-mortem trois patterns d'organisation et d'orientation des fibres du manchon myocardique qui peuvent être favorable à la formation de l'activité de ré-entrée. Un de ces patterns comprend une déconnexion musculaire complète au niveau de la jonction alors que les deux autres patterns possèdent un manchon continu avec soit une orientation multiple des fibres musculaires du manchon soit une orientation uniforme. Ils ont observé des propriétés d'anisotropisme prépondérantes au niveau de la jonction antérieure par rapport à la jonction postérieure [331]. Cependant, aucun de ces patients n'avait de troubles du rythme cardiaque dans leurs antécédents.

Cette organisation des fibres à la jonction a également été décrite par A. Hamabe et al, 2003 chez le chien. L'utilisation du modèle animal permet de faire des corrélations entre les observations histologiques et les études de conduction électrique. Ils ont ainsi noté au niveau de la jonction OG-VP l'orientation perpendiculaire au flux sanguin des fibres musculaires, la présence de déconnexion entre les fibres musculaires par du tissu conjonctif et un changement abrupt de l'orientation des fibres. Ils ont établi une corrélation entre ces structures d'anisotropie et les blocages de conduction et les phénomènes de réentrée [229].

M. Hocini et al (2002) ont établi que la durée des délais de conduction augmente avec la quantité de rotations des fibres le long des veines pulmonaires [230].

L'arrangement circulaire des myocytes permet d'occuper la pleine profondeur du manchon [214]. Aucune relation n'a été mise en évidence entre l'âge et la présence de fibrose, bien que ces changements tendent à affecter les personnes de plus de 54 ans.

S. Verheule et al ont complété l'étude histologique par un marquage de coupes de veines pulmonaires de chien à la connexine (Cx) [191]. Ils ont ainsi observé une co-localisation des Cx40 et Cx43 au niveau des disques intercalaires, et une distribution tout au long du manchon. La Cx43 serait aussi abondante dans la paroi de l'oreillette gauche que dans la veine alors que la Cx40 serait moins abondante dans les veines que dans la paroi de

l'oreillette gauche, ce qui suggère que la conduction électrique dans les veines pulmonaires est relativement plus dépendante de la Cx43. De nombreuses plaques jonctionnelles ont ainsi été observées à l'extrémité du manchon dans la veine pulmonaire [191].

➤ **Corrélation entre ces patterns et la fibrillation atriale**

Deux des sept patients présentent des antécédents de fibrillations atriales paroxystiques. Cependant, aucune corrélation ne peut être établie sur un pattern spécifique lié à la fibrillation atriale à partir des observations ci-dessus. En effet, l'un des patients présente le pattern 3 sur ces trois veines pulmonaires alors que chez le second patient on retrouve les patterns 1, 2 et 3. Ces données sont finalement cohérentes avec les données indiquant que la fibrillation atriale paroxystique aurait plutôt une origine ectopique et les fibrillations atriales persistantes une origine histologique. Aucun des sept patients n'avait de fibrillations atriales persistantes. L'étude histologique de tissus cardiaques de patients avec fibrillation atriale persistante pourrait mettre en évidence un pattern prépondérant parmi les quatre patterns mis en évidence ou au contraire pourrait révéler un nouveau pattern.

c. Etude de l'innervation à la jonction entre les veines pulmonaires et l'oreillette gauche dans deux modèles animaux

L'innervation joue un rôle prépondérant dans l'installation de la fibrillation atriale. Des études anatomiques ont identifiées une collection de ganglions situés dans la paroi postérieure de l'oreillette gauche entre les veines pulmonaires supérieures [109]. La stimulation électrique des ganglions autonomiques à la jonction VP-OG peut transformer l'activité électrique focale des veines pulmonaires en fibrillation atriale [332] et la dénervation de veines pulmonaires augmente le succès à la long-terme de l'ablation des veines pulmonaires [228].

L'étude du réseau d'innervation cholinergique au niveau de la jonction OG-VP de deux modèles animaux a été réalisée en suivant la même procédure d'immunomarquage que les coupes de paraffine précédentes.

Un vaste réseau de fibres cholinergiques a ainsi été observé au niveau de la jonction OG-VP (figure 32) :

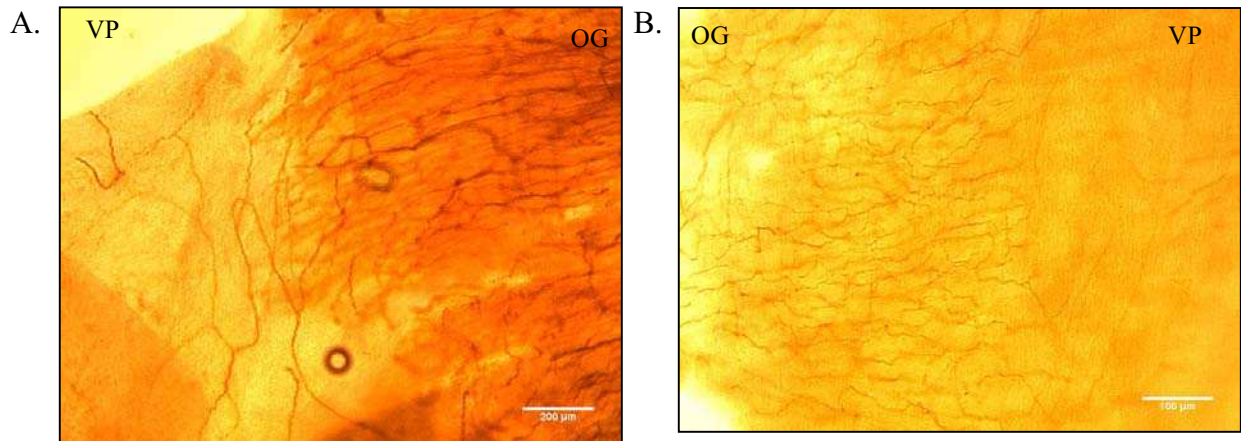


Figure 32: Immunomarquage de l'acetylcholinesterase au niveau de la jonction VP-OG chez le porc (A) et chez le chien (B) (OG : oreillette gauche ; VP : veine pulmonaire).

Cette forte densité cholinergique à la jonction OG-VP est ainsi en adéquation avec une forte implication du système nerveux autonome parasympathique dans la fibrillation atriale.

➤ Rôle du système nerveux autonome dans les veines pulmonaires

La jonction VP-OG est un domaine riche en innervation autonome [331] (figure 33).

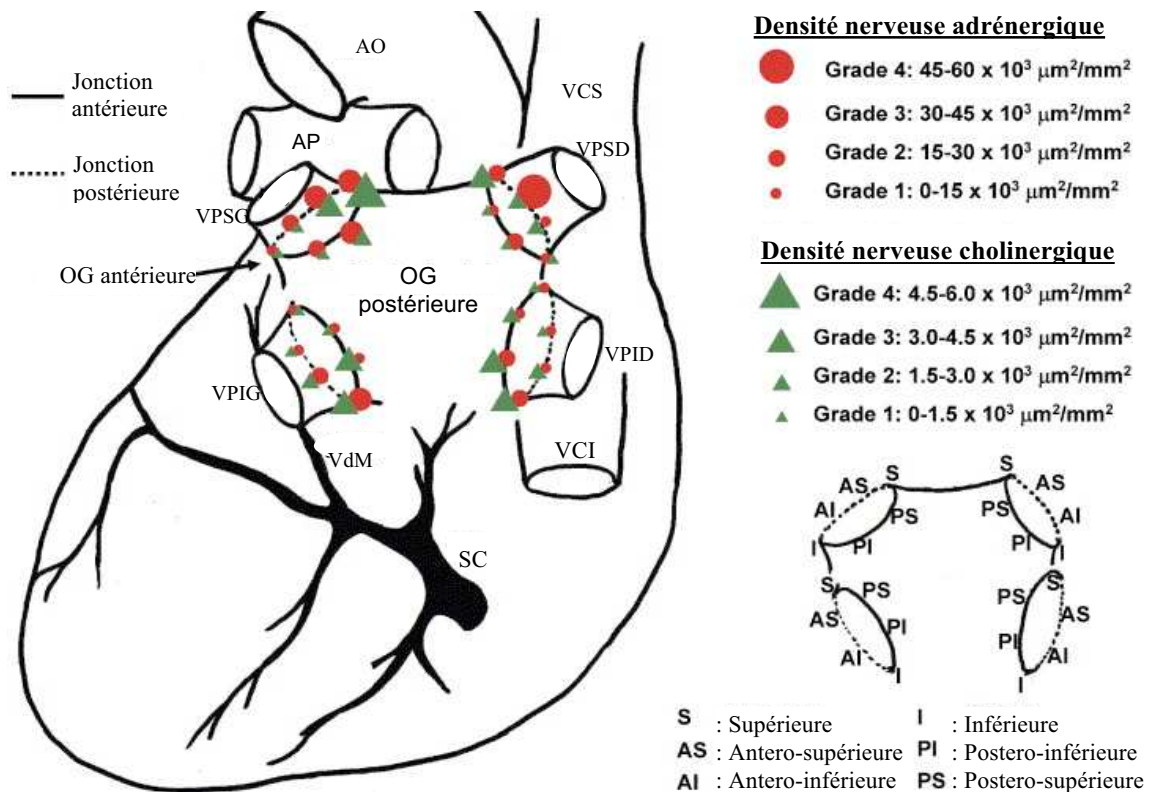


Figure 33: Distribution circonférentielle des nerfs autonomes à la jonction VP-OG. AO = aorte; AP = artère pulmonaire; OG = oreillette gauche; SC = sinus coronaire; VCI= veine cave inférieure; VCS = veine cave supérieure; VdM = veine de Marshall; VP = veines pulmonaires; VPID = veine pulmonaire inférieure droite; VPID = veine pulmonaire inférieure gauche; VPSD= veine pulmonaire supérieure droite; VPSG = veine pulmonaire supérieure gauche [331].

P. Chevalier et al ont suggéré que la proximité des fibres nerveuses près des myocytes atriaux permettait une transmission rapide des influences du système nerveux autonome [108]. Une hétérogénéité spatiale de la distribution des nerfs autour de l'oreillette gauche peut expliquer une hétérogénéité de l'excitabilité du myocarde et les périodes réfractaires [129, 333]. Ils ont observé des gradients d'innervation de l'oreillette gauche et des veines pulmonaires [108, 331]. Ces gradients d'innervation peuvent contribuer aux mécanismes complexes de la propagation électrique au cours de la fibrillation atriale. En effet, de petits rotors localisés au niveau de la paroi postérieure de l'oreillette gauche et de l'ostium des veines pulmonaires, régions richement innervées, peuvent en effet déclencher et perpétuer ces processus fibrillatoires [108].

Par des études immunohistochimiques sur un modèle canin de fibrillation atriale (produit par une stimulation de l'oreillette droite), Chang et al ont observé une augmentation significative des fibres nerveuses dans l'oreillette et une hétérogénéité de l'innervation [128].

H. Oral et al ont montré que l'isolation des veines pulmonaires est plus efficace dans les fibrillations atriales adrénériques, ce qui pourrait suggérer l'importance de l'innervation sympathique dans les veines pulmonaires [124]. Ainsi, l'hyperexcitabilité des veines pulmonaires peut être grandement accélérée par la stimulation adrénérique [148].

3. Identification de cellules interstitielles de type Cajal (CITC) (annexe 2) [334]

Les cellules interstitielles dites de Cajal (CIC) sont connues dans l'intestin comme étant des cellules douées d'une activité pacemaker et étant impliquées dans la neurotransmission avec les cellules environnantes. Ces cellules ont déjà été investiguées dans différents organes pour cette même fonction pacemaker [335-343]. Nous émettons donc l'hypothèse que ces cellules peuvent constituer une origine ectopique de l'activité pacemaker dans les veines pulmonaires.

a. Protocole d'étude

➤ **Immunomarquage**

La caractérisation des cellules interstitielles de Cajal est possible par l'identification de l'expression du marqueur cKit. M. Bettolli et al suggèrent qu'il est préférable de faire des coupes longitudinales pour mieux visualiser les cellules interstitielles de Cajal dans leur longueur car elles sont généralement positionnées le long des cellules musculaires lisses [337].

Ces cellules interstitielles de Cajal peuvent être repérées par immunohistochimie en utilisant l'anticorps anti-cKit [344-346]. Seul le marquage de cKit identifie 100% des cellules interstitielles de Cajal mais il marque aussi les mastocytes. Cet anticorps marquant également les mastocytes, un second immunomarquage sur une coupe sériée suivante est réalisé avec l'anticorps anti-tryptase.

Ces deux immunomarquages sont réalisés avec le système automate Benchmark (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA). Les immunomarquages ont été réalisés principalement sur les coupes longitudinales afin d'observer au mieux ces cellules interstitielles positionnées le long des cellules musculaires [337]. Dans un premier temps, les coupes sont déparaffinées avec la solution EZ Prep (Ventana) pendant 8 minutes à 75°C. un prétraitement est requis seulement pour l'immunomarquage anti-cKit (la lame est chauffée à 42°C dans un tampon pendant 2 minutes pour démasquer les antigènes. Puis, les peroxydases endogènes sont bloquées par incubation pendant 4 minutes à 42°C dans de l'hydrogène peroxyde 3%. Les lames sont ensuite incubées, à 42°C pendant 30 minutes, avec soit l'anticorps anti-cKit (anticorps polyclonal de lapin, dilution 1/200, A4502, Dako Cytomation), soit l'anticorps anti-tryptase (anticorps primaire monoclonal de souris, dilution 1/2000, clone AA1, M-7052-29, Dako Cytomation). Les coupes sont ensuite lavées en tampon salin (PBS, Phosphate-buffered saline) et incubées avec l'anticorps secondaire (anticorps IgG marqué à la peroxydase, iView Biotin Ig, Ventana) à 42°C pendant 8 minutes. Après lavage en PBS, le marquage est révélé par incubation dans un mélange de 3,3-diaminobenzidine et peroxyde d'hydrogène (Ventana) à 42°C pendant 8 minutes.

➤ **Analyse manuelle des images**

Les lames sont observées sous microscope optique au grossissement x40 à x100. Le nombre de cellules sur chaque coupe est compté à partir de cinq champs distincts répartis sur

l'ensemble de la coupe ; une moyenne est ensuite calculée pour dénombrer le nombre moyen de cellules par coupe.

➤ **Comptage des cellules par quantimétrie automatique**

Cette technique de comptage automatique est utilisée pour comptabiliser le nombre de cellules cKit(+)/Trypatse(-) sur l'ensemble de la circonférence de la veine pulmonaire, et confirmer ainsi la tendance de l'observation manuelle.

- Acquisition des images

Les images sont obtenues avec un microscope Leica DMR-RXA (Leica Microsystems, 35578 Wetzlar Germany), objectif Lens X10 (NA 0.5) et une camera couleur Sony DXC-990P 3CCD. Les lames sont reconstituées à partir d'images couleurs de 512x512 pixels par superposition des frontières (typiquement 400 images par lame).

- Analyse des images

Les cellules positives sont identifiées en trois étapes. Les limites du tissu sont obtenues par un premier seuil d'intensité grisée. Un second seuil est appliqué sur le plan du rouge pour obtenir les images des cellules. Les objets de couleur brune sont ensuite détectés par des seuils de RVB (Rouge, Vert, Bleu). Une dilatation conditionnelle est finalement appliquée en utilisant les cellules en tant que masque.

La reconstruction et l'analyse des images ont été réalisées avec le logiciel Image J. Les macro-instructions personnalisées ont été développées sur la plate-forme d'imagerie du Centre Commun de Quantimétrie (Université Lyon1).

b. Observation et localisation de cellules interstitielles de type Cajal

Nous avons mis en évidence des cellules interstitielles de type Cajal dans les veines pulmonaires humaines avec l'anticorps anti-cKit. Le diagnostic différentiel avec les mastocytes est réalisé par l'observation de:

- la forme des cellules
- la présence de prolongements cytoplasmiques pour les cellules interstitielles de Cajal
- l'apparence granulaire des mastocytes

En condition non pathologique, les mastocytes sont présents dans la muqueuse et la sous-muqueuse, donc avant les couches musculaires longitudinales et circulaires.

En revanche, en condition pathologique, dans la couche musculaire, les mastocytes sont surtout retrouvés proche des vaisseaux sanguins dilatés [347]. Ils représentent une source

majeure de facteur de croissance fibroblastique, et en retour, les fibroblastes sont une source majeure de SCF (stem cell factor), la cytokine la plus importante régulant la croissance et la fonction des mastocytes et des cellules interstitielles de Cajal.

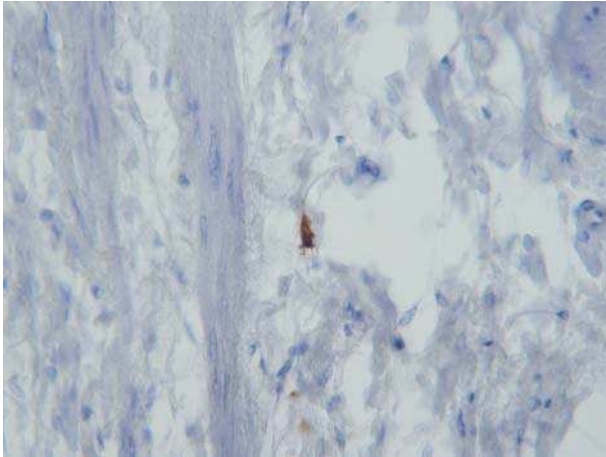
L'infiltration de mastocytes dans la couche musculaire est corrélée avec la survie des cellules interstitielles de Cajal car il y a contact entre les mastocytes et les cellules interstitielles de Cajal. Seul un nombre significatif de mastocytes est retrouvé près des vaisseaux sanguins [348].

Nous avons observé la présence de cellules interstitielles de Cajal dans la couche musculaire sous-endothéliale. Ces cellules sont regroupées en général par groupe de cinq à six, mais elles sont aussi retrouvées isolées. Elles possèdent des prolongements cytoplasmiques prenant contact en général par apposition avec les cellules musculaires lisses. On les retrouve aussi de temps en temps au niveau des capillaires. Par ailleurs ces cellules interstitielles de Cajal sont majoritairement retrouvées de part et d'autre du manchon myocardique atrial. On retrouve également des cellules interstitielles de Cajal dans le manchon myocardique, notamment à l'approche des changements d'orientation des fibres myocardiques.

Ainsi, deux régions sont observées comme étant prédominantes avec le plus grand nombre de cellules cKit(+)/tryptase(-). Premièrement, aux frontières latérales du manchon musculaire atrial dans la veine pulmonaire, et deuxièmement dans la zone la plus épaisse de la couche musculaire atriale. Entre ces deux régions, les cellules interstitielles de Cajal sont plus clairsemées.

Deux formes de cellules interstitielles de Cajal ont pu être observées :

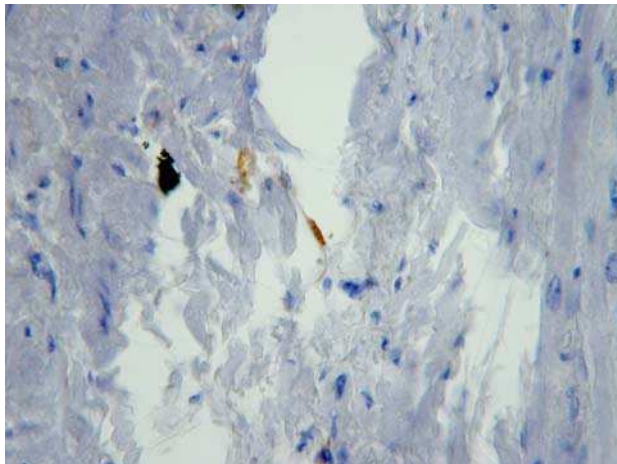
- des cellules multipolaires dont le corps cellulaire est de forme triangulaire (Figure 34). Ces cellules présentent trois prolongements cytoplasmiques qui sont en contact avec les cellules environnantes. Ce type de cellule est généralement localisé en bordure du manchon musculaire ou entre les fibres du manchon myocardique.



(x400)

Figure 34: Photo d'une cellule interstitielle de type Cajal dans une veine pulmonaire humaine par immunomarquage avec l'anticorps anti-cKit. La cellule cKit(+) / tryptase(-) a une forme pyramidale et trois prolongements cytoplasmiques. Elle est localisée juste à l'extrémité de l'extension du manchon myocardique dans la veine pulmonaire.

- des cellules dont le corps cellulaire est allongé (Figure 35). Ces cellules possèdent seulement deux prolongements cytoplasmiques. Elles prédominent le long des fascicules des fibres musculaires du manchon myocardique



(x400)

Figure 35: Photo d'une cellule interstitielle de type Cajal dans une veine pulmonaire humaine par immunomarquage à l'anticorps anti-cKit. La cellule cKit(+) / tryptase(-) a un corps cellulaire allongé et deux prolongements cytoplasmiques. Cette cellule est localisée entre l'extension du myocarde atrial et la media de la veine pulmonaire.

Des immunomarquages avec les anticorps dirigés contre l'actine du muscle lisse (SMA) et contre le neurofilament (NF) ont confirmé que ces cellules interstitielles de type Cajal n'étaient ni des cellules musculaires lisses ni des neurones.

c. Etude de la distribution des cellules interstitielles de type Cajal au niveau de l'oreillette gauche et des veines pulmonaires [334]

Les cellules interstitielles de type Cajal ont été retrouvées dans les sections de veines pulmonaires de trois des huit patients. Deux de ces trois patients ont une fibrillation atriale documentée. Les sections de veines pulmonaires sans manchon musculaire sont généralement pauvres en cellules cKit(+) au contraire des veines pulmonaires avec un manchon myocardique épais. Sur l'ensemble des coupes de veines pulmonaires, la proportion des mastocytes est plus importante que celle des cellules interstitielles de type Cajal.

Au sein des trois patients pour lesquels des cellules interstitielles de type Cajal ont été identifiées, la distribution moyenne de ces cellules est de 2.6 +/- 4.3 ICC/3mm². Cependant, cette distribution n'est pas homogène sur la circonférence de la veine pulmonaire. Les cellules interstitielles de type Cajal sont principalement observées au niveau du manchon musculaire ou à sa proximité. Le comptage automatique des cellules permet de compter l'ensemble des cellules sur la circonférence de la coupe de la veine pulmonaire. Une analyse automatique des images a été effectuée pour confirmer ces observations. La distribution des cellules interstitielles de type Cajal étant très hétérogène, le dénombrement des cellules sur l'ensemble de la coupe permet d'obtenir une densité plus réaliste de ces cellules. La densité des cellules interstitielles de type Cajal varie de 6 à 90 cellules/ par lame chez les deux patients avec fibrillation atriale et est de 4 cellules chez le patient sans fibrillation atriale. Aucune cellule interstitielle de type Cajal n'a été retrouvée chez les cinq autres patients sans fibrillation atriale. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 7 ci-dessous :

Patient	Fibrillation atriale vs rythme sinusal	CITC à la jonction OG-VP	Nb de VP avec CITC	Densité de CITC dans les VP proximale (cell/lame)
1	RS	oui	0	0
2	FA	oui	2	VPSG : 19 VPID : 6
3	FA	Oui	4	VPSD : 8 VPSG : 12 VPID : 90 VPIG : 14

Tableau 7: Nombre de CITC au niveau des jonctions OG-VP et des veines pulmonaires

Parmi ces trois patients, un seul n'a pas d'antécédent de fibrillation atriale. Les cellules interstitielles de type Cajal chez ce patient ont été retrouvées exclusivement au niveau de la

jonction VPID-OG. Ce patient, décédé à 60ans, n'avait jusqu'alors pas développé de fibrillation atriale documentée.

Pour le second patient, avec antécédent de fibrillation atriale paroxystique, les cellules interstitielles de type Cajal (CITC) ont été retrouvées aussi bien à la jonction VPs-OG que dans la couche musculaire de deux veines pulmonaires. Pour le troisième patient, également avec antécédent de fibrillation atriale paroxystique, les cellules interstitielles de type Cajal ont été retrouvées dans les quatre veines pulmonaires. Pour ce patient, la densité varie selon la veine pulmonaire. Cette distribution diminue de la région proximale à la partie distale de la veine pulmonaire (respectivement 90 CITC/lame vs 11 CITC/lame). En tenant également compte des prélèvements d'oreillette gauche, la densité moyenne de cellules interstitielles de type Cajal est significativement plus élevée chez les patients avec fibrillation atriale que chez les patients sans fibrillation atriale (respectivement 1.7 ± 3.9 CITC/3 mm² vs 0.09 ± 0.5 CITC/3 mm²; P=0.01).

e. Suggestion du rôle pacemaker des cellules interstitielles de type Cajal

La présence du canal hyperpolarisant HCN4, responsable du courant pacemaker I_f, est recherchée parmi les coupes de tissu présentant des cellules interstitielles de type Cajal. L'immunomarquage est réalisé avec l'anticorps anti-HCN4. Après déparaffinage des coupes, les antigènes sont démasqués en incubant les lames dans un tampon citrate (Target Retrieval Antigen, Dako) pendant 20 min en four à micro-ondes. Après incubation dans la solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (Universal DakoCytomation LSAB+ kit, K0679, Dako) pendant 5 minutes à température ambiante, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-HCN4 (anticorps polyclonal de chèvre, dilution 1/200, sc-19714, Santa Cruz Biotechnology, USA), sur la nuit à 4°C. Les coupes sont ensuite lavées en tampon PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire (Biotinylated Link, Universal DakoCytomation LSAB+ kit, K0679, Dako) pendant 30 minutes à température ambiante. Après lavage en PBS, le marquage est révélé par incubation dans un mélange de 3,3-diaminobenzidine pendant une minute à température ambiante.

L'immunomarquage de HCN4 s'est révélé positif pour des cellules cKit(+)/tryptase(-) (figure 36). Cette observation suggère ainsi fortement la capacité de ces cellules à développer un courant hyperpolarisant.

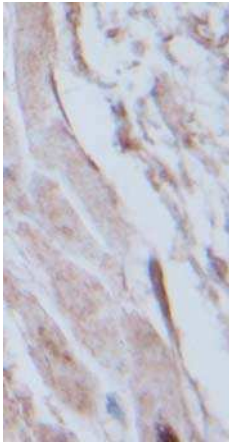


Figure 36: immunomarquage d'une cellule interstitielle de type Cajal à l'HCN4

f. Analyse ultrastructurale des cellules interstitielles de type Cajal

Pour les analyses morphologiques ultra-structurales, le technicage est réalisé au sein du centre commun d'imagerie de Laennec (CeCIL, Lyon). Les prélèvements sont coupés en petits fragments et fixés en glutaraldéhyde 2% pendant 2h à 4°C, puis post-fixés à +4°C pendant 1 heure dans une solution de tetroxyde d'osmium 1%. Puis, les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 30°, 50°, 70°, 95° et 100° avant d'être incluses dans la résine d'Epon (Epon 812, Fulham, Latham, NY). Lors de cette inclusion dans la résine, les coupes sont orientées de manière transversale. Des coupes ultrafines de 60-80µm sont ensuite réalisées avec l'ultramicrotome RMC/MTX (Elexience, Verrières-Le-Buisson, France) et montées sur des grilles en cuivre. Ces coupes sont ensuite contrastées par incubation dans une solution de d'acétate d'uranyl 8% et de citrate de plomb. Les coupes sont finalement observées avec le microscope à transmission électronique Jeol 1200 EX (Jeol Ltd. Tokyo, Japon) équipé d'une caméra à haute résolution Mega-View II (C&S Compagny, Ltd, Seoul, Corée). L'analyse des images est réalisée avec le logiciel Soft Imaging System (Eloïse SARL, Roissy, France).

Les images de la figure 37 révèlent une cellule interstitielle dont le prolongement cytoplasmique est en apposition sur la lame basale d'un faisceau de cellules myocardiques.

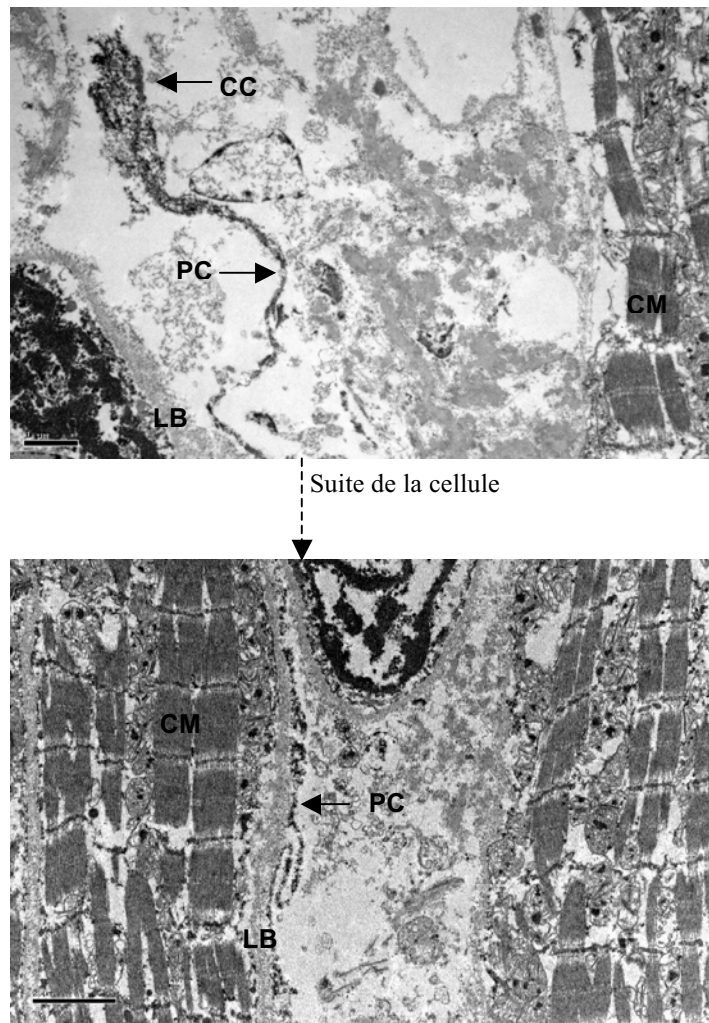


Figure 37 : Images d'une cellule interstitielle en microscopie électronique à transmission sur une coupe de veine pulmonaire humaine (CC : corps cellulaire ; CM : cellule myocardique ; LB : lame basale ; PC : prolongement cytoplasmique).

Cette observation est l'une des caractéristiques de ce type cellulaire bien connu dans l'intestin. Les caractéristiques ultra-structurales des cellules interstitielles de Cajal ont notamment servi à la description et la caractérisation de ces cellules. Les échantillons tissulaires étant issus de prélèvements autoptiques, les organites sont dégradés. On observe toutefois la forme du corps cellulaire et un prolongement cytoplasmique en contact avec la lame basale d'une cellule myocardique du manchon myocardique, ce qui suggère fortement que cette cellule est une cellule interstitielle de type Cajal.

g. Caractérisation phénotypique des cellules interstitielles de type
Cajal en culture

La constitution de la cohorte de prélèvements per-opératoires a permis d'obtenir des prélèvements frais pouvant être mis en culture.

*α. Dissociation et mise en culture des cellules
interstitielles de type Cajal*

Les cellules interstitielles de type Cajal étant des cellules d'origine mésenchymateuse, elles ont la capacité de croître facilement. Cependant, peu de cellules cKit(+) ont pu être observées, d'une part à cause du faible nombre de cellules interstitielles de type Cajal dans les prélèvements et d'autre part, ces cellules ont pu perdre leur phénotype cKit lors de la mise en culture.

Toutes les manipulations de culture cellulaire ont été réalisées au sein du Centre de biotechnologie cellulaire (Hospices Civils de Lyon, Pr Marie-Thérèse Zobot, Bron).

Les fragments de tissus sont recueillis dans de l'HBSS stérile à +4°C et amenés rapidement au sein du laboratoire. Les tissus fibreux et adipeux sont coupés et écartés, puis la paroi de veine pulmonaire est coupée en petites bandelettes de 1.5mm d'épaisseur et de cinq à dix millimètres de long.

Pour la dissociation cellulaire, les bandelettes sont placées dans une flasque de culture de 25cm² dans une étuve (5%CO₂) et agitées en continu. Trois rinçages de 5 minutes en HBSS sans calcium sont réalisés avant de soumettre le tissu à un mélange de collagénase (Sigma type 1a, 1mg/ml) et de protéase X (Sigma 0.5mg/ml) dissout dans du HBSS sans calcium. Le milieu est ensuite remplacé par de l'HBSS sans calcium frais contenant seulement 1mg/ml de collagenase. Le tout est placé en agitation continue jusqu'à que les bandelettes de tissus deviennent plus souples et commencent à relarguer des cellules. Le tissu est ensuite rincé dans de l'HBSS sans calcium et placé dans le milieu de culture sous agitation. Le contenu cellulaire de chaque solution recueillie lors de ces étapes de relargage cellulaire est analysé pour compter les cellules dissociées (Cellules de Malassez). Il est ensuite filtré par un filtre en nylon de 40µm, puis centrifugé à 900rpm pendant 5 min. Les cellules sont finalement réensemencées dans le milieu de culture à 1.5x10⁴ cellules/cm² sur les lamelles circulaires dans des plaques de 24 puits (500µl de milieu par puits). Le milieu est changé tous les jours.

Pour les cultures d'explant, des petits cubes (0.5mm²) sont coupés de la paroi de la veine pulmonaire puis sont placés dans 200µl de milieu DMEM-F12 sur les lamelles circulaires

dans des plaques de 24 puits. Après 2 jours, 500µl de milieu de culture DMEM-F12 frais est ajouté.

Solutions utilisées :

Toutes les solutions utilisées sont stériles. L'eau est sans endotoxine (Laboratoires Aguetant, Lyon, France).

Composition :

- Milieu HBSS sans calcium : HBSS 1X sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , 0.075%, 0,01M MgCl_2 , Bicarbonate de sodium 2.5 mM, 0.01M HEPES et 100 U/ml de Pénicilline-100µg/ml de streptomycine.
- Milieu de culture DMEM-F12 supplémenté de 5ng/ml de Stem cell Factor (SCF) : 10% de sérum de veau foetal (SVF), 100 UI/ml de pénicilline, 0.1 mg/ml de streptomycine, et 1.25 µg/ml d'amphotéricine B.

β. Immunomarquage : caractérisation phénotypique

Les cellules adhérentes sur les lames sont rincées avec du PBS 1X et fixées avec du PFA 4% pendant 20 min à 4°C, puis bloquées dans un mélange de 5% de SVF, Triton 0.1% pendant 1h à température ambiante, puis incubées sur la nuit à 4°C avec soit :

- anticorps de souris anti-cKit à la dilution 1/100 (A4502, Dako Cytomation)
- anticorps de souris anti-actine de muscle lisse à la dilution 1/50 (N1584, Dako Cytomation)
- anticorps de lapin anti-Cx43 à la dilution 1/200 (71-0700, Invitrogen, Zymed Laboratories)
- anticorps de lapin anti-AChE à la dilution 1/200 (LS-B1819, Lifespan Biosciences)
- anticorps de lapin anti-ChAT à la dilution 1/200 (LS-C6076, Lifespan Biosciences)
- anticorps de souris anti-tryptase à la dilution 1/100 (M-7052, Dako Cytomation)
- anticorps de chèvre anti-HCN4 à la dilution 1/100 (sc-1974, Santa Cruz Biotechnology)

Les anticorps secondaires utilisés pour la révélation sont :

- anticorps anti-souris Alexa 594 (Molecular Probes)
- anticorps anti-lapin Alexa 488 (Molecular Probes)

Marquage au Fluo-4-AM :

Les cellules non fixées sont chargées pendant 30 minutes avec du Fluo-4-AM à 3.5 μ M en milieu de culture. Après un rinçage intensif avec le milieu de culture, l'excitation est provoquée à la longueur d'onde de 400nm et observée à travers un filtre de longueur d'onde à 520nm.

Les lames marquées sont rincées en PBS puis observées sous microscope inverse à fluorescence.

➤ **Observations :**

☞ *Cellules interstitielles*

L'image A (figure 38A) révèle une cellule interstitielle cKit⁺ isolée positive pour la marqueur HCN4. Les images suivantes montrent des cellules interstitielles positives pour HCN4 portant également les marqueurs de la connexine 43 (figure 38B) et ceux de l'acétylcholine transférase (figure 38C). On peut noter que ces cellules possèdent les caractéristiques morphologiques des cellules interstitielles de Cajal (corps cellulaire allongé avec deux prolongements cytoplasmiques et corps cellulaire en étoile avec plusieurs prolongements cytoplasmiques).

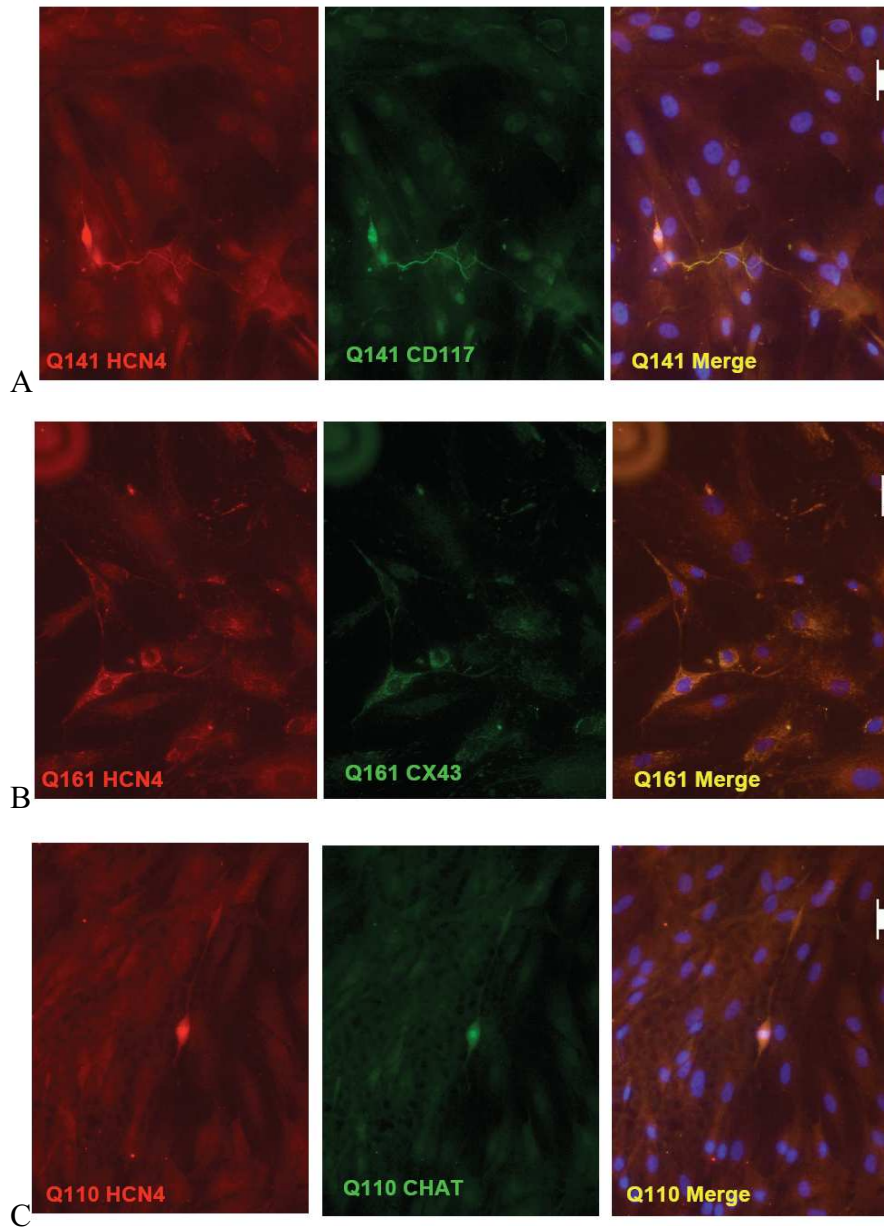


Figure 38: Immunomarquage de cellules interstitielles en culture à partir de prélèvement tissulaire de jonction VP-OG. A : Immunomarquage au CD117 (cKit), HCN4 ; B : : Immunomarquage au HCN4 et à la Cx43. C : Immunomarquage au HCN4 et à la ChAT.

☞ *Myocytes*

Les images A et B (figure 39) montrent des myocytes en culture dont certains sont positifs pour le marqueur HCN4. La figure B révèle que tous ces myocytes ne possèdent pas le marqueur HCN4.

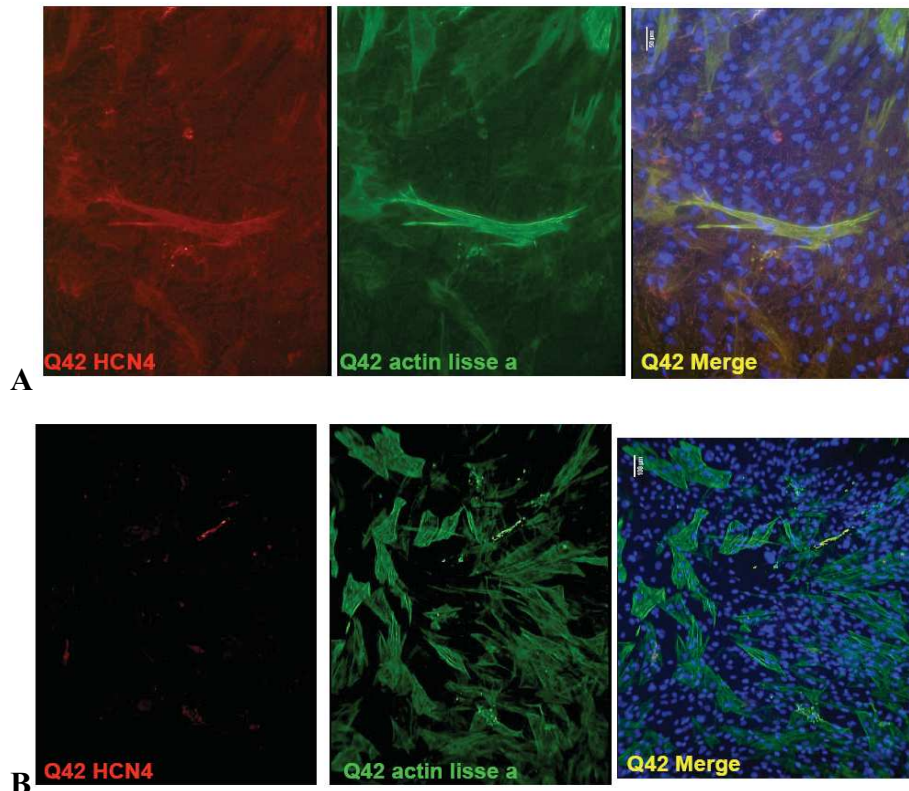


Figure 39: Immunomarquage de myocytes en culture à partir de prélèvement tissulaire de jonction VP-OG. A-B : Immunomarquage au HCN4 et SMA.

h. Rôle des cellules interstitielles de Cajal

α. Historique

Historiquement, en 1892, Ramon y Cajal a mis en évidence les cellules interstitielles de Cajal dans l'intestin. Ces cellules ont longtemps été confondues avec des neurones ou des cellules musculaires lisses à cause de leur forme. L. Lecoin et al ont montré que les cellules interstitielles de Cajal ont leur origine dans le mésenchyme de l'intestin [349].

β. Origine embryonnaire et développement des cellules interstitielles de Cajal

➤ *Développement embryonnaire :*

Plusieurs études développementales ont été réalisées chez la souris qui commencent à exprimer le récepteur à tyrosine kinase (Kit) dans les cellules mésenchymateuses indifférenciées du petit intestin à E12 (jour embryonnaire 12) [269] . A E15, les cellules cKit s'agrègent en des clusters denses et commencent à former des réseaux de cellules

interstitielles de Cajal. Ensuite, entre E15 et E18, une décision de lignage est décidée (figure 40):

- soit les cellules perdent l'expression Kit : elles développent alors les caractéristiques typiques des cellules musculaires lisses et constituent alors la couche de muscle longitudinale.
- Soit les cellules gardent leur expression Kit et deviennent des cellules interstitielles de Cajal myentériques

A E18-E19, les réseaux de cellules interstitielles de Cajal apparaissent matures et une activité d'ondes lentes peut être observée.

Les cellules interstitielles de Cajal ont la même origine embryonnaire que les cellules musculaires lisses ; elles ont les mêmes précurseurs mésenchymateux intestinaux. C'est le marqueur cKit qui est à l'origine de cette différenciation en l'une des deux types de cellules. Cette origine commune explique les ressemblances morphologiques entre les cellules musculaires lisse et les cellules interstitielles de Cajal [350].

Après la naissance, l'ultrastructure des cellules interstitielles de Cajal continue de se développer. Au cours de cette période, l'amplitude et la fréquence de l'activité électrique spontanée s'accroît, de telle manière que les ondes lentes ont leurs caractéristiques adultes à dix jours [351].

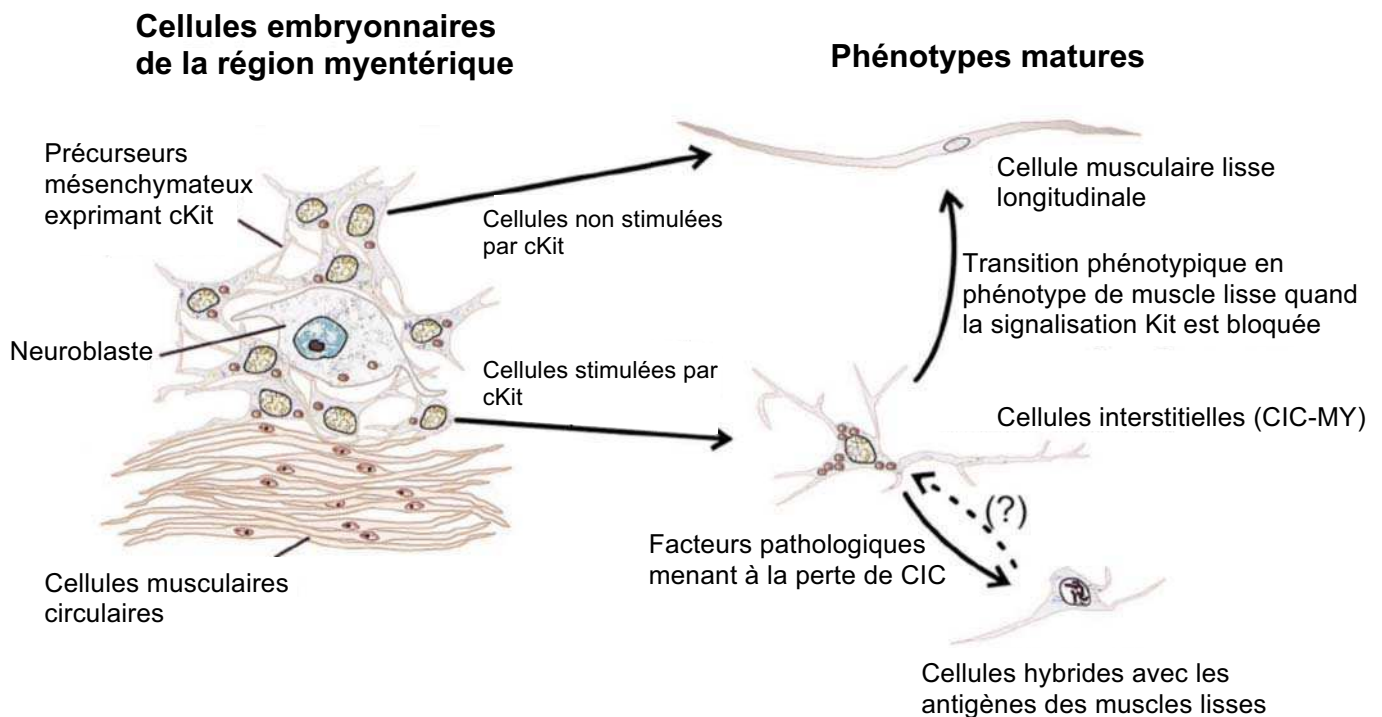


Figure 40: représentation du développement et de la plasticité des cellules interstitielles de Cajal [352][379].

γ. Rôle des cellules cKit+ dans la fonction cardiaque

Des cellules cKit positives ont été décrites dans le cadre de la réparation tissulaire post-infarctus. Plusieurs études ont ainsi montré que la fonction cKit est importante dans la réparation cardiaque [353].

Les données de différentes études suggèrent ainsi que dans le myocarde infarcté, les cellules cKit+ sont requises pour médier la transition importante de l'endothélium quiescent à l'état actif. Dans la tumorigénèse, ce phénomène est considéré comme un switch angiogénique médié par les cytokines [354-355].

En résumé, l'activation du récepteur ckit sur les cellules dérivées de la moelle osseuse serait importante pour leur mobilisation au niveau du cœur infarcté ; Ces cellules cKit(+) initient ainsi l'angiogénèse et potentialisent la réparation de tissus riches en myofibroblastes [356].

δ. Structure des cellules interstitielles de Cajal

Les différentes études sur les cellules interstitielles de Cajal au niveau de l'intestin ont permis de déduire les caractéristiques structurales des cellules interstitielles de Cajal :

Deux types de cellules sont principalement retrouvés :

- les cellules multipolaires, en forme d'étoile ou de triangle entourant le plexus myentérique de l'intestin. Elles possèdent plusieurs prolongements cytoplasmiques ramifiés. Au niveau des sites de ramifications, un cytoplasme plus abondant peut être noté [357].
- les cellules avec un corps cellulaire allongé dont les longues ramifications sont parallèles à l'axe des cellules musculaires. Le corps cellulaire est plus long que celui des cellules multipolaires [357]

Une des caractéristiques permettant de distinguer les cellules interstitielles de Cajal des autres cellules environnantes est la présence des prolongements cytoplasmiques dont la longueur peut atteindre plus de 100µm, mais est en général leur taille avoisine les 20-30µm [338].

Chacun des deux types cellulaires semble être retrouvé dans des régions précises dans les tissus des organes [341, 358]. Ainsi, les cellules multipolaires sont retrouvées au niveau du plexus myentérique de l'intestin, c'est-à-dire entre les deux couches de muscles circulaires et longitudinales ainsi que dans la muqueuse et la sous-muqueuse du colon. En revanche, les cellules allongées sont préférentiellement retrouvées dans la couche musculaire plus profonde.

KM. Sanders et al (1999) ont émis un schéma de la répartition des deux types de cellules interstitielles de Cajal [357]. Les cellules interstitielles de Cajal forment un réseau tridimensionnel avec les cellules musculaires et les cellules nerveuses environnantes (figure 41). Les cellules interstitielles de Cajal forment également des connections par jonctions gap entre les cellules interstitielles de Cajal et avec les cellules musculaires lisses voisines. L'innervation des cellules musculaires peut être indirecte et se produit principalement par des structures de type synapses entre les nerfs et les cellules interstitielles de Cajal.

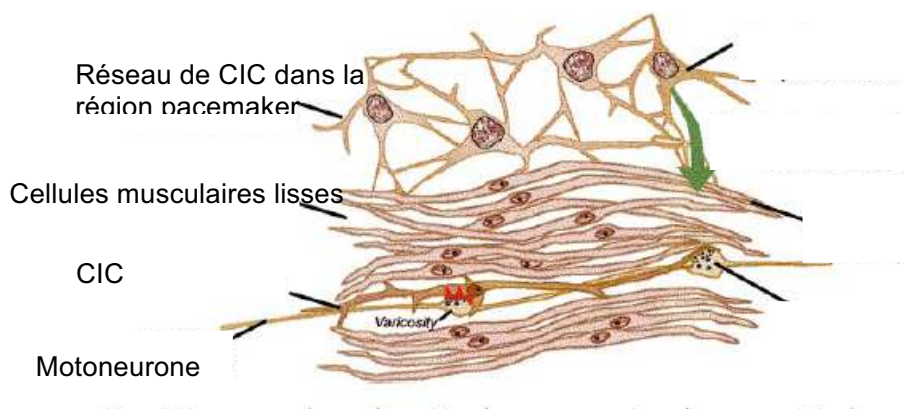


Figure 41: Réseau tridimensionnel des cellules interstitielles de Cajal (CIC) avec les cellules environnantes

ε. Description de cellules interstitielles de Cajal au niveau cardiaque

Les équipes de LM. Popescu et ME. Hinescu ont décrit la présence de cellules interstitielles de type Cajal dans différents organes [338-339, 359-365]. Elles ont notamment été mises en évidence dans le cœur, au niveau du myocarde atrial et au niveau de l'interstitium du myocarde ventriculaire [338-339]. Ils ont observé les mêmes caractéristiques immunohistochimiques et ultra-structurales que les cellules interstitielles de Cajal du tractus gastro-intestinal.

En microscopie électronique et microscopie confocale, ils ont montré que les cellules interstitielles de type Cajal atriales et ventriculaires établissent des contacts avec [339] :

- Les fibres nerveuses
- Les myocytes
- Les capillaires sanguins
- Les cellules du tissu conjonctif
- Les cellules immunoréactives.

LM. Pospesu et al ont proposé un modèle quadri-dimensionnel de l'organisation des cellules interstitielles de type Cajal et des cellules environnantes (figure 42) :

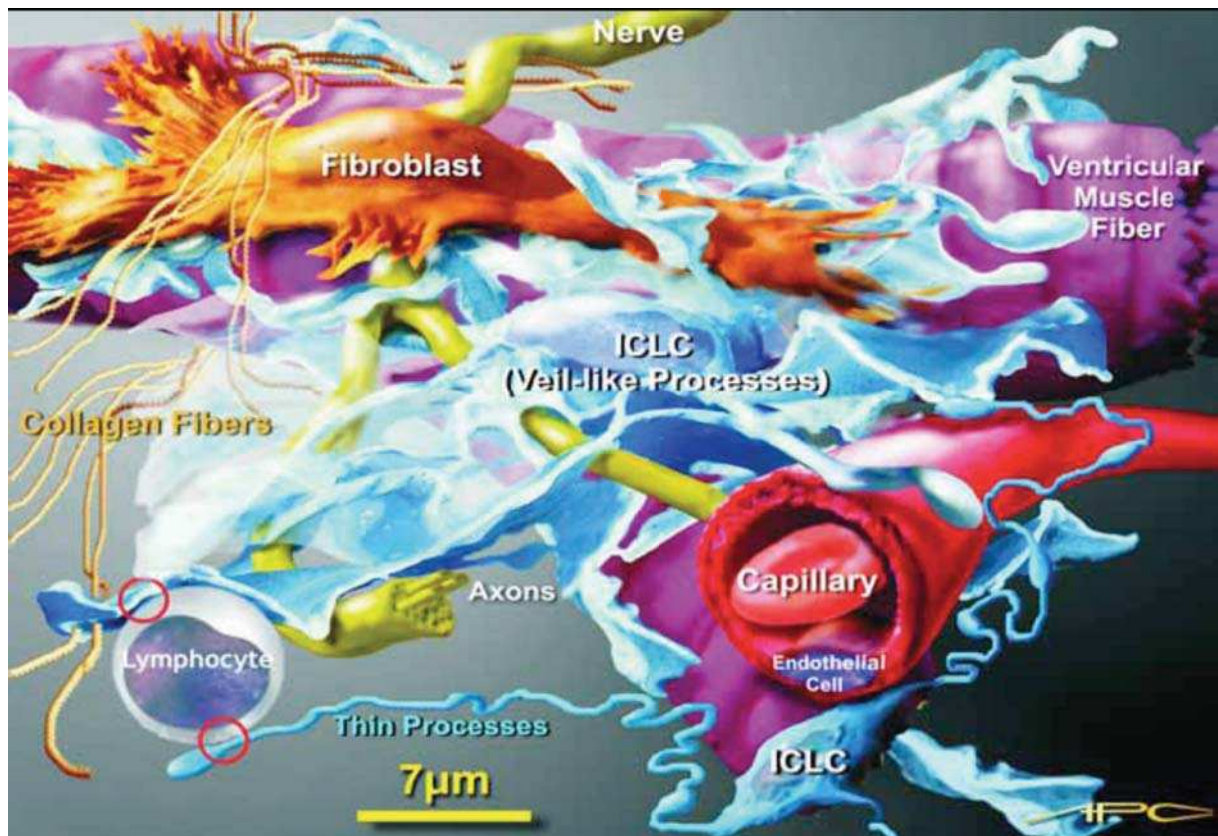


Figure 42: Modèle quadridimensionnel des cellules interstitielles de type Cajal et des cellules environnantes [339]

Les cellules interstitielles de type Cajal sont moins nombreuses dans les ventricules que dans les oreillettes. Par ailleurs, aucune distinction n'a été observée entre les côtés gauche et droit du cœur [339].

Ils ont également étudié la répartition des cellules interstitielles de type Cajal chez des patients sans fibrillation atriale :

- au niveau atrial [338] :
 - les cellules interstitielles de type Cajal représentent 1 à 1,5% du volume du myocarde atrial
 - dans l'espace intercellulaire et sous l'épicarde, on compte une cellule interstitielle de type Cajal pour huit à dix myocytes atriaux
- au niveau du ventricule [339] :
 - les cellules interstitielles de type Cajal représentent 32% du nombre de cellules interstitielles du ventricule.
 - Le ratio cardiomyocytes / cellules interstitielles de type Cajal est de 70/1.

Il serait intéressant d'étudier ces répartitions également chez les patients en fibrillation atriale et en fonction du type de fibrillation atriale.

Les cellules interstitielles de type Cajal expriment aussi l'antigène CD34 (exprimé à la surface des cellules endothéliales et des fibroblastes). Ainsi, les fibroblastes classiques ont des caractéristiques communes avec les cellules interstitielles de type Cajal. Ils peuvent donc être une sous-population des cellules interstitielles atriales [338].

La fibrillation atriale paroxystique est souvent initiée par des foyers localisés dans les veines pulmonaires [89]. Les cellules interstitielles de type Cajal pourraient-elle être à l'origine du déclenchement de l'activité pacemaker spontanée dans les VP? Une première réponse a été apportée chez le lapin par OV. Povstyan et al 2003 [343].

ζ. Etude de l'activité pacemaker des cellules interstitielles de type Cajal au niveau veineux

OV. Povstyan et MI. Harhun ont identifié et étudié des cellules interstitielles de type Cajal dans la veine portale de lapin [343, 366]. Ils ont observé la distribution de ces cellules dans la couche subendothéliale intramusculaire et plus largement dans la couche intramusculaire de la media (cellules musculaires lisses et tissu élastique).

Les cellules cKit(+) sont distribuées dans la paroi des veines portales de lapin à des densités différentes à la fois dans les couches sous-endothéliales et intramusculaires ; une telle

variabilité le long des veines est en adéquation avec l'hétérogénéité de l'activité contractile spontanée des différentes régions de la paroi veineuse, ce qui est fréquemment observée sur des fragments de veine isolée [367]. La proximité des cellules interstitielles de type Cajal et des cellules musculaires suggère que les cellules interstitielles de type Cajal peuvent influencer l'activité des myocytes.

De plus, MI. Harhun et al ont montré que ces cellules relarguent des substances dépolarisantes pour les cellules musculaires lisses et qu'elles peuvent créer des oscillations rythmiques de la concentration intracellulaire de calcium dans le tissu vasculaire ; ces mécanismes résultent ainsi en un relargage de calcium du reticulum sarcoplasmique. Elles peuvent donc agir comme des cellules pacemaker pour les cellules musculaires lisses vasculaires. Cette étude constitue la première démonstration de transmission du signal des cellules interstitielles de type Cajal aux cellules musculaires lisses [366].

η. Propriétés des cellules interstitielles de Cajal

De nombreuses études sur des souris mutantes dépourvues du gène du cKit ont montré l'importance de la protéine cKit dans le péristaltisme intestinal [368-369].

Depuis de nombreuses années, les cellules interstitielles de Cajal ont été largement étudiées dans le tractus gastrointestinal [370-372, 379].

Elles jouent un rôle clé dans la fonction normale de l'intestin. Un changement à leur niveau peut être le déclencheur de nombreux désordres intestinaux. Ces cellules sont ainsi associées à plusieurs pathologies dont la maladie de Hirschprung [373-374], la sténose pylorique hypertrophique de l'enfant [375-376], la pseudo-obstruction intestinale chronique myopathique [377-378]. D'après le registre PROGIST publié en février 2010, 95,3% des tumeurs mésoenchymateuses gastrointestinales sont positives pour le marqueur cKit [380].

On distingue ainsi deux principales fonctions des cellules interstitielles de Cajal :

- Source d'ondes lentes électriques spontanées pour les contractions de la musculature intestinale.
- Modulation de la neurotransmission entérique.

Les cellules interstitielles de Cajal du plexus myentérique, dont le corps cellulaire est multipolaire, seraient plutôt vouées à l'activité pacemaker, alors que les cellules interstitielles

de Cajal intramusculaires, dont le corps cellulaire est allongé, auraient surtout un rôle dans la transmission des informations et la régulation de l'activité pacemaker [351].

➤ *Activité pacemaker*

☉ Activité pacemaker dans l'intestin

La rythmicité électrique spontanée et les conductances spécialisées des cellules interstitielles de Cajal ont été démontrées dans de nombreuses études sur les cellules interstitielles de Cajal isolées et en culture [371, 381-382].

Les cellules interstitielles de Cajal agissent comme des pacemakers intestinaux et participent à la transmission des impulsions à la musculature intestinale, une transmission analogue à celle du muscle cardiaque. Elles peuvent générer des décharges spontanées connues comme étant des potentiels unitaires [383]. Elles portent également des récepteurs qui peuvent influencer l'activité pacemaker [384].

Des tissus dépourvus de cellules interstitielles de Cajal ne peuvent pas être stimulés électriquement pour générer des ondes lentes [385]. De plus, il apparaît que les cellules musculaires lisses n'expriment pas le mécanisme nécessaire pour générer les ondes lentes.

Le rôle des cellules interstitielles de Cajal est donc de dépolariser le syncytium de muscles lisses pour augmenter la probabilité d'ouverture des canaux ioniques voltage-dépendants exprimés par les cellules musculaires lisses. La dépolarisation des cellules musculaires lisses active les mécanismes d'entrée de calcium. Les cellules musculaires gastro-intestinales contiennent de nombreux canaux calcium de type L [385]. Dans certains cas, l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux calciques entraînent des potentiels d'action calciques rapides, mais dans d'autres muscles gastro-intestinaux, les canaux potassiques voltage-dépendant empêchent les cellules d'atteindre le seuil des potentiels d'action; un potentiel de plateau quasi-stable se produit résultant d'une balance entre les courants entrants et sortants. Bien que la probabilité des canaux calciques ouverts soit plus faible pendant le potentiel de plateau que pendant la phase montante d'un potentiel d'action, la longue durée d'ouverture pendant la phase plateau (jusqu' à plusieurs secondes) permet l'entrée suffisante de calcium pour activer l'appareil contractile [385]. KM. Sanders et al ont établi un modèle du

mécanisme permettant la génération des ondes lentes au niveau des cellules interstitielles de Cajal [351] (figure 43).

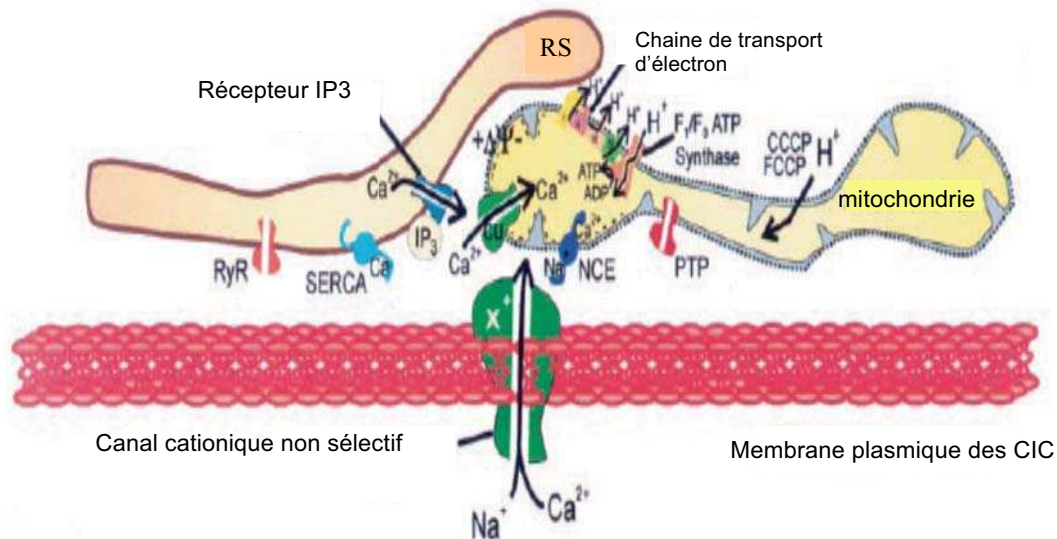


Figure 43 : Modèle de mécanisme de propagation d'ondes lentes des cellules interstitielles de Cajal (CIC). Transports calciques conduisant les courants pacemaker au niveau de la membrane des cellules interstitielles de Cajal.

Le calcium est relargué du réticulum sarcoplasmique (RS) via les récepteurs IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate). Le potentiel de membrane négatif généré par les membranes mitochondriales sert de force de conduction pour l'entrée du calcium. Ce calcium active les canaux cationiques non sélectifs dans la membrane plasmique, résultant en des courants pacemaker entrants. (NCE : Echangeur Na⁺/Ca²⁺ ; PTP : pore de transition de perméabilité ; RyR : récepteur à la ryanodine) [351].

La propagation des ondes lentes se produit à travers les réseaux de cellules interstitielles de Cajal couplés électriquement. Pour maintenir de discrètes activités électriques entre chaque organe, il existe des discontinuités dans les réseaux de cellules interstitielles de Cajal entre les organes. Quand les réseaux pacemaker sont rompus, la propagation des ondes lentes est bloquée et les évènements sont retardés de manière exponentielle dans les tissus de type muscle lisse [385].

Des enregistrements de l'activité électrique, à partir des cellules interstitielles de Cajal myentériques aux cellules musculaires lisses voisines, ont démontré que l'activité électrique se produit en premier dans les cellules interstitielles de Cajal puis initie les réponses aux cellules musculaires lisses [386]. Les cellules interstitielles de Cajal expriment des courants intérieurs et extérieurs qui sont distincts de ceux des cellules musculaires lisses du colon [387]. Les connections entre les cellules interstitielles de Cajal sont nécessaires pour la propagation régénérative d'ondes lentes. L'extension des réseaux de cellules interstitielles de

Cajal dans le septa entre les faisceaux musculaires peut fournir les voies de propagation de la transmission des ondes lentes à travers la tunique musculaire (peut être d'une manière analogue aux fibres de Purkinje dans le cœur).

☞ Différence entre l'activité pacemaker cardiaque et l'activité pacemaker des cellules interstitielles de Cajal [251].

L'activité électrique spontanée du tractus gastro-intestinal correspondant à des ondes lentes des cellules interstitielles de Cajal diffère de l'activité pacemaker cardiaque sur plusieurs aspects :

- les ondes lentes sont générées à des fréquences plus faibles (en général à 3-10 cycles/min)
- les ondes lentes ont des amplitudes plus faibles (amplitudes maxi 10-50mV)
- les ondes lentes ont des durées plus longues que les potentiels d'action cardiaque (jusqu' à plusieurs secondes).

Outre leur activité pacemaker, les cellules interstitielles de Cajal jouent également un rôle dans la transmission d'informations nerveuses.

➤ *Activité de transmission d'information nerveuse*

Les cellules interstitielles de Cajal sont ainsi supposées être une source de second messenger qui diffuse, dans les cellules musculaires proches, une source de substances sécrétrices qui régule les cellules musculaires lisses et les neurones [370].

Les cellules interstitielles de Cajal reçoivent des inputs neuronaux via des récepteurs appropriés et transforment les signaux des neurotransmetteurs en des signaux et des événements intracellulaires. Une mutation sur le gène *steel* codant le Stem Cell Factor (SCF) empêche le développement des cellules interstitielles de Cajal intramusculaires dans l'estomac [388], ainsi qu'une perte de la réponse neurale dans les muscles gastriques [389].

Les cellules interstitielles de Cajal intramusculaires sont largement et étroitement associées avec les fibres nerveuses du système nerveux entérique et forment des connections de type synapse très proche (<20nm) avec les varicosités des terminaisons nerveuses des motoneurones inhibiteurs et excitateurs [390]. Les fibres afférentes transmettent des informations mécano-réceptrices à partir de la paroi musculaire [391].

Dans les souris mutantes dépourvues de cellules interstitielles de Cajal intramusculaires, des champs de stimulation des neurones intrinsèques dans l'estomac résultent en des réponses post-jonctionnelles grandement réduites suite à la stimulation nerveuse cholinergique et nitrinergique [390, 392].

Les cellules interstitielles de Cajal peuvent inhiber ou au contraire exciter la neurotransmission [390, 393]. Les neurones cholinergiques, qui forment des appositions proches avec les cellules interstitielles de Cajal, relarguent l'acétylcholine et active la protéine kinase C via un mécanisme lié au récepteur muscarinique [394]. Ce sont surtout les cellules interstitielles de Cajal dans les couches musculaires circulaires de l'intestin qui seraient impliquées dans la régulation inhibitrice et excitatrice de l'innervation. Ceci a été démontré au niveau des sphincters du bas œsophage et pylorique par SM. Ward et al [395] et au niveau de l'iléum de rat par P. Matini et MS. Faussone-Pellegrini [396]. Les cellules interstitielles de Cajal peuvent être des effecteurs qui transduisent les signaux du monoxyde d'azote (NO) en réponses hyperpolarisantes [397]. L'innervation excitatrice se produirait via des récepteurs à la neurokinine présents sur les cellules interstitielles de Cajal [398-399].

Des études moléculaires de RT-PCR ont été réalisées à partir de cellules interstitielles de Cajal murines pour confirmer la présence de récepteurs de neurotransmission sur les cellules interstitielles de Cajal. Les récepteurs muscariniques M2 et M3 sont présents dans les cellules musculaires lisses et sur les cellules interstitielles de Cajal du tractus gastrointestinal [393, 400]. Les récepteurs à la neurokinine NK1 et NK3 sont aussi présents sur les cellules interstitielles de Cajal et les cellules musculaires lisses. Les cellules interstitielles de Cajal pourraient ainsi intervenir dans la fibrillation atriale vagale. Il a également été montré que la protéine intestinale vasoactive VIP1 est présente sur les cellules interstitielles de Cajal mais pas sur les cellules musculaires lisses alors que VIP2 est absent sur ces deux types cellulaires [401].

La modulation du courant potassique ERG dans les cellules interstitielles de Cajal dans le jéjunum de souris, via le récepteur M3, affecterait les cinétiques de l'activité pacemaker dans la musculature intestinale [402]. TW Kim et al ont montré que l'acétylcholine augmente la fréquence pacemaker dans l'estomac de souris [403]. JY Jun et al (2004) ont montré que, dans le petit intestin de souris, la noradrénaline module les courants pacemaker en diminuant la fréquence pacemaker via les cellules interstitielles de Cajal [404].

Ainsi, les cellules interstitielles de type Cajal identifiées dans cette étude peuvent posséder les propriétés nécessaires à assurer une activité pacemaker et à transmettre l'information nerveuse dans les veines pulmonaires.

θ. Rôle potentiel des cellules interstitielles de type Cajal dans la fibrillation atriale

Les cellules interstitielles de type Cajal identifiées dans les veines pulmonaires ont ainsi les mêmes caractéristiques structurales que les cellules interstitielles de Cajal de l'intestin. De part leur propriété de génération d'ondes lentes (activité pacemaker), et leur rôle dans la transmission d'information nerveuse, ces cellules peuvent jouer un rôle dans l'origine des foyers ectopiques de la fibrillation atriale dans les veines pulmonaires.

Il est connu qu'une dilatation excessive des veines pulmonaires peut déclencher des battements ectopiques anormaux dans les veines pulmonaires [405]. Le stretch mécanique peut déstabiliser l'activité électrique des veines pulmonaires en augmentant l'automaticité anormale. PR. Strega et al ont décrit un courant sodique dans les cellules interstitielles de Cajal de l'intestin qui peuvent jouer un rôle dans la génération des ondes lentes [406]. De manière intéressante, ce courant sodique peut être modulé par le stretch. Des mutations dans le gène SCN5A, codant pour le canal sodique Nav1.5, ont été identifiées comme étant impliquées dans certaines arythmies cardiaques [294, 407]. Il est ainsi tentant de supposer que le déclenchement du courant sodique dans les cellules interstitielles de Cajal peut constituer un lien entre la fibrillation atriale et le stretch des veines pulmonaires. La même conclusion peut être formulée concernant le canal ionique HCN4 qui produit le courant I_f , connu comme étant un courant pacemaker [408]. L'ouverture de ces canaux HCN4 est modulée par le stretch. W. Lin et al ont montré que ces canaux étaient impliqués dans les arythmies liées au stretch et à d'autres phénomènes de feedback mechano-électriques [409]. Le stretch des veines pulmonaires peut ainsi activer les canaux HCN4 des cellules interstitielles de type Cajal, qui peuvent en retour déclencher rapidement l'initiation de la fibrillation atriale. ZY Wang et al ont montré, à partir d'une étude d'électrophysiologie de cellules interstitielles de Cajal intestinales de souris, que le stretch membranaire potentialise l'activité pacemaker en relargant le calcium à partir des cellules interstitielles de Cajal intestinales [410].

B. Etude de l'inflammation dans la fibrillation atriale

1. Contexte

Un syndrome inflammatoire myocardique, non détecté dans le sang veineux périphérique, contribue aux désordres électriques atriaux. La présence en quantité élevée des marqueurs inflammatoires dans la circulation coronaire, atriale gauche et veineuse pulmonaire supérieure gauche est à même d'identifier et de quantifier cette anomalie.

Dans la plupart des études publiées, les patients avec fibrillation atriale ont une concentration plus élevée de marqueurs inflammatoires circulants par rapport aux contrôles. La protéine C réactive, l'interleukine 6 (IL-6), et certains composants du complément (C3 et C4) ont ainsi été décrits comme étant élevés chez les patients avec fibrillation atriale récurrente dans de nombreuses publications [239, 242-243, 411-415]. Cette protéine C réactive est produite par les hépatocytes après stimulation par les monokines pro-inflammatoires comme l'IL-6.

Ainsi, il peut être supposé que les mécanismes inflammatoires impliquant l'oreillette et/ou la région des veines pulmonaires peuvent déclencher des tachyarythmies focales et induire des changements structuraux et électriques proarythmiques qui peuvent augmenter la propension à la fibrillation atriale chez ces patients [245, 416-418].

Il est attendu que les résultats de cette analyse biologique permettent une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la fibrillation atriale et de la manière de la traiter.

2. Protocole d'étude

Il a ainsi été établi un protocole d'étude de ce phénomène inflammatoire sur la « Quantification des marqueurs de l'inflammation myocardique chez les patients avec fibrillation atriale (Etude REMI) ». Le résumé du protocole est joint en annexe 3. Ce protocole a été soumis et accepté au comité de protection des personnes de Lyon Sud Est II le 3 octobre 2007 (annexe 4). L'étude est réalisée au sein de l'hôpital cardiologique Louis Pradel de Lyon. L'investigateur principal est le Pr Philippe Chevalier. Les analyses biologiques sont réalisées au laboratoire d'immunologie au Centre Hospitalier Lyon Sud sous la responsabilité du Pr Grégoire Cozon.

Le but de cette étude est de mettre en évidence la localisation du syndrome inflammatoire myocardique chez les patients avec fibrillation atriale.

3. Plan expérimental

Il s'agit d'une étude comparative cas-témoin, entre les patients avec et sans fibrillation atriale menée pendant un an au sein de l'hôpital cardiologique de Lyon. Les groupes sont les suivant :

- Groupe 1 : Patients avec fibrillation atriale
- Groupe 2 : Patients sans fibrillation atriale (groupe contrôle, patients avec un Wolff Parkinson White, caractérisé par une transmission anormale et très rapide de l'influx électrique des oreillettes vers les ventricules due à l'existence d'une voie de conduction supplémentaire et directe entre les oreillettes et les ventricules).

➤ Population de l'essai

Pour être éligible, tout patient doit répondre aux critères d'inclusion et d'exclusion suivants :

* Critères d'inclusion

- Patients avec ou sans fibrillation atriale ;
- Homme ou femme âgé(e) d'au moins 18 ans ;
- Patient pour lequel une exploration électrophysiologique ou d'ablation est programmée ;
- Patient ayant donné par écrit son consentement informé avant le début de l'essai (annexe 5).

* Critères d'exclusion

- Femmes enceintes ;
- Antécédents de maladie pulmonaire (toute origine) ;
- Antécédents de maladie inflammatoire (tout type) ;
- Traitement anti-inflammatoire en cours ;
- FEVG < 35% ;
- Participation à tout autre essai clinique en cours.

➤ Déroulement de l'essai (figure 44)

Lorsque le patient est inclus dans l'étude, il est pris en charge par l'équipe médicale dans le cadre d'une exploration électrophysiologique ou d'ablation. Lors de l'introduction du cathéter, le premier prélèvement sanguin s'effectue à la périphérie du réseau veineux. Puis lors de l'exploration, les trois autres prélèvements seront réalisés lorsque le cathéter se trouve dans le sinus coronaire, dans l'oreillette gauche puis dans la veine pulmonaire supérieure gauche.

Le choix de la veine pulmonaire supérieure gauche est motivé par le fait de sa plus grande accessibilité. Les patients n'étant atteints d'aucune pathologie pulmonaire (critère d'exclusion), aucune variation ne doit être observée dans les dosages entre les différentes veines pulmonaires.

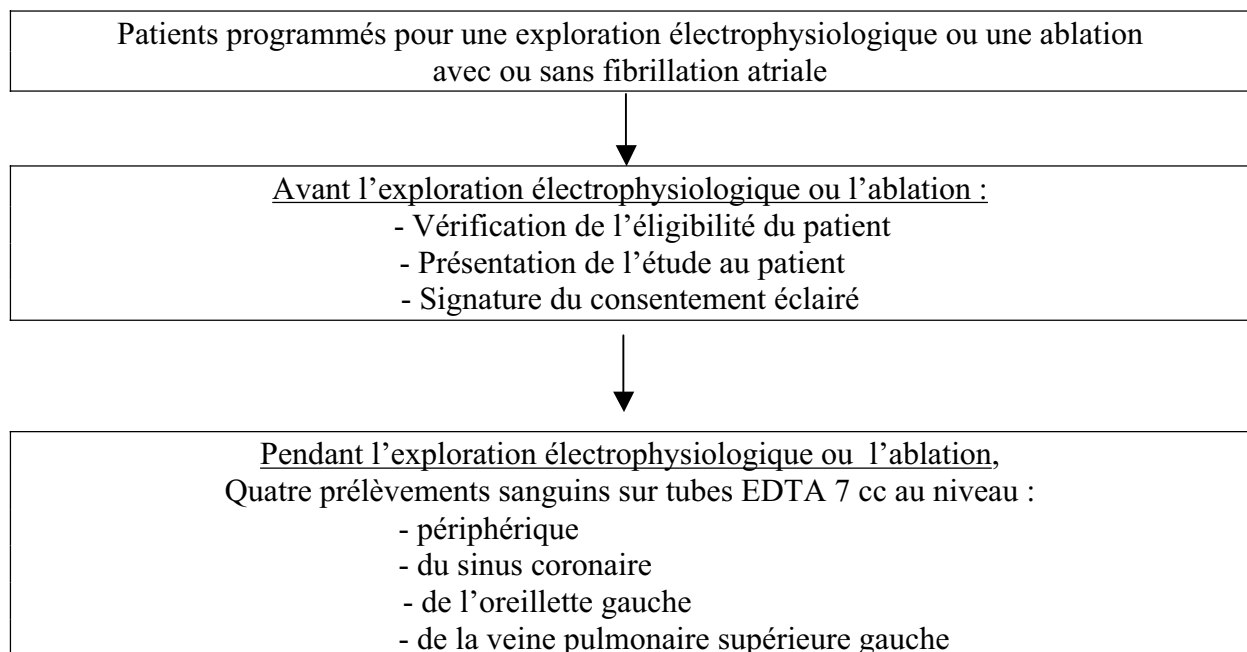


Figure 44: schéma du déroulement de l'étude REMI

4. Investigations biologiques

A partir d'une série prospective de 81 patients, il est proposé de doser les marqueurs sériques présents en cas d'inflammation systémique. Ces dosages sont réalisés dans le sang veineux périphérique et dans le sang prélevé dans le sinus coronaire, l'oreillette gauche et la veine pulmonaire supérieure gauche sur anticoagulant (EDTA).

Le dosage des cytokines et de protéines inflammatoires est réalisé par une technique ELISA ou Multiplex de Luminex. Les protéines dosées avec la méthode Luminex sont l'interleukine 1-beta (Il-1 β), l'interleukine 6 (Il-6), l'interleukine 8 (Il-8), l'interleukine 10 (Il-10), le facteur

de croissance vasculaire (VEGF), l'interféron gamma (IFN γ) et le TNF α (Tumor necrosis Factor) (R&D system). Le facteur de croissance TGF β 1 et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 soluble (sICAM-1) sont dosés par méthode ELISA standard (R&D system). Ces deux techniques de dosage reposent sur le même principe d'immunodosage en sandwich (figure 45).

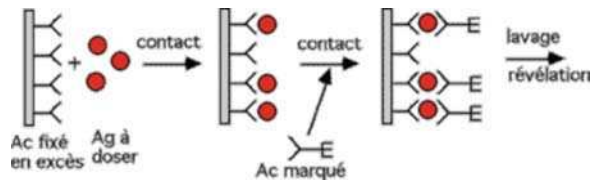


Figure 45: Principe du dosage par la technique ELISA Sandwich

- Principe de la méthode de dosage Luminex :

Cette technique permet de mesurer sur un volume très faible (50 à 100 μ l de serum) jusqu'à une dizaine de molécules. Un anticorps spécifique de la cytokine est couplé de manière covalente sur des microbilles magnétiques. Dans un premier temps, le sérum est incubé avec ces microbilles, puis une série de lavage élimine les protéines non fixées. Ensuite, les microbilles sont incubées avec l'anticorps de détection biotinylé qui est spécifique d'un épitope donné. Ceci résulte en la formation d'un sandwich d'anticorps autour de la cytokine. La détection de la cytokine est ensuite révélée par l'ajout du complexe streptavidine-phycoerythrine. Les fluorescences sont lues par les lasers du lecteur de microplaque Bio-Plex System. L'intensité de la fluorescence est relative à la quantité de molécules cibles dans l'échantillon. Les concentrations sont calculées avec le logiciel Bio-Plex manager v 4.1.1.

- Principe de la méthode de dosage ELISA :

Un anticorps monoclonal spécifique de sICAM-1 ou TGF β 1 est précoaté sur une microplaque.

Suite à l'ajout de l'échantillon ou du standard ou du contrôle, chaque ICAM-1/ TGF β 1 présent sera pris en sandwich par l'anticorps immobilisé et l'anticorps spécifique de ICAM-1/ TGF β 1. Après une série de lavage pour éliminer les molécules non fixées, une solution substrat (mélange d'hydrogène de peroxyde et de chromogène (tetramethylbenzidine)) est ajoutée. L'intensité de la coloration ainsi développée est proportionnelle à la quantité de

ICAM-1/ TGFβ1 fixée. Les intensités sont lues sur le spectrophotomètre Dynatech pour en déduire les concentrations de ces molécules dans les différents échantillons.

5. Concentrations en cytokines chez les patients en fibrillation atriale

➤ Analyses statistiques

L'étude des données des patients inclus dans les deux groupes de traitement sera effectuée en étudiant la distribution des critères relevés à l'inclusion dans les deux groupes, à savoir : les données démographiques, anamnestiques, cliniques et paracliniques. Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel SPSS 15 (SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Les variables quantitatives sont exprimées comme une moyenne +/- écart-type. Elles seront comparées par des tests t de Student.

Quand plus de deux groupes sont impliqués, les tests post hoc utilisés sont le test ANOVA pour l'analyse de variance et le test LSD (Least Significant Difference) pour la différence entre les groupes.

Les variables sont transformées en log si elles ne sont pas distribuées normalement. Les différences de proportion sont comparées avec un test de Chi². La corrélation de Pearson est utilisée pour établir des associations entre les variables continues. La régression linéaire multiple permet d'identifier les prédicteurs indépendants des niveaux sanguins de VEGF.

Une valeur est considérée significative pour une probabilité inférieure à 0.05.

➤ Données cliniques des patients inclus (tableau 8)

Comparés aux contrôles, les patients en fibrillation atriale sont plus âgés (p=0.001), ont un indice de masse corporel et une surface d'oreillette gauche plus élevés (respectivement p<0.001 et p=0.001). Les patients en fibrillation atriale ont une plus forte tendance à être traités par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou par les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (p=0.002). La durée moyenne d'histoire de fibrillation atriale paroxystique est similaire entre les patients avec fibrillation atriale persistante ou permanente (respectivement, 7.9+/-7.2 années vs 6.4+/-4.8 années, p=0.29).

	Contrôles n=9	FA paroxystique n=39	FA persistante ou permanente n=33	p-value
Age (années)	43.0±17.7	55.8±9.2	58.2±8.1	0.001
Homme	66.7%	82.1%	84.8%	0.46
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	22.2±3.5	27.1±3.4	29.2±5.2	<0.001
Hypertension	22.2%	41.0%	57.6%	0.12
Diabète	0.0%	12.8%	9.1%	0.50
Fumeur	11.1%	30.8%	33.3%	0.42
Durée de l'histoire de FA (années)	/	7.9±7.2	6.4±4.8	0.29
Traitement par statines	0.0%	23.1%	30.3%	0.16
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou antagonistes du récepteur de l'angiotensine II	0.0%	20.5%	51.6%	0.002
Surface de l'oreillette gauche (cm ²)	15.7±2.5	20.6±3.7	25.2±6.1	0.001
FA au cours du prélèvement sanguin	/	20.5%	72.7%	<0.001
Précédentes interventions d'ablation	0.1±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.39

Tableau 8: Données cliniques des patients de l'étude REMI

➤ *Analyse pilote*

Une première analyse pilote sur dix-neuf patients (quinze patients en fibrillation atriale et quatre patients avec un WPW) et portant sur les quatre sites de prélèvements (sang veineux périphérique, sinus coronaire, oreillette gauche et veine pulmonaire gauche) a révélé que seuls les niveaux de IL-8, VEGF, TGFβ et sICAM-1 variaient en fonction des différents patients. Ainsi, les dosages de IFNγ, IL1-beta, IL-6, IL-10 et TNFα n'ont pas été poursuivis pour l'étude globale. De même, les dosages effectués au niveau du sinus coronaire et de la veine pulmonaire gauche n'apportaient pas d'information complémentaire ; les prélèvements dans ces deux sites n'ont pas été poursuivis pour l'étude globale. Ainsi, seuls les dosages de IL8, VEGF, TGFβ et sICAM-1 au niveau de l'oreillette gauche et du sang veineux périphérique ont été conservés pour l'analyse complète.

➤ *Analyse globale* (article soumis en juillet 2010 à l'European Heart Journal, annexe 6)

Les patients avec et sans fibrillation atriale ont des niveaux similaires, au niveau de l'oreillette gauche et du sang veineux périphérique, de protéine C réactive, TGFβ, sICAM1 et IL-8

(tableau 7). Cette absence de différence est contradictoire avec de précédentes études qui relataient une élévation de ces molécules chez les patients en fibrillation atriale.

Les précédentes études ont montré des niveaux élevés de $TGF\beta$ sécrétés dans la fibrillation atriale chez les patients en fibrillation atriale permanente et ont montré que le stretch mécanique induit une élévation de $TGF\beta$ et de collagène dans les fibroblastes cardiaques. La voie de signalisation du $TGF\beta$ constitue un des systèmes de régulation centrale de la fibrogenèse cardiaque [422-423]. Il est suggéré que le stretch peut induire une signalisation profibrotique des fibroblastes [424]. B. Burstein et al avaient montré en 2008 que le stretch mécanique induisait la synthèse de $TGF\beta$ et de collagène dans les fibroblastes cardiaques [424]. La vulnérabilité de la fibrillation liée à la fibrose a été démontrée chez la souris par S. Verheule à partir d'un modèle de souris surexprimant au niveau cardiaque la forme constitutive de $TGF\beta 1$. Ils ont ainsi montré que les altérations de la conduction atriale induite chez ce modèle de souris étaient suffisantes pour produire un substrat à la fibrillation atriale malgré la petite taille de l'oreillette de la souris [425].

ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire 1, est une glycoprotéine transmembranaire qui joue un rôle dans la migration et l'activation des leucocytes [426-427]. Des niveaux élevés de ICAM-1 soluble (sICAM-1) ont été retrouvés dans les pathologies cardiovasculaires, le diabète de type 2, le stress oxydant, la masse graisseuse abdominale, l'hypertension [428-432]. sICAM-1 promeut l'angiogénèse et sert d'indicateur de l'activation de cellules endothéliales cellulaires ou de dommage tissulaire [433]. N. Kamiyama a montré qu'une stimulation rapide atriale de huit heures augmente l'expression de ICAM au niveau de l'endocarde atrial gauche de lapins [434]. Une augmentation de l'expression endothéliale des molécules d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) peut être un lien important entre l'initiation des mécanismes pro-inflammatoires et des mécanismes prothrombogéniques responsables de la thrombogénèse atriale [435-437].

Une expression de l'ARNm de l'interleukine-8 (IL-8) a été décrite dans des prélèvements atriaux de patients avec fibrillation atriale permanente [438].

I. Liuba et al ont investigué en 2008 la source de l'inflammation chez des patients en fibrillation atriale sans autre pathologie cardiaque associée. Ils ont étudié la concentration de

protéine C réactive, IL-6 et IL8 au niveau de la veine fémorale, de l'oreillette, du sinus coronaire et des VPSG et VPSD. Ils n'ont pas retrouvé d'élévation des niveaux plasmatiques de ces trois cytokines chez les patients avec fibrillation atriale paroxystique par rapport aux patients contrôle (WPW) [439]. Ces dernières données confirment les résultats de PT. Ellinor et al qui n'ont pas retrouvé de différence du niveau de la protéine C-réactive entre les patients contrôle et des patients avec fibrillation atriale idiopathique sans hypertension [440]. De même, chez les patients en fibrillation atriale permanente, les niveaux de protéine C réactive et d'IL-6 n'évoluent pas, alors que le niveau d'IL-8 est plus élevé dans la circulation systémique et dans le cœur mais non dans la circulation pulmonaire [412, 414, 441].

Les résultats intéressants de la présente étude sont ceux concernant les concentrations de ces cytokines dans le sang périphérique et dans l'oreillette gauche des patients en fibrillation atriale paroxystique et permanente. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Ellinor et al [440] qui ont montré que les concentrations de ces cytokines étaient plus élevées dans le sang périphérique et dans l'oreillette gauche des patients en fibrillation atriale permanente par rapport aux patients contrôle.

✧ Marqueurs de l'inflammation chez les patients avec et sans fibrillation atriale

	Patients Contrôle n=9	Patients en fibrillation atriale				
		Total n=72	p value*	FA paroxystique n=39	FA persistante ou permanente n=33	p value**
CRP (mg/L) (sang périphérique)	10.2±21.5	4.8±9.2	0.63†	4.7±10.52	5.0±7.8	0.29†
VEGF (pg/mL)						
Oreillette gauche	10.6±8.9	20.5±26.5	0.13†	25.2±32.79	15.0±14.74	0.08†
Sang périphérique	17.0±27.3	24.9±21.9	0.01†	24.1±23.33	25.8±20.36	0.04†
TGFβ (ng/mL)						
Oreillette gauche	12.3.6±8.9	16.2.2±14.8	0.69†	16.2±16.8	16.1±12.3	0.73†
Sang périphérique	23.6±27.4	18.9±16.3	0.70†	15.1±11.5	23.4±19.9	0.23†
sICAM1 (ng/mL)						
Oreillette gauche	162.7±41.7	173.4±46.8	0.52	177.4±48.8	168.7±48.7	0.59
Sang périphérique	169.7±48.6	179.2±47.3	0.57	182.8±47.5	175.0±47.5	0.67
IL-8 (pg/mL)						
Oreillette gauche	7.7±7.3	7.5±6.2	0.67†	7.8±7.04	7.0±5.01	0.81†
Sang périphérique	8.4±12.2	7.4±5.1	0.37†	6.9±3.11	8.0±6.68	0.53†

Tableau 9: Concentration des marqueurs de l'inflammation en fonction du type de fibrillation atriale (CRP : protéine C réactive ; † : non significatif)

Au contraire, on observe une relation entre le niveau de VEGF sérique et le type de fibrillation atriale (rythme sinusal, fibrillation atriale paroxystique ou fibrillation atriale permanente/persistante ; p=0.08). Les niveaux de VEGF dans le sang périphérique sont significativement plus élevés chez les patients en fibrillation atriale par rapport aux contrôles

(respectivement 24.9±21.9 pg/mL vs 17.0±27.3 pg/mL, p=0.01). L'analyse post-hoc (figure 46) montre que, comparés aux patients contrôle, les patients avec fibrillation atriale paroxystique ont tendance à avoir des niveaux sanguins de VEGF significativement plus élevés dans l'oreillette gauche (p = 0.05) et dans la circulation sanguine périphérique (p = 0.03). Les patients avec fibrillation atriale persistante ou permanente ont des niveaux de VEGF plus élevés, que les patients contrôle, dans le sang périphérique (p = 0.02) mais similaires dans la circulation sanguine de l'oreillette gauche (p = 0.38). La comparaison de patients en fibrillation atriale permanente/persistante avec les patients en fibrillation atriale paroxystique montre que, chez ces derniers, les niveaux de VEGF sont plus élevés dans l'oreillette gauche (p= 0.09) alors qu'ils restent similaires dans la circulation périphérique (p = 0.72).

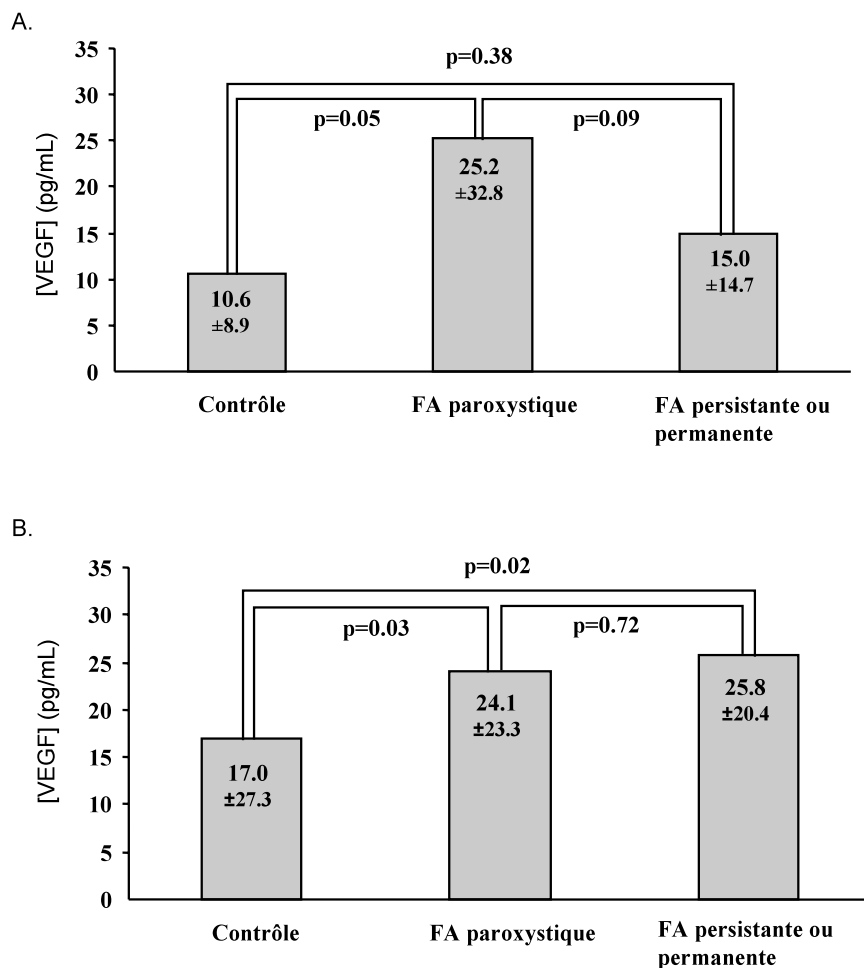


Figure 46: Niveaux sériques de VEGF, en fonction du type de fibrillation atriale, dans la circulation sanguine périphérique (A) et dans l'oreillette gauche (B).

✧ Paramètres prédictifs du niveau de VEGF

Les paramètres tels que le genre (homme/femme), l'hypertension, le diabète, le statut fumeur ou non, et la prise de traitements tels que des statines, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou des antagonistes du récepteur de l'angiotensine II ne sont pas significativement associés avec des niveaux sanguins de VEGF ni dans la circulation sanguine, ni dans l'oreillette gauche ($p > 0.10$ pour tous les paramètres). De même, l'âge, l'indice de masse corporelle et la surface de l'oreillette gauche (mesurée par échocardiographie) ainsi que la durée de l'histoire de la fibrillation atriale ne sont pas significativement corrélés avec des niveaux sanguins de VEGF ni dans la circulation sanguine, ni dans l'oreillette gauche (tous les coefficients de Pearson sont < 0.20 et $p > 0.10$). En revanche, lorsque les données sont corrélées à l'âge et au genre, la fibrillation atriale reste un prédicateur significatif de niveau de VEGF plus élevé dans la circulation sanguine périphérique ($\beta = 0.35$ en échelle logarithmique, $p = 0.02$).

✧ *Gradients intracardiaques des marqueurs de l'inflammation chez les patients en fibrillation atriale*

A partir des prélèvements de l'étude pilote (quinze patients en fibrillation atriale et quatre patients contrôle), les niveaux plasmatiques de VEGF ont été analysés dans le sang veineux périphérique, dans l'oreillette gauche, dans le sinus coronaire et dans la veine pulmonaire supérieure. Dans cette sous étude, les concentrations sériques de VEGF sont plus élevées dans le sinus coronaire et l'oreillette gauche par rapport à la concentration dans la veine pulmonaire supérieure (respectivement $p = 0.02$ et $p < 0.0001$) (figure 47). Les concentrations de VEGF dans le sinus coronaire et l'oreillette gauche sont similaires ($p = 0.93$).

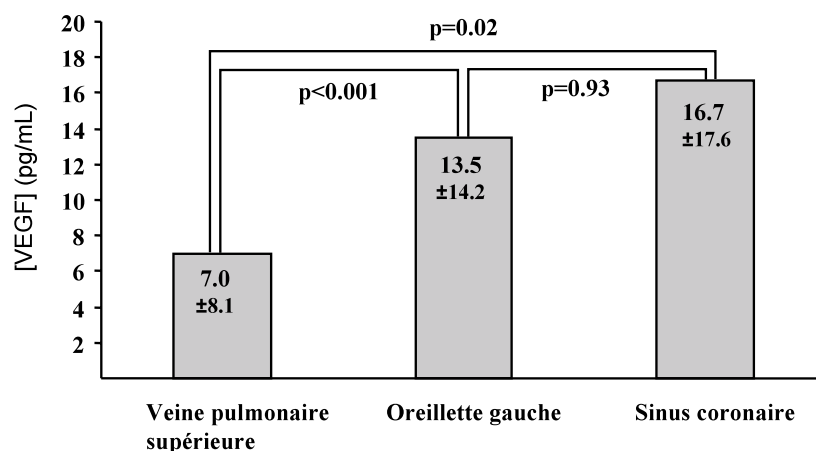


Figure 47: Concentrations sériques en VEGF dans la veine pulmonaire supérieure, l'oreillette gauche et le sinus coronaire chez des patients en fibrillation atriale.

Ainsi, cette étude montre que les niveaux de VEGF sont significativement augmentés chez les patients en fibrillation atriale et particulièrement chez les patients en fibrillation atriale paroxystique. Nous avons aussi pu montrer que la dysfonction atriale gauche peut être la cause de cette observation. Ces modifications de la concentration en VEGF peuvent être la conséquence de la présence de la fibrillation atriale et la cause de l'état prothrombotique de certains patients souffrant de cette pathologie.

Le VEGF est une cytokine pro-inflammatoire qui induit l'expression de molécules d'adhésion qui lient les leucocytes aux cellules endothéliales [442]. Il a été montré que le stretch mécanique pulsatile *in vitro* induisait une sécrétion rapide de VEGF sur des myocytes cardiaques de rat. Cette sécrétion de VEGF est principalement médiée, d'une manière autocrine, par le TGF β 1 dans les myocytes cardiaques [443]. Une corrélation a notamment en effet été décrite entre les niveaux de VEGF et TGF β 1 sériques chez des patients avec fibrillation atriale [419]. Cependant, dans cette étude, on n'a pas noté d'élévation du TGF β 1 en regard de celle du VEGF.

Plusieurs études cliniques ont reporté des niveaux élevés de biomarqueurs de la dysfonction vasculaire endothéliale chez des patients en fibrillation atriale permanente [444-445]. Dans notre étude, le niveau de VEGF est le plus élevé dans les cas de fibrillation atriale et de manière plus importante dans la forme paroxystique. Deux mécanismes distincts liés à la fibrillation atriale peuvent expliquer ce fait : le stretch et l'hypoxie. Y. Seko et al ont montré par des études de northern blot sur des cellules de la rétine que le VEGF est plus fortement augmenté lors de petites périodes de stretch (une à trois heures) et non par un stretch continu (plus de quatorze heures) [446]. En effet, une durée du stretch plus longue peut laisser le temps à la cellule de s'adapter, en modifiant soit sa morphologie, soit ses interactions avec la matrice extracellulaire. Par ailleurs, le VEGF est un puissant mitogène angiogénique sécrété notamment par les cellules exposées à l'hypoxie. Y. Seko et al ont également montré que les ARNm de VEGF et de son récepteur sont exprimés dans le tissu cardiaque et que leurs expressions sont nettement augmentées en réponse à l'hypoxie [443]. Or, l'hypoxie peut résulter de la forte consommation en énergie déployée par le tissu cardiaque en état fibrillatoire. Récemment, H. Ogi et al ont fortement suggéré qu'une forte expression du VEGF pouvait induire une surexpression des métalloprotéases MMP9 dans des conditions d'hypoxie [447]. Ces métalloprotéases sont impliquées dans la dégradation et le remodelage du tissu endommagé, notamment dans l'oreillette lors de la fibrillation atriale [448]. Ainsi, le

remodelage atrial pourrait être initié par un effet du VEGF dans les premières étapes de la fibrillation atriale.

Ainsi, le facteur tissulaire VEGF pourrait jouer un rôle de médiation dans les interactions entre la dysfonction endothéliale, l'état prothrombotique et l'état profibrotique lors de la fibrillation atriale.

C. Etude transcriptomique de la fibrillation atriale

Le transcriptome correspond à l'ensemble du contenu en ARN (acide ribonucléique) de cellule.

L'analyse transcriptomique consiste à :

- mesurer le niveau d'expression des gènes dans diverses situations (stades de développement, pathologies, ...),
- mettre en évidence des modifications dans le niveau d'expression des gènes dans ces diverses situations,
- établir des relations de cause à effet entre les différentes variations détectées et les situations physio-pathologiques.

1. Rappel sur le transcriptome

a. Du gène à la protéine

La transcription et la traduction sont les deux étapes majeures qui permettent cette transition du gène vers la protéine (figure 48).

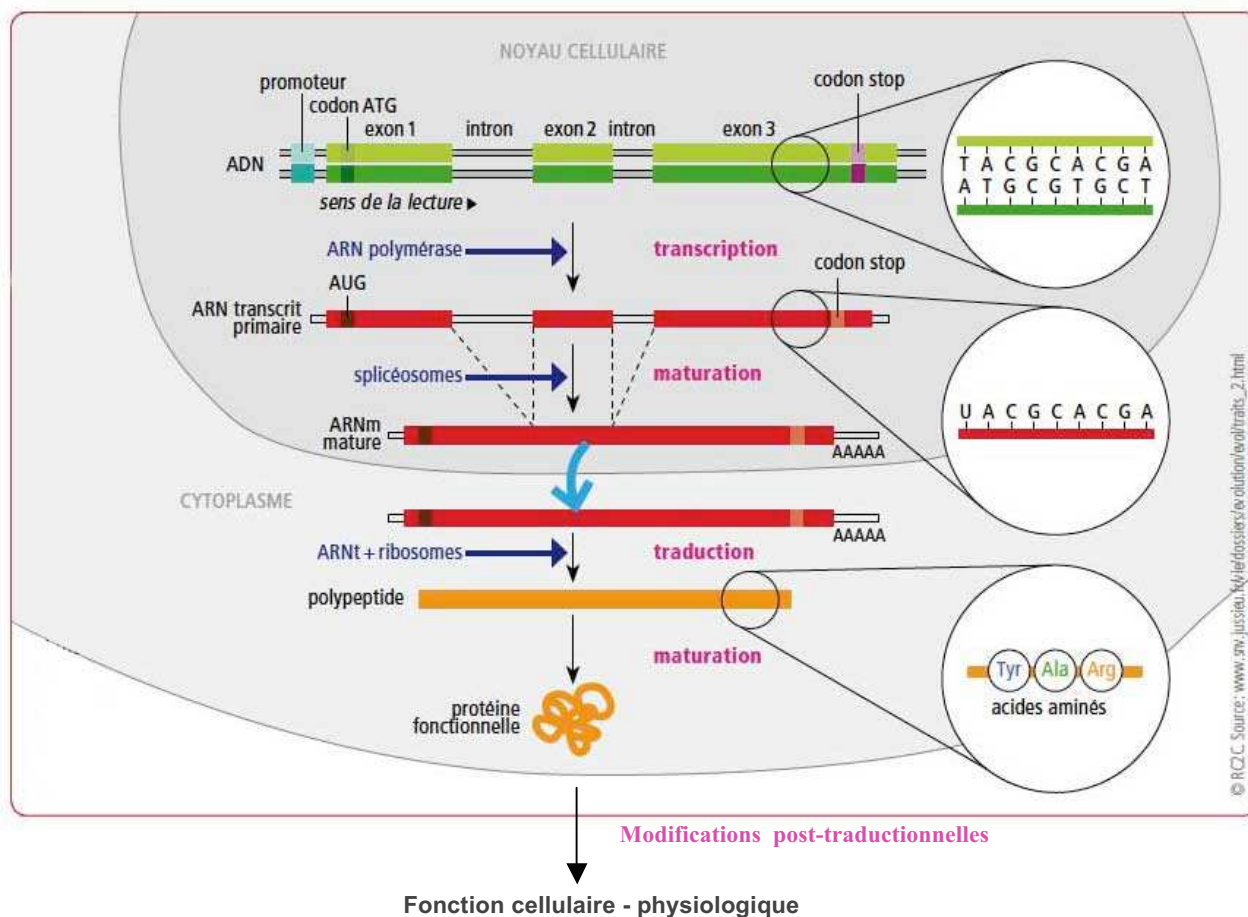


Figure 48: Mécanismes impliqués du gène à la protéine

Sous l'effet de stimuli appropriés agissant sur les séquences promotrices d'un gène, une première phase de transcription est déclenchée dans le noyau. La transcription est l'étape initiale et indispensable de l'expression génique. La collection des gènes exprimés ou transcrits de l'ADN (acide désoxyribonucléique) génomique, appelée transcriptome, est un déterminant majeur du phénotype cellulaire et de la fonction. Des ARNmessagers (ARNm) sont ainsi produits à partir de la séquence ADN du gène. Plus la stimulation des promoteurs est forte, plus le nombre de copies ARNm d'un gène sera important. Ces ARNm subissent ensuite un phénomène de maturation, l'épissage qui a pour but d'éliminer des parties introniques du gène et d'assembler les différents exons pour former l'ARNm définitif. Cet épissage est variable pour un même transcrit initial ; les introns sont toujours éliminés, mais l'assemblage des exons est variable réalisant ainsi, pour un même gène, plusieurs produits différents : il s'agit du phénomène d'épissage alternatif.

A la différence du génome, la « composition » du transcriptome est en constante modification sous l'effet des nouveaux ARNm produits et de la dégradation enzymatique d'autres ARNm.

La demi-vie d'un ARNm est brève, de quelques minutes à plusieurs jours. Le devenir des ARNm est variable :

- Dégradation précoce par des mécanismes physiologiques cellulaires,
- Interaction avec d'autres ARN dans un but de régulation,
- Traduction en protéines.

La traduction est un mécanisme cytoplasmique par lequel les ARNm sont utilisés pour produire la protéine correspondante. Un même ARNm peut être à l'origine de la création de plusieurs protéines identiques. L'ensemble des protéines présentes dans une cellule définit le protéome de cette cellule. Ces protéines subissent souvent des modifications post-traductionnelles (phosphorylation par exemple) et acquièrent ainsi leur entière capacité à exercer une fonction précise.

L'ensemble de ces fonctions exercées dans une cellule donnée, à un moment précis, définit le physiome de la cellule.

b. Etude du transcriptome

Le développement récent de la technique des puces à ADN a permis le développement de l'analyse du transcriptome, soit l'étude de l'expression de milliers de gènes dans un échantillon de tissu.

Le principe fondateur des puces à ADN est basé sur la technique d'hybridation entre des séquences complémentaires d'ADN (figure 49).

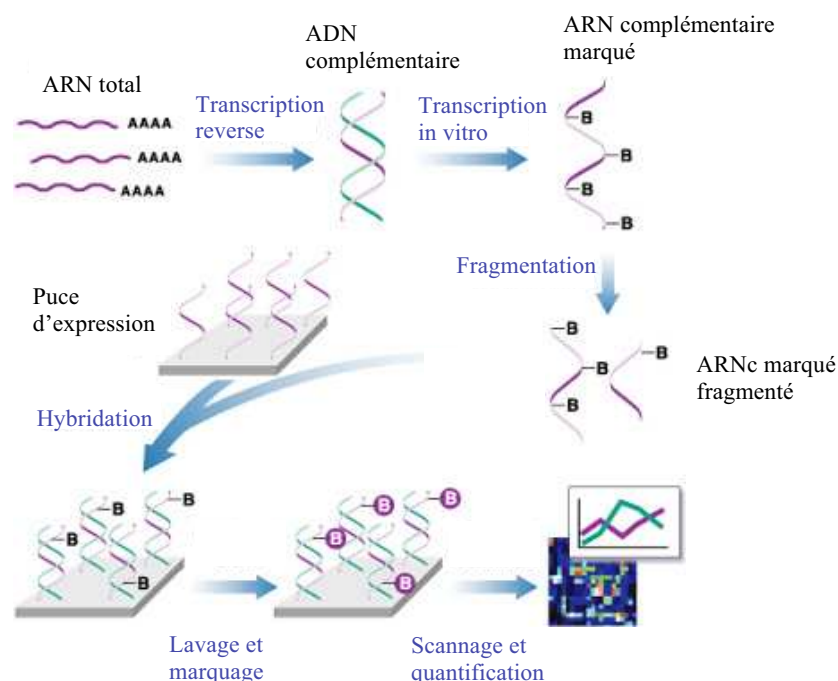


Figure 49 : Principe de l'analyse transcriptomique

La particularité des puces à ADN réside dans la miniaturisation du procédé permettant des milliers d'hybridations simultanées en utilisant une moindre quantité de matériel génétique. Une puce à ADN est constituée d'un ensemble de plusieurs centaines ou milliers de sondes nucléotidiques déposées ou synthétisées sur un support solide de quelques centimètres carrés, chaque sonde étant spécifique d'un gène ou fragment de gène déterminé (figure 50). Le paramètre interprété est le niveau d'intensité d'hybridation sur la sonde. L'achèvement du séquençage du génome humain a permis de générer des sondes pour l'ensemble du génome humain. Les progrès technologiques dans le domaine des puces permettent aujourd'hui de déposer l'ensemble de ces sondes sur un seul et même support (figure 50).



Figure 50: Puce Affymetrix hgu133p

2. Données connues sur le transcriptome des oreillettes de patients en fibrillation atriale

En 2004, R. Ohki-Kaneda et al ont établi le profil transcriptionnel des gènes modulant l'oreillette de patients en fibrillation atriale à partir de prélèvement d'oreillette droite de dix-sept patients (dix patients fibrillation atriale et sept en rythme sinusal). Ils ont permis de mettre en évidence 33 gènes spécifiques de la fibrillation atriale qui sont significativement activés (>1.5-fold). Ces gènes sont principalement associés aux fonctions de canal ionique, d'antioxydant, de l'inflammation, du cycle de croissance cellulaire, de la transcription, et de la signalisation cellulaire. Au contraire, 63 gènes spécifiques du rythme sinusal impliqués dans la communication cellulaire, la respiration cellulaire, la production d'énergie, la croissance

cellulaire, ont été mis en évidence. Ainsi, dans leur étude, une centaine de gènes sont modulés dans l'oreillette des patients en fibrillation atriale [449].

MS. Kharlap et al ont également réalisé une étude transcriptomique du tissu atrial de douze patients avec fibrillation atriale et dix patients sans fibrillation atriale. Ils ont montré que 39 gènes étaient différentiellement exprimés dont les plus grandes altérations portaient sur le gène d'un récepteur nucléaire (*nor1*), un gène suppresseur de tumeur (*dec1*), le gène de la septine 9 (*msf*), et un gène régulateur de l'apoptose (*bcl2A1*) (fold change de 5 à 28) [450].

Il a également été suggéré dans l'étude de AS. Barth et al qu'il se produisait une reprogrammation du transcriptome du tissu atrial chez les patients avec fibrillation atriale persistante [451]. La fibrillation atriale est associée à une augmentation de l'expression des isoformes de la myosine ventriculaire dans le myocarde auriculaire, considéré comme faisant partie d'un processus de dédifférenciation. En revanche, il n'est pas connu si la réexpression des isoformes ventriculaire dans la fibrillation atriale est limitée à des transcrits codant pour des protéines contractiles. Dans cette étude, 1434 gènes ont été identifiés comme étant dérégulés dans le myocarde atriale en fibrillation atriale. La majorité de ces gènes correspondent aux éléments clés des voies de signalisation dépendante du calcium. Ils ont aussi démontré pour la première fois une régulation positive des transcrits impliqués dans les activités métaboliques dans le myocarde en fibrillation atriale. Les gènes dominants dans le ventricule sont cinq fois plus susceptibles d'être sur-exprimés en cas de fibrillation atriale (174 gènes sur-exprimés à la hausse, 35 gènes sous-exprimés), alors que les transcrits atriaux spécifiques étaient majoritairement sous-exprimés (56 gènes surexprimés, 564 gènes sous-exprimés). Globalement, dans le myocarde en fibrillation atriale, les gènes dont les classes fonctionnelles sont plus caractéristiques du myocarde ventriculaire ont été jugés comme étant sur-exprimés (par exemple, les processus métaboliques), tandis que les voies de signalisation majoritairement exprimées dans le myocarde atrial ont été inhibée (par exemple, la transduction du signal et la communication cellulaire). Par conséquent, il semblerait qu'une caractéristique générale de l'oreillette en fibrillation soit une dédifférenciation des éléments ventriculaires [451].

3. Analyse du profil transcriptomique de tissus cardiaques de patients en fibrillation atriale

Six prélèvements cardiaques de la banque de tissus cardiaques conservés en tube sec à -80°C sont étudiés. L'analyse se déroule au sein de la plateforme ProfileXpert (Bron, France).

a. Données cliniques

Trois prélèvements sont issus de patients avec antécédent de fibrillation atriale et trois de patients sans antécédent de fibrillation atriale. Quatre de ces prélèvements sont issus de tissus d'oreillette gauche et deux de jonction oreillette gauche – veine pulmonaire. La répartition de ces prélèvements est résumée dans le tableau 10.

N° Patient	Localisation du prélèvement	Age patient	Sexe	Fibrillation atriale	Antécédents cardiovasculaires / facteurs de risque
A	OG	61	F	Non	RVM
B	Jonction OG-VP	62	H	Non	RVM
C	Jonction OG-VP	37	H	Non	Aucun
D	OG	66	H	Oui	DAVD
E	OG	56	H	Oui	Plastie mitrale, HTA, diabète
F	OG	66	F	Oui	RVM+RVA

Tableau 10: Tableau récapitulatif des échantillons analysés en transcriptomique (OG : oreillette gauche ; VP : veine pulmonaire ; RVM : remplacement de valve mitrale ; RVA : remplacement de valve aortique ; HTA : hypertension artérielle, DAVD : dysplasie arythmogène du ventricule droit)

b. Protocole d'étude

Les coupes de tissus sont broyées au Fastprep et soumis à l'action de la protéinase K pour digérer les protéines. Les ARN totaux sont ensuite extraits de manière classique sur colonnes Qiagen avec action de la DNase I. Les ARNt sont ensuite dosés par Nanodrop. La qualité est ensuite vérifiée par profil Agilent. Une amplification simple de 100ng d'ARN total est ensuite réalisée avec le kit GeneChip 3'IVT Express (Affymetrix). Les ARNc sont ensuite dosés par Nanodrop. La qualité est ensuite vérifiée par profil Agilent. 15µg d'ARNc sont ensuite fragmentés et hybridés sur puce GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 Array (Affymetrix). Les données sont normalisées par le logiciel « expression console » (Affymetrix). L'analyse des données est réalisée avec le logiciel Ingenuity.

c. Fonctions biologiques et gènes impliqués dans la fibrillation atriale

L'analyse du transcriptome est effectuée en comparant les prélèvements (oreillette gauche et jonction OG-VP) de patients sans fibrillation atriale et de patients avec fibrillation atriale : soit, les patients A, B, C vs les patients D, E, F.

Cette première étude statistique avec un test de student (p -value < 0.05 et un fold change > 1.5) révèle que 268 gènes sont différentiellement exprimés entre les patients avec fibrillation atriale et les patients sans fibrillation atriale. Parmi ces 268 gènes, 157 sont sous-exprimés et 111 sont sur-exprimés. Chez les patients en fibrillation atriale, cette majorité de sous-expression génétique confirme l'observation de AS. Barth et al qui retrouve la même orientation de dérégulation [451].

Les principales fonctions associées dont l'expression de gènes est modifiée chez les patients en fibrillation atriale sont :

- 1/ Mort cellulaire, développement cellulaire, croissance et prolifération cellulaire.
- 2/ Mouvement cellulaire, morphologie cellulaire.
- 3/ Métabolisme lipidique, maladies cardiovasculaires.
- 4/ Expression génique.
- 5/ Interaction et signalisation cellule-cellule, fonction et développement du système nerveux, maladies inflammatoires.

L'analyse des principaux gènes dérégulés (tableau 11) montre que les fonctions modifiées impliquent plus spécifiquement :

- le développement cardiaque.
- l'inflammation.
- la contraction des muscles lisses.
- le contrôle β -adrénergique.
- la régulation de la voie calcique.
- la voie de transmission des signaux (exocytose).
- la voie métabolique (désordre du système endocrine et du diabète).

On peut noter (tableau 12) que les principaux gènes impliqués ont plutôt une tendance à être sous-exprimés. En effet, les valeurs absolues du fold-change des gènes sous-exprimés sont

plus élevées que celles des gènes sur-exprimés. Il semble que la fibrillation atriale soit plus liée à une perte d'expression de certains gènes.

Tableau 11: Biofonctions dérégulées chez les patients en fibrillation atriale (© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.)

Fonction	p-value	Principales molécules dérégulées	Nombre total de molécules
Désordres musculaires et squelettiques	6,65E-03	AMPH, ANKRD2, APOB, CAPN3, CCL18, FAM5C, FHL2, GNB5, GPR83, LPL, MYL3, MYOT, PDGFRL, PITX2, STEAP4, TNNT3, TRPV1	56
Désordres inflammatoires	1,42E-02	ADRB1, AMPH, APOB, CAPN3, CCL18, DTX4, FAM5C, ORC5L, PDGFRL, PITX2, PTGFR, SMAD9, STEAP4, TNNT3, TRPV1, VWF, WFDC1, WT1	54
Désordres cardiovasculaires	1,01E-03	ABCC9, ADRB1, AMPH, APOB, CHRN3, EGLN3, FAM5C, JAK2, KCNE1, LPL, MYL3, PTGFR, TRPV1, VWF, ZNF385D	50
Désordres du système endocrinien	1,30E-02	ABCC9, ADRB1, AMPH, APOB, CHRN3, JAK2, LPL, PDGFRL, PITX2, PTGFR, TNNT3, TRPV1, VASH2, VWF, WFDC1, ZNF385D	46
Artériosclérose	2,18E-02	ADRB1, AMPH, APOB, FAM5C, LPL, ZNF385D	26
Migration des cellules eucaryotes	7,92E-03	CCL18, FAM5C, FHL2, JAK2, MYLK3, PITX2, TRPV1, VTN, VWF	25
Désordre hématologique	1,68E-02	ABCC9, ADRB1, AMPH, APOB, CAPN3, EGLN3, JAK2, L1CAM, ORC5L, VWF, WT1	19
Adhésion de cellules	1,81E-02	JAK2, PITX2, VTN, VWF	18
Développement du tissu	2,26E-02	CAPN3, JAK2, LMO4, MYL3, OSR1, PITX2, WT1	17
Modification de la forme cellulaire	4,09E-03	PITX2, PTGFR, VTN, VWF, 1	15
Survie de lignées cellulaires	9,81E-03	CASP9, JAK2, , VTN, WT1	14
Expression génique/Trans-activation	2,07E-02	FHL2, GATA5, LMO4, PTGFR, , WT1	14
Morphogenèse des cellules	9,14E-03	PITX2, VTN, VWF,	13
Différenciation de lignées cellulaires	2,25E-02	ADRB1, EGLN3, FHL2, JAK2, PITX2, WT1	13
Fixation des cellules	2,52E-02	ESM1, FHL2, JAK2, LPL, VTN, VWF	12
Désordres cardiovasculaires chez les mammifères	5,75E-03	ADRB1, APOB, EGLN3, LPL, PTGFR, TRPV1, VWF	11
Processus neurologiques de cellules eucaryotes	7,91E-04	ADRB1, JAK2, KCNE1, TRPV1	10
Dégradation de protéines	1,05E-02	CAPN3, VTN	10
Neurotransmission	1,65E-02	AMPH, CAV2, CHRN3, KCNE1, TRPV1	9
Organisation du cytosquelette	2,32E-04	FHL2, VTN, VWF	8
Processus cardiovasculaire de vaisseaux sanguins	9,87E-03	ABCC9, GATA5, TRPV1	8
Processus développemental de cellules épithéliales	2,47E-02	FHL2, KCNE1, LMO4, WT1	8

Tableau 12: Principaux gènes dérégulés dans le tissu atrial/veine pulmonaire chez les patients en fibrillation atriale. (En vert : downrégulation ; en rouge : uprégulation)

Gene (symbole)	Titre du gène	FoldChange(FA vs. Non FA)	Description de la fonction de la protéine
<i>pitx2</i>	paired-like homeodomain 2	-52,3016	Membre de la famille homeobox ⁵ RIEG/PITX. La protéine est un facteur de transcription qui régule l'expression du gène de la collagène lysyl hydroxylase. Elle est aussi impliquée dans la détermination de l'asymétrie gauche-droite au cours du développement.
<i>dhrs9</i>	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	-14,1899	La protéine joue un rôle dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque qui est important pour le développement cardiaque et la différenciation en cellule musculaire adulte.
<i>cc118</i>	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	-11,7322	Cytokines impliquées dans les processus d'immunorégulation et inflammatoires. Elle attire les lymphocytes T naïfs vers les cellules dendritiques et active les macrophages.
<i>myot</i>	myotilin	-10,2028	Il s'agit d'une protéine du cytosquelette qui joue un rôle significatif dans la stabilité des filaments fins au cours de la contraction cardiaque. Elle est impliquée dans l'assemblage des myofibrilles et dans la stabilité des disques Z dans les cellules musculaires.
<i>gata5</i>	GATA binding protein 5	-6,02841	Facteur de transcription pouvant être impliqué dans l'établissement de la diversité cellulaire des muscles lisses cardiaques.
<i>vash2</i>	vasohibin 2	-5,66436	Inhibiteur de l'angiogénèse ⁶ . Il inhibe la formation du réseau par les cellules endothéliales.
<i>osr1</i>	odd-skipped related 1 (Drosophila)	-4,61468	Facteurs de transcription largement exprimés au cours du développement embryonnaire. Essentielle pour la différenciation du mésoderme intermédiaire. Un manque de OSR1 peut induire le développement vasculaire dans le rein [363].
<i>ptgfr</i>	prostaglandin F receptor (FP)	-4,1683	Membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Cette protéine est un récepteur pour la prostaglandine F _{2α} , un agent lutéolytique. Il est impliqué dans la contraction des muscles lisses notamment au niveau de l'utérus.
<i>lrr1q3</i>	leucine-rich repeats and IQ motif containing 3	-3,54559	
<i>znf385D</i>	zinc finger protein 385D	-3,39117	Impliqué dans la régulation transcriptionnelle

⁵ Un homeobox est une séquence ADN que l'on retrouve dans les gènes impliqués dans le contrôle du développement (morphogénèse).

⁶ L'angiogénèse est un processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Il semble que l'angiogénèse soit contrôlée par différents activateurs et inhibiteurs produits par les cellules saines et tumorales. Les régulateurs principaux étant les « Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) » et les « Fibroblast Growth Factor (FGF) ».

<i>capn3</i>	calpain 3, (p94)	-3,29705	Protéase intracellulaire majeure dont la fonction n'est pas encore bien établie. Ce gène code pour un membre des calpaïnes ⁷ spécifiques du muscle, qui se lie à la titine ⁸ . Son activité est dépendante du calcium et est présente de manière ubiquitaire. Plusieurs fonctions sont associées à ces endopeptidases dont le remodelage des attachements du cytosquelette à la membrane plasmique au cours de la fusion cellulaire ou la motilité cellulaire, les modifications protéolytiques des molécules dans les voies de transduction du signal, la dégradation du substrat dans la voie apoptotique,
<i>ahnak2</i>	AHNAK nucleoprotein 2	-3,12737	Cette protéine est suggérée comme jouant un rôle dans le contrôle beta-adrénergique de I _{CaL} [364]
<i>wfdc1</i>	WAP four-disulfide core domain 1	-3,03867	Gène suppresseur de tumeur
<i>znf709</i>	zinc finger protein 709	-2,97168	Impliqué dans la régulation transcriptionnelle
<i>rims3</i>	regulating synaptic membrane exocytosis 3	-2,90353	Régulation de l'exocytose membranaire synaptique
<i>pdgfrl</i>	platelet-derived growth factor receptor-like	-2,80938	Protéine ayant des similitudes de séquence avec le domaine de liaison du ligand du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF. Il peut donc être impliqué dans la réorganisation du cytosquelette.
<i>steap4</i>	STEAP family member 4	-2,80849	Métalloréductase jouant un rôle dans l'homéostasie métabolique, les processus inflammatoires et les réponses métaboliques. Elle régule les cytokines inflammatoires et inhibe la prolifération cellulaire.
<i>amph</i>	amphiphysin	-2,79355	La protéine participe aux mécanismes de régulation de l'exocytose au niveau des synapses et de certains types de cellules endocrines. Elle contrôle les propriétés de la membrane associée au cytosquelette.
<i>ccr10</i>	chemokine (C-C motif) receptor 10	-2,77871	Les chemokines jouent un rôle fondamental dans le développement, l'homéostasie, et la fonction du système immunitaire. Elles ont aussi des effets sur les cellules du système nerveux central aussi bien que sur les cellules endothéliales. Elle peut transduire un signal en augmentant le niveau d'ions calcium intracellulaire et stimuler la chimiotaxie des cellules pré-B.

⁷ Ces enzymes sont responsables de la protéolyse neutre calcium-dépendante

⁸ La titine est une protéine élastique impliquée dans le contrôle de l'assemblage des protéines sarcomériques ; elle régule l'élasticité du sarcomère. Dans le muscle, elle est liée aux filaments épais (de myosine), et s'étend de la strie Z à la bande M. Après la myosine et l'actine, la titine est la protéine la plus abondante dans le muscle strié, représentant quelque 10% de la masse myofibrillaire.

<i>lingo1</i>	leucine rich repeat and Ig domain containing 1	-2,77444	La protéine est impliquée dans l'inhibition de la régénération axonale par les facteurs associés à la myéline. C'est un régulateur négatif de la différenciation des oligodendrocytes ⁹ et de la myélination ¹⁰ axonale.
<i>lpl</i>	Lipoprotéine lipase	2,28912	Cette lipoprotéine lipase est exprimée dans le cœur, les muscles et le tissu adipeux. Sa fonction primaire est d'hydrolyser les triglycérides des chylomicrons et des lipoprotéines de très faible densité circulants.
<i>tnni3k</i>	Kinase interagissant avec TNNI3	2,29574	La protéine joue un rôle dans la physiologie cardiaque.
<i>abcc9</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	2,3744	La protéine correspond à une sous-unité de canaux potassiques sensibles à l'ATP (K _{ATP}). Elle peut former des canaux K _{ATP} de type cardiaque et de type musculaire lisse avec Kir6.2.
<i>tnnt3</i>	troponin T type 3 (skeletal, fast)	2,41483	La troponine T est la sous-unité de liaison à la tropomyosine qui confère la sensibilité au calcium de l'activité ATPase des muscles striés. La liaison du calcium initie le processus de contraction musculaire.
<i>adrb1</i>	adrenergic, beta-1-, receptor	2,42856	Récepteur adrénergique β1 localisé au niveau du système nerveux central, du cœur, des artères coronaires, des muscles du rein. Il est impliqué dans la stimulation cardiaque, la vasodilatation coronaire et la relaxation du colon et de l'œsophage.
<i>gpr83</i>	G protein-coupled receptor 83	2,47927	La protéine peut être un récepteur du neuropeptide Y
<i>tmem164</i>	transmembrane protein 164	2,50031	
<i>chrb3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 3	2,53234	Récepteur cholinergique nicotinique. Après la liaison avec l'acétylcholine, le récepteur change de conformation aboutissant ainsi à l'ouverture des canaux ioniques à travers la membrane plasmique. Les récepteurs nicotiniques localisés aux jonctions neuromusculaires des muscles somatiques sont responsables de contraction musculaire.
<i>smad9</i>	SMAD family member 9	2,58432	Transducteur du signal à partir des membres de la superfamille du TGFβ, qui régule la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le développement.
<i>orc5L</i>	origin recognition complex, subunit 5-like (yeast)	2,60208	Protéine complexe essentielle pour l'initiation de la réplication de l'ADN dans les cellules eucaryotes.
<i>wtl</i>	Wilms tumor 1	2,67888	Facteur de transcription jouant un rôle dans le développement cellulaire et la survie cellulaire.

⁹ Variété de cellules gliales de petites dimensions. Elle a un rôle essentiel dans la formation de la myéline au niveau du système nerveux central servant à augmenter la vitesse de propagation des influx nerveux.

¹⁰ Formation de la myéline autour d'une fibre nerveuse. La myéline est une substance qui isole et protège les fibres nerveuses. Cette matière lipidique grasseuse blanchâtre, augmente de façon considérable la vitesse de propagation de l'influx nerveux et décuple les réflexes. Elle permet une bonne conduction des stimuli nerveux d'une partie du corps à une autre.

<i>dtx4</i>	deltex homolog 4 (Drosophila)	2,68464	La protéine régule la voie de signalisation impliquant les communications intercellulaires qui régulent un large spectre de détermination adipeuse des cellules.
<i>egl3</i>	egl nine homolog 3 (C. elegans)	2,6897	La protéine joue un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire des cellules musculaires et dans l'apoptose du tissu nerveux. Elle promeut la mort cellulaire via un mécanisme dépendant des caspases ¹¹
<i>jak2</i>	Janus kinase 2	3,16866	Protéine tyrosine kinase impliquée dans les voies de signalisation de cytokines
<i>myl3</i>	myosin, light chain 3	3,3815	Chaîne légère de la myosine 3 référée comme une isoforme ventriculaire et une isoforme du muscle squelettique lent. La myosine est impliquée dans la contraction musculaire en interaction avec les filaments fins d'actine, créant ainsi une force contractile. Elle est notamment régulée par une kinase et par les concentrations intracellulaires de calcium.
<i>esm1</i>	endothelial cell-specific molecule 1	3,74686	La protéine est principalement exprimée dans les cellules endothéliales des poumons et des reins. Son expression est régulée par les cytokines, jouant ainsi un rôle dans les désordres pathologiques liés à l'endothélium en interagissant entre les cellules endothéliales et les leucocytes.
<i>mum1L1</i>	melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1	3,85141	
<i>ankrd2</i>	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)	4,32666	La protéine appartient à la famille des protéines Ankyrine musculaire (MARPs). Leur expression est induite dans les cas de réponse au stress physiologique et en cas d'hypertrophie.
<i>fhl2</i>	four and a half LIM domains 2	4,40767	Les protéines LIM constituent une famille de molécules régulatrices. dont la fonction principale est de diriger les interactions protéine-protéine. elles sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, ainsi que dans la régulation de la transcription
<i>c5orf23</i>	chromosome 5 open reading frame 23	6,2022	

¹¹ Groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation.

L'analyse de ces tableaux permet de mettre en évidence des gènes dérégulés dont la fonction semble intéressante dans l'initiation de la fibrillation atriale.

➤ **Morphogénèse cardiaque**

Un gène se démarque particulièrement : le gène *pitx2*. Ce gène est fortement sous-exprimé d'un facteur de fold-change de 52, ainsi l'expression de ce gène est 52 fois moins élevée chez les patients en fibrillation atriale. En fait, son expression génique est totalement absente chez les patients avec fibrillation atriale. Cette protéine PitX2 agit comme un facteur de transcription et régule notamment l'expression génique de la procollagène lysyl hydroxylase, une enzyme nécessaire à la formation et à la stabilisation du collagène.

Pitx2 comprend trois isoformes majeures (*Pitx2a*, *b*, *c*) et une mineure (*Pitx2d*). L'isoforme *Pitx2c* est spécifique du tissu cardiaque. Le gène *pitx2* est notamment impliqué dans le développement des yeux et du cœur.

Des mutations dans le gène *pitx2* ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Axenfeld-Rieger, syndrome caractérisé par des anomalies oculaires, l'absence de certains muscles oculaires, une saillie du globe oculaire, un hypertélorisme, une hydrocéphalie communicante, une dysmorphie faciale et des anomalies squelettiques). Certains de ces patients ont développé des anomalies cardiaques, telles que des défauts au niveau du septum atrial et des anomalies valvulaires. Cependant, il n'a pas été établi de lien entre *pitx2* et la fibrillation atriale chez ces patients.

Le gène *pitx2* est également essentiel pour l'établissement de l'asymétrie droite-gauche qui sépare les circulations systémique et pulmonaire vitales pour la fonction cardiaque normale. Le gène *pitx2* est nécessaire pour la juxtaposition correcte du tissu inductible dans le myocarde pulmonaire. En effet, les gènes *pitx2* et *nkx2-5*, contenant des domaines homeobox, sont les deux gènes clés dans le développement du myocarde pulmonaire. MT. Mommersteeg et al ont notamment montré qu'une faible quantité de *Nkx2-5* permet la formation du myocarde pulmonaire. Cependant, l'identité du myocarde pulmonaire est alors modifiée et prend plutôt un phénotype de type sino-veineux (donc plutôt de type nodal) avec une perte de l'expression de connexines 40 et une expression ectopique de *HCN4* [219].

La voie de signalisation régulant l'asymétrie droite-gauche est initiée lors de l'étape embryonnaire presomite¹² et est médiée en grande partie par la signalisation nodale. Le gène *pitx2c* est ainsi une cible directe du pathway Nodal, un membre de la superfamille des TGFβ

¹² Etape correspondant à la phase embryonnaire avant le jour 19 chez l'homme.

[452]. Les études de génome entier ont identifié des variants sur le chromosome 4q25 fortement associé avec un risque accru de fibrillation atriale dans plusieurs études de population [196, 453-455]. Les variants identifiés dans cette région du chromosome 4 sont fortement associés à des cas de fibrillation atriale diagnostiqués avant l'âge de 60 ans et à des récurrences de cette arythmie après une chirurgie d'ablation par radiofréquence [454]. Ces variants de séquence ont été retrouvés à proximité du gène *pitx2*, ce qui suggère que *pitx2* pourrait être le locus de la fibrillation atriale dans cette région. Il joue également un rôle critique, avec *nkx2-5*, dans le développement du manchon myocardique dans les veines pulmonaires [219]. LH. Boldt et al ont identifié, au sein d'une population, cinq variants introniques dans le gène *pitx2* n'ayant aucune répercussion au niveau transcriptomique. Cependant, aucune association avec la survenue de fibrillation atriale n'a pu être mise en évidence [322].

J. Wang et al ont alors montré, par des études de knockin chez la souris, que *Pitx2c* était exprimé dans l'oreillette gauche et la veine pulmonaire dans la période postnatale immédiate [456].

Des études électrophysiologiques chez la souris sauvage et la souris hétérozygote *Pitx2*^{null+/-} n'ont pas montré de différences sur l'électrophysiologie de base. Aucun épisode de fibrillation atriale spontanée n'a été détecté. En revanche, des épisodes de stimulation déclenchent des arythmies atriales plus fréquentes chez la souris *Pitx2*^{null+/-} (6souris /6) que chez la souris sauvage (1souris /4) (test Fisher, P=0.033) [456].

L'analyse microarray des cœurs de ces souris a montré chez les mutants *Pitx2*^{null} une sur-expression des gènes du nœud sino-atrial *shox2* et *tbx3* ainsi que de plusieurs canaux potassiques dont *kcnq1* et *knck2*, un canal potassique dont l'ouverture est dépendante du stretch. Le gène *pitx2* régulerait la location précise du nœud sino-atrial en inhibant *shox2*, un régulateur transcriptionnel du programme génique du nœud sino-atrial [456].

Ils ont également montré une légère sur-expression du gène *hcn4*, impliqué dans l'automatisme du nœud sino-atrial, dans la veine cave supérieure gauche qui exprime aussi *pitx2c*. Chez les embryons mutants *Pitx2*^{null-/-}, l'anatomie de la jonction entre les veines et l'oreillette est interrompue et le marqueur HCN4 est exprimé continuellement au niveau de cette jonction oreillette gauche -veine anormale et dans la paroi de l'oreillette gauche chez les embryons *Pitx2*^{null-/-} et *Pitx2*^{null+/-} [456].

J. Wang et al ont ainsi conclu que *pitx2c* est un gène important jouant un rôle dans la susceptibilité aux arythmies atriales. *Pitx2* réprime normalement le programme pacemaker dans l'oreillette gauche. *Pitx2* étant exprimé fortement au cours de l'embryogénèse et au cours de la période post-natale, le substrat arythmogénique semble être établi précocement au cours de la vie. La perte de fonction de *Pitx2c* promouvrait l'automatisme ectopique dans l'oreillette gauche. Dans des conditions normales, l'oreillette gauche semble protéger de la génération d'impulse ; le mutant *Pitx2^{null+/-}*, et ainsi la downrégulation de l'ARNm de *pitx2*, au niveau de l'oreillette gauche fournirait un substrat arythmogénique qui renforcerait d'autres déclencheurs pathologiques des arythmies atriales [456].

➤ Régulation du courant potassique

☉ Cytosquelette musculaire

Deux gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette musculaire sont fortement surexprimés chez les patients en fibrillation atriale : le gène *ankrd2* (+ 4.3) codant pour l'ankyrine 2, et le gène *fhl2* (+ 4.4) codant pour des domaines de la protéine LIM.

L'ANKRD2 est une protéine sarcomérique dans la strie I [457-459] qui est impliquée dans l'hypertrophie du muscle squelettique (figure 51). Il a été montré que le gène *ankrd2* est significativement surexprimé en réponse à un stress mécanique prolongé [457] aussi bien qu'à la dénervation [460]. *Ankrd2* est principalement exprimée dans le cœur adulte et le cœur fœtal [461-463]; son expression serait restreinte aux ventricules bilatéraux, à l'apex et au septum interventriculaire [459, 464]. La protéine est up-régulée lors de la différenciation des myoblastes [465]. L'ankyrine 2 est liée au stretch [466]. Cependant, aucune donnée n'a été publiée sur une relation entre le gène *ankrd2* et la fibrillation atriale.

Une étude de ND. Epstein et JS. Davis [467] souligne l'importance du disque Z dans l'hypertrophie induite par le stretch, particulièrement dans le cœur. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore élucidés (figure 51).

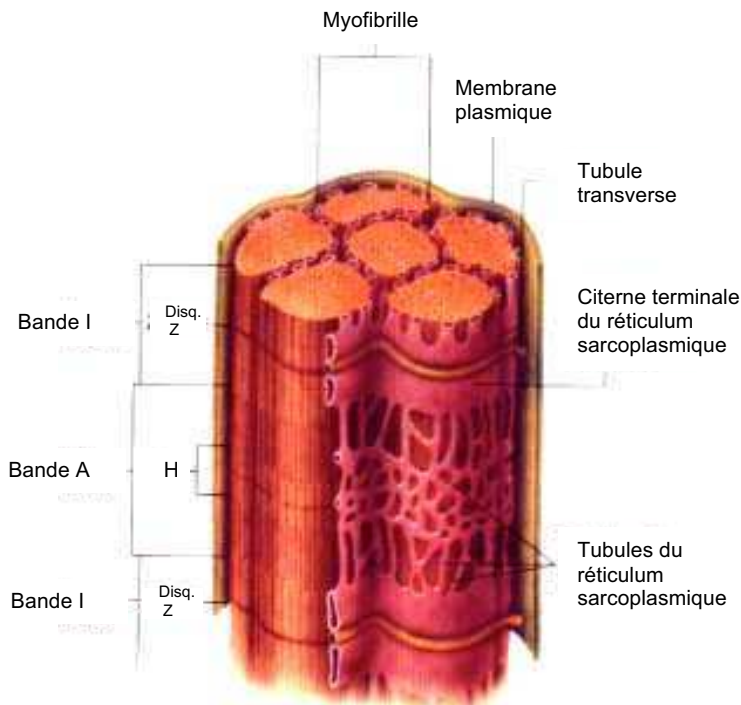


Figure 51: Structure d'une fibre musculaire

Les disques Z ne se comportent pas seulement comme une structure mécanique d'ancrage des filaments d'actine et d'autres protéines du sarcomère, mais est aussi un lieu central de détection du stress musculaire. Il réagit à celui-ci en transmettant des signaux jusqu'au noyau pour activer des voies compensatrices [467-471]. Il est à noter que l'association du réticulum sarcoplasmique cardiaque avec les tubules transverses se situe dans la région de la strie Z (figure 51).

La téléthonine est une importante protéine du disque Z se fixant à la protéine Ankrd2 qui semble également avoir un rôle dans la cardiomyopathie dilatée [471]. Dans le muscle cardiaque, la téléthonine est co-localisée avec la protéine LIM qui peut avoir un rôle dans la détection du stretch mécanique et permettrait le bon alignement du disque Z [471]. Cette protéine LIM (codé par le gène *fh12*) est également légèrement sous-exprimée (-1.67) chez les patients en fibrillation atriale. Le domaine C-terminal de la téléthonine interagit également avec le domaine cytoplasmique de la protéine MinK, la sous-unité β du canal du courant potassique I_{Ks} . La téléthonine et la sous-unité MinK sont co-localisées dans le disque Z au niveau du muscle cardiaque [472]. Il a été proposé que la téléthonine puisse être le lien entre les composants myofibrillaires du sarcomère avec la sous-unité β du canal du courant I_{Ks} au niveau de la membrane du tubule T, aux alentours du disque Z dans le myocarde ventriculaire [472]. Ces données suggèrent ainsi la possibilité d'une régulation stretch-dépendante du flux

potassique dans le muscle cardiaque. Ainsi, la surexpression du gène *ankrd2* pourrait induire une augmentation du flux potassique, via son interaction avec la téléthonine.

☞ *Protéines régulatrices KCNE*

Les protéines KCNE sont des protéines régulatrices de l'activité des canaux potassiques, notamment du courant I_{Ks} .

On peut observer que les patients en fibrillation atriale ont une légère sur-expression des gènes *kcne1* (+1.61) et *kcne3* (+1.64). L'association accrue de KCNQ1 et KCNE1/3 permet de générer un courant potassique I_{Ks} régulé adrénérgiquement. Ces données sont cohérentes avec les observations de mutations gain de fonction sur les gènes *kcnq1* et *kcne2* [279, 473] et confirment le rôle majeur joué par les canaux potassiques dans la fibrillation atriale. La surexpression de ces protéines régulatrices du courant I_{Ks} pourrait être activée pour réguler l'influx du courant potassique I_{Ks} .

☞ *Déstabilisation du courant I_{KATP}*

Le canal K_{ATP} est un canal potassique sensible à l'ATP. Il joue un rôle important dans le maintien de l'activité électrique des cardiomyocytes en condition de stress métabolique. Il hyperpolarise la membrane cellulaire et est important pour l'effet chronotrope négatif de l'activité vagale. Ce canal comprend deux sous-unités, Kir6.2 et SUR2 dont cette dernière est codée par le gène *abcc9*. L'expression de ce gène est ici augmentée (fold change : +2.4) chez les patients en fibrillation atriale. Ce courant doit ainsi être augmenté pour tenter de rétablir l'activité électrique de base [304].

➤ *Contractilité cardiaque*

Deux gènes apparaissent intervenir dans la modification de la contractilité myocardique : le gène de la troponine T cardiaque (*tnnt3*) et le gène de la kinase interagissant avec le troponine I cardiaque (*tnni3k*).

☞ *La troponine T cardiaque*

La troponine est un hétérotrimère qui comprend la troponine C, la troponine I et la troponine T. Dans ce complexe de troponines, la troponine T agit avec la tropomyosine pour réguler la contraction du muscle grâce à son interaction avec les filaments d'actine et de myosine (figure 52). Cette protéine est sensible aux variations du taux de calcium intracellulaire qui régule indirectement son action [474]. La troponine T cardiaque est également exprimée dans le

muscle squelettique. Elle joue un rôle dans la fibrillogenèse du muscle et sa mutation conduit à des cardiomyopathies [475-477].

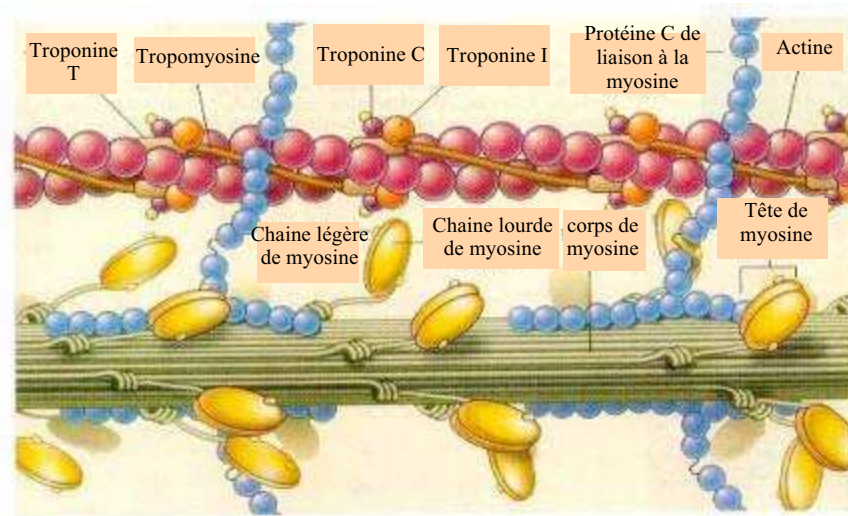


Figure 52: Interaction actine-myosine

Il existe trois isoformes de la troponine T (TnT), chacune localisée sur des chromosomes différents : la TnT spécifique des fibres musculaires squelettiques à contraction lente (TnT1), la troponine cardiaque à contraction lente (TnT2) et la troponine spécifique des fibres musculaires squelettiques à contraction rapide (TnT3). Dans le cœur, l'isoforme prédominante de troponine T est la troponine TnT2, dont des mutations peuvent être responsable du développement de cardiomyopathie hypertrophique. 25% des patients avec cardiomyopathie hypertrophique développent de la fibrillation atriale [476, 478].

Ces fibres à contraction lente (TnT1 et TnT2) sont de faible puissance mais de forte endurance. Elles ont une section de petit diamètre et une forte densité capillaire car elles sont adaptées aux efforts aérobies et sollicitent le système cardio-vasculaire. Au contraire, les fibres à contraction rapide (TnT3) sont de forte puissance mais de faible endurance. Elles ont une section de grand diamètre et une faible densité capillaire car elles sont adaptées aux efforts anaérobies.

La sur-expression du gène de la TnT3 (*tnnt3*) pourrait être à l'origine d'une contractilité excessive des fibres musculaires rapides dans le cœur, alors qu'en condition physiologique normale, ce sont les fibres musculaires à contraction lente qui sont sollicitées dans le système cardiaque. Des fibres musculaires différentes sont ainsi sollicitées au cours de la fibrillation atriale pour assurer le processus fibrillatoire.

☞ Kinase interagissant avec la troponine I cardiaque (TNNI3K)

La troponine I (TnI) est responsable de l'inhibition de la liaison entre la myosine et l'actine en masquant le site de l'actine qui sert à la liaison avec la myosine. Elle a donc une fonction inhibitrice qui a pour effet d'amorcer la décontraction musculaire.

La TnI présente trois isoformes, spécifiques respectivement du muscle squelettique à contraction rapide (muscle composé essentiellement de fibres musculaires, Type 2), du muscle squelettique à contraction lente (muscle composé essentiellement de fibres musculaires, Type 1) et du cœur (Type 3).

Le gène *tnni3k* codant pour une kinase interagissant avec la troponine I de type 3 (Tnni3K), est sur-exprimé (+2.3) pour protéger le myocarde. La Tnni3K est une protéine serine/thréonine kinase [388] qui interagit avec le domaine cytoplasmique des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ de l'intégrine, dont les gènes *itgb1* (-1.9) et *itgb3* (-2.6) sont sous-exprimés chez nos patients en fibrillation atriale. Cette interaction permet de lier les interactions cellule-matrice aux signaux régulant le remodelage du cytosquelette et la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et la différenciation [479-480]. Le gène *tnni3k* est localisé sur le chromosome 1p31.1, près de la zone 1p21-1p-31 connue pour être une zone impliquée dans le développement cardiaque, notamment dans la formation septale atrio-ventriculaire. ZF. Lai et al ont étudié la surexpression de *tnni3k* sur une lignée de cardiomyocytes P19CL6 [481]. Ils ont ainsi mis en évidence que 1/ la surexpression de *tnni3k* promouvait la cardiomyogénèse en supprimant l'apoptose et accélérât la maturation au cours des étapes précoces de maturation, 2/ Tnni3k augmentait la fréquence de battements des cardiomyocytes ainsi que la force contractile en augmentant les cellules riches en α -actinine, supprimant la phosphorylation de la troponine I cardiaque et augmentant la réponse calcique des cardiomyocytes, 3/ la surexpression de *tnni3k* dans un modèle de souris avec infarctus du myocarde supprime les dommages induits par l'infarctus du myocarde, prévient du remodelage ventriculaire induit et améliore la performance myocardique. Les mécanismes fonctionnels évoqués montrent que la Tnni3k améliore la réponse épinephrine des activités spontanées et augmente le relargage de calcium intracellulaire déclenchée par la ryanodine et la caféine [481]. Ces données sont cohérentes avec leur précédent résultat montrant que la protéine Tnni3k interagissait avec l' α -actine, la protéine de liaison à la myosine et la troponine I cardiaque [482]. Par ailleurs, la surexpression de *tnni3k* peut supprimer la phosphorylation de la Tnni3 induite par Ask-1

(Apoptosis signal-regulating kinase 1) pour promouvoir la différenciation cardiaque et augmenter la fonction contractile [483].

La surexpression de *tnni3k* permettrait d'accélérer la décontraction musculaire en compensation de la fibrillation des oreillettes en augmentant notamment la réponse calcique.

➤ La voie calcique

L'influx d'ions calcium à travers le canal calcique de type L est un déterminant majeur de la phase plateau du potentiel d'action cardiaque. Elle est cruciale pour le couplage excitation-contraction du cœur [484-486]. Le courant I_{CaL} déclenche la libération de calcium à partir des réserves du réticulum sarcoplasmique, déclenchant ainsi la contraction. Au cours de la fibrillation atriale, les myocytes contiennent moins de canaux calciques de type L [487-488].

H. Haase et al ont identifié en 1999 la protéine Ahnak dans les cardiomyocytes; celle-ci est fortement liée à la sous-unité β_2 du canal calcique [489]. Nous avons observé que le gène codant pour la protéine Ahnak était sous-exprimée d'un facteur 3.13 chez les patients en fibrillation atriale.

Le domaine C-terminal de la protéine Ahnak interagit avec l'actine et les faisceaux de filaments d'actine. Cette protéine serait un lien important entre les canaux Cav1.2 des tubules T et l'actine du cytosquelette [490-491]. Le domaine N terminal interagit quant à lui avec l'annexine 2 via la protéine S100A [492]. Ces deux protéines font le lien entre la signalisation calcique et la dynamique membranaire. Le rôle fonctionnel de la partie distale C-terminale de Ahnak dans l'ouverture du canal Cav1.2 a été étudié dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat par J. Alvarez et al [493]. La perfusion intracellulaire de fragments dérivés de la partie distale C-terminale de Ahnak augmente de manière prédominante le courant I_{CaL} en ralentissant l'inactivation du canal. Par ailleurs, l'ajout d'isoprénaline a montré un rôle inhibiteur de la partie distale C-terminale de Ahnak sur la voie de signalisation du système nerveux sympathique de manière indépendante de I_{CaL} [493].

Un mécanisme majeur du raccourcissement de la durée du potentiel d'action au cours de la fibrillation atriale est la réduction du courant calcique I_{CaL} . Une diminution de 70% de I_{CaL} a été observée au cours de la fibrillation atriale à la fois dans des myocytes atriaux humains et dans des modèles expérimentaux [7, 11, 494]. Il semble constituer un facteur arythmogénique important à travers le raccourcissement de la durée du potentiel d'action et des périodes

réfractaires [163]. S. Dinanian et al ont montré dans leur étude une forte réduction de I_{CaL} dans les myocytes atriaux de patients ayant une susceptibilité à la fibrillation atriale [495].

Le courant I_{CaL} est le principal courant dépolarisant qui est activé au cours de la phase de plateau du potentiel d'action. Les canaux calciques sont la cible de nombreux neuromédiateurs, incluant l'endothéline, l'angiotensine-II, ou le peptide natriurétique atrial, qui régulent la fonction cardiaque en modulant la phosphorylation des canaux via des protéines kinases et des phosphatases et ainsi modulent l'amplitude du courant. En plus de son rôle sur le potentiel d'action, le courant I_{CaL} déclenche le relargage du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique. C'est ainsi un acteur clé de l'activation de la contraction. Ainsi, sa downregulation au cours de la fibrillation atriale est un déterminant important de la contractilité atriale déprimée [496].,

Plusieurs études ont essayé d'identifier les facteurs pathogènes sous-jacents à la sous-expression du courant I_{CaL} au cours de la fibrillation atriale. A la fois des altérations du niveau de l'expression et de l'activité des canaux calciques ont été décrites au cours de l'arythmie [7, 9, 497].,,

Dans le myocarde, ce courant I_{CaL} est régulé par le système nerveux sympathique (récepteur beta-adrénergique) qui permet ainsi de réguler la force de contraction [77, 405-408]. La variation de ce courant est notamment due à des changements des effets β -adrénergique sur le courant I_{CaL} [409]. Un autre mécanisme important sous-jacent à la downrégulation du courant I_{CaL} au cours de la fibrillation atriale est la diminution de l'activité du canal [32]. Une forte sensibilité du courant I_{CaL} aux agonistes β -adrénergiques a été montrée au cours de la fibrillation atriale, suggérant que la phosphorylation basale de canaux calciques est diminuée [7].

Il est ainsi suggéré que le nombre de canaux dans l'oreillette est faible en condition basale et qu'ils peuvent être recrutés sous stimulation β -adrénergique.

Par ailleurs, une régulation anormale de calcium augmente l'arythmogénèse des veines pulmonaires. H. Honjo et al [498] ont étudié le rôle de l'angiotensine sur des prélèvements de veines pulmonaires et d'oreillettes de lapins. L'administration de ryanodine, un bloqueur des canaux calciques intracellulaires, produit une dépolarisation de la phase 4 dans les veines pulmonaires, mais pas dans les auricules droites et gauches. Ainsi, un transport anormal du calcium joue un rôle important dans l'activité arythmogène des veines pulmonaires.

L'ensemble des données de ces différentes études montre que des modifications de l'homéostasie atriale peut jouer un rôle dans le remodelage électrique du myocarde atrial [499].

De manière intéressante, il a été montré que le glutathion, un modulateur important de l'état redox de la cellule était diminué au cours de la fibrillation atriale [500].

Les données transcriptomiques de notre étude révèlent en effet une modification de l'état métabolique du tissu. Le niveau de glutathion détermine l'amplitude du courant I_{CaL} dans les myocytes atriaux humains en changeant la nitrosylation de canaux calciques [500] ou via la modulation de kinases/phosphatases [501].

Finalement, la sous-expression du courant I_{CaL} peut être un mécanisme protecteur contre la surcharge calcique et l'activation des cascades de signalisation dépendante du calcium pouvant être responsable des changements phénotypiques du myocarde atrial [502].

➤ Implication du système nerveux

La jonction OG-VP est notamment une région richement innervée. Les nerfs et ganglions du système nerveux autonome sont présents au niveau de la jonction et également à distance dans la veine pulmonaire. Le système sympathique par l'intermédiaire des récepteurs alpha et béta-adrénergiques module les canaux calciques et potassiques ligand-dépendant, le courant I_f (à l'origine de la dépolarisation lente diastolique de la phase 4 des cellules automatiques) et parfois les canaux sodiques.

Le système parasympathique par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques antagonise les effets du système sympathique et tend à engendrer une hyperpolarisation (effet dépresseur de l'automatisme sinusal et de la conduction nodale).

L'étude transcriptomique a mis en évidence une sur-expression du gène *adrb1*, codant pour le récepteur adrénergique β -1 (+2.42), et du gène *chrnb3* (+2.53), codant pour la sous-unité β 3 du récepteur nicotinique cholinergique. Le taux de surexpression de ces deux gènes est équivalent. Ces observations indiquent une implication plus importante des voies adrénergiques et cholinergiques du système nerveux autonome au cours de la fibrillation atriale. Ces deux voies semblent autant sollicitées l'une que l'autre.

☞ *Le récepteur adrénergique $\beta 1$ augmente le débit cardiaque en :*

- augmentant la fréquence cardiaque dans le noeud sino-atrial (effet chronotrope),
- augmentant la contractilité du muscle cardiaque atrial (effet inotrope),
- augmentant la contractilité et l'automatisme du muscle cardiaque ventriculaire,
- augmentant la conduction et l'automatisme du noeud atrio-ventriculaire.

Les récepteurs β -adrénergiques appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Trois gènes codant pour trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) ont été identifiés. Chez l'homme, le récepteur $\beta 1$ -adrénergique est présent dans toutes les régions du cœur. C'est la forme prédominante de récepteur β -adrénergique dans le cœur.

Dans le cœur, la stimulation concomitante, d'une part des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ - adrénergiques qui concourent à potentialiser la contraction cardiaque et, d'autre part, des récepteurs $\beta 3$ - adrénergiques qui diminuent la contraction, permet une régulation fine des effets β - adrénergiques sur la fonction cardiaque. La surexpression du gène *ardb1* pourrait ainsi accentuer la contraction cardiaque.

La stimulation des récepteurs $\beta 1$ - et $\beta 2$ -adrénergiques engendre une augmentation du courant calcique de type L, du courant transitoire calcique et donc de l'amplitude de contraction.

Plusieurs mécanismes expliquent les effets $\beta 1$ -adrénergiques :

- la stimulation $\beta 1$ -adrénergique induit une phosphorylation PKA-dépendante du phospholambane qui est une protéine régulatrice de l'activité de la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) alors que la stimulation $\beta 2$ - adrénergique a des effets négligeables.
- La stimulation $\beta 1$ -adrénergique, mais non $\beta 2$, réduit l'interaction du calcium avec les myofilaments par phosphorylation de la troponine I et de la protéine C.

La stimulation soutenue du récepteur $\beta 1$ -adrénergique par les catécholamines augmente la contractilité des cardiomyocytes et l'amplitude des courants transitoires calciques via un mécanisme indépendant de la voie AMPc-PKA, qui implique la calmoduline kinase II (CaMKII) [503].

Il a été montré que des défauts de la réponse beta-adrénergique est une cause majeure de dysfonction contractile du myocarde chez l'homme et l'animal [504-505].

➤ La sous-unité $\beta 3$ du récepteur nicotinique cholinergique (Chrn3) est l'une des sous-unités formant le récepteur cholinergique nicotinique.

Aucune donnée n'a été publiée sur l'implication du récepteur cholinergique nicotinique Chrn3 dans la fibrillation atriale ni dans les arythmies. Ce récepteur peut être impliqué dans la transmission de la décharge d'acétylcholine au niveau des synapses. Il est connu que le courant I_{KACH} , courant potassique dépendant de l'acétylcholine, diminue la fréquence cardiaque. Dans la fibrillation atriale, les études avaient auparavant décrit une implication de la voie muscarinique plutôt que la voie cholinergique nicotinique pour contre-balancer l'effet de la stimulation adrénérgique.

Ainsi, on peut supposer un effet synergique à la fois des stimulations cholinergique et adrénérgique comme cela a été montré par ZY Hou et al dans le tissu atrial humain pour l'initiation de battement cardiaque atrial précoce [506].

➤ **Activation de la coagulation et de l'inflammation**

Dans l'étude précédente, nous avons mis en avant une augmentation du niveau du VEGF sérique chez les patients en fibrillation atriale paroxystique. Aucune surexpression du gène du VEGF ne se retrouve dans cette analyse. Cependant, on peut noter une surexpression du gène *esm1* (+3.7) codant pour une molécule spécifique de l'endothélium. JW Shin et al ont montré en 2008 que *esm1* était l'un des gènes les plus potentiellement inductibles par le VEGF, que ce soit par des niveaux élevés de l'ARNm ou de protéines de VEGF [507]. La protéine Esm1 est un proteoglycane sulphate dermatan secreté par les cellules endothéliales et régulée par les cytokines inflammatoires [508]. Les protéoglycanes modulent les activités des facteurs de croissance, des chemokines et des facteurs de la coagulation qui à leur tour vont réguler les mécanismes de l'inflammation, de l'hémostase et de l'angiogénèse [509].

Ainsi, le gène *esm1* peut être responsable des fortes diminutions d'expression de la chimiokine CCL18 (-11.7), exprimée majoritairement au niveau pulmonaire, et du récepteur à chimiokine CCR10 (-2.8). La CCL18 peut inhiber la dégranulation leucocytaire et l'activation proinflammatoire [510], qui peuvent influencer sur la perméabilité endothéliale, et ainsi réduire le risque de saignement [511]. La chimiokine CCL18 peut, en se liant à son récepteur, limiter la génération des réponses immunes spécifiques [512-513]. A. Ricciardi et al, ont également décrit que l'expression de cette chimiokine CCL18 peut être inhibée par l'hypoxie dans des

cellules dendritiques immatures [514]. Elle joue également un rôle central dans la perpétuation des processus fibrotiques par un feedback positif qui lie les macrophages activés aux fibroblastes [515].

L'activation du gène *esm1* semble ainsi jouer un rôle central sur les processus d'inflammation et d'hémostase. Un des risques liés à la fibrillation atriale est la formation de caillot pouvant mener à des accidents vasculaires cérébraux. Cette étude transcriptomique révèle un autre facteur impliqué dans ce processus de coagulation. En effet, le gène du facteur de Von Willebrand est surexprimé (+1.5) chez les patients en fibrillation atriale. Ce facteur Von Willebrand ne porte pas seulement le facteur VIII, mais se lie également avec les récepteurs des plaquettes spécifiques pour faciliter l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. Ainsi, ce facteur, présent dans le sang circulant et la paroi des vaisseaux, participe à la phase initiale du processus de la coagulation. La surexpression du facteur Von Willebrand révèle donc une dysfonction endothéliale. Des niveaux plasmatiques élevés de ce facteur sont associés avec un plus faible pronostic chez les patients en fibrillation atriale [516].

Ainsi, l'analyse des données transcriptomiques des patients en fibrillation atriale a permis de mettre en évidence l'intervention de différents gènes et différentes fonctions biologiques (figure 53)

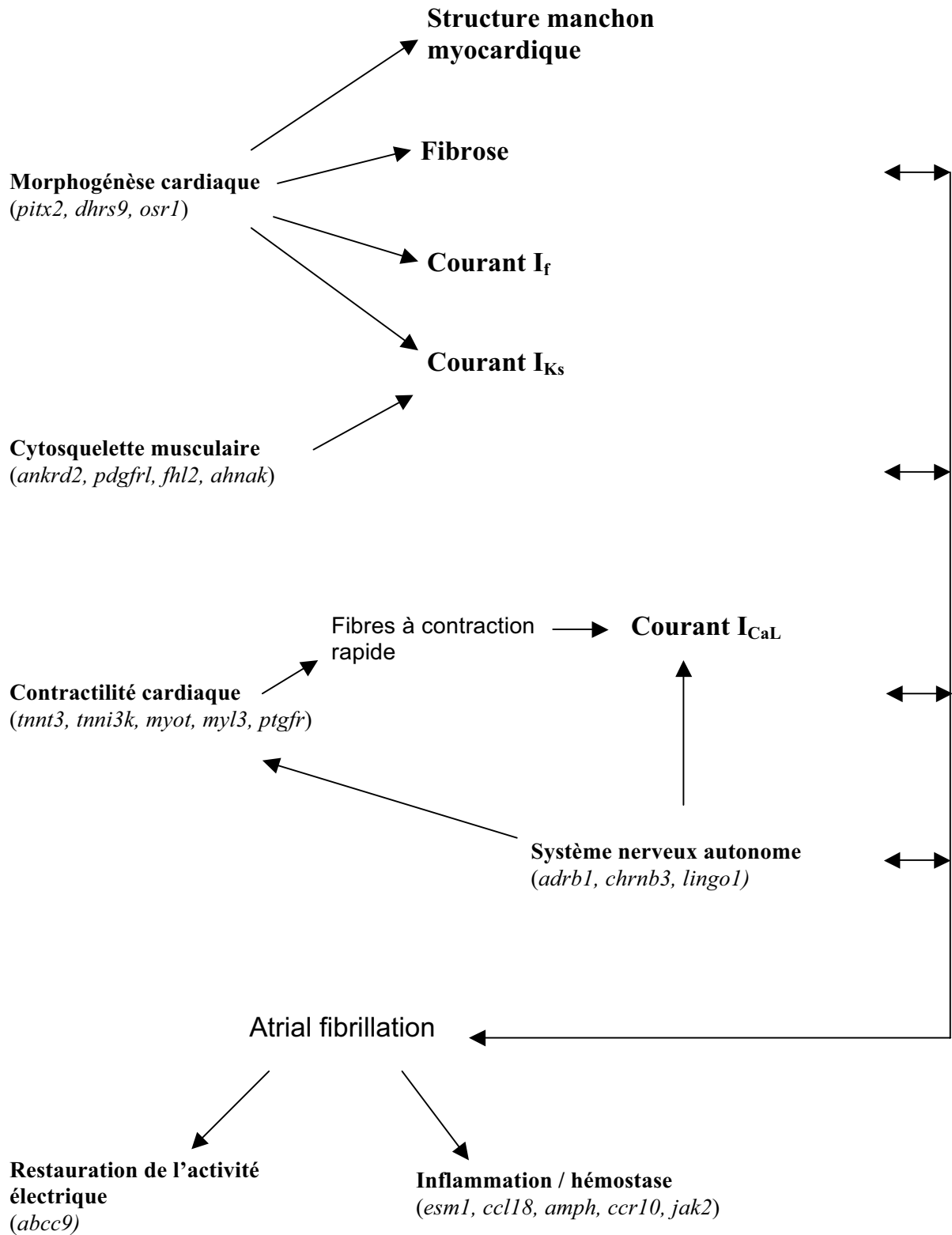


Figure 53: Proposition d'interactions entre les différentes fonctions biologiques au cours de la fibrillation atriale établie à partir des gènes les plus dérégulés (entre parenthèses sont mentionnés les gènes impliqués dans l'activation de la fonction)

Cette analyse doit cependant être approfondie afin de déterminer l'ordre de la cascade d'événements ainsi que les gènes qui sont impliqués dans l'initiation de la fibrillation et ceux dont la modification de l'expression en sont la conséquence.

D. Etude génétique d'une fibrillation atriale familiale

Plusieurs études relatent des cas de fibrillations atriales familiales; Cependant, aucun gène commun n'a été mis en évidence.

1. Données cliniques

L'arbre généalogique (figure 54) montre qu'il est retrouvé un ou plusieurs membres de chaque génération atteints de fibrillation atriale. Au sein de cette famille, parmi les dix membres adultes non décédés, sept membres ont développé de la fibrillation atriale et trois n'en ont pas développé ; Parmi les trois membres sans fibrillation atriale, deux (n°3-3 et 3-5) sont âgés de moins de 50ans ; on ne peut donc pas affirmer actuellement que ces deux patients ne développeront pas de fibrillation atriale dans les années à venir. En effet, le diagnostic de fibrillation atriale chez les membres de leur génération a été établi vers l'âge de 50ans. Sur les huit membres atteints de fibrillation atriale, sept ont développé une fibrillation atriale paroxystique et n'ont pas d'autres pathologies cardiovasculaires associées, et un membre est atteint de fibrillation atriale permanente (n°2-1) et cumule également une cardiopathie ischémique et une hypertension artérielle traitée. Un membre de la famille (n°4-2) a un diagnostic incertain ; en effet cette jeune fille de 15 ans semble développer depuis deux à trois ans des symptômes typiques de fibrillation atriale. Cependant, aucun tracé en fibrillation atriale n'a pu être obtenu ; cette fille développe au repos des crises d'arythmies plusieurs fois dans l'année au repos ; son pouls est alors très irrégulier et accompagné de fatigue. Il est également intéressant de constater que deux membres de cette famille (n°1-1 et 2-2) sont décédés à 71 et 74 ans d'un accident vasculaire cérébral, mais n'aurait pas été sujet à un développement de fibrillation atriale documenté. On ne peut pas exclure une possible susceptibilité à la fibrillation atriale chez ces membres, à l'origine de leur accident thromboembolique.

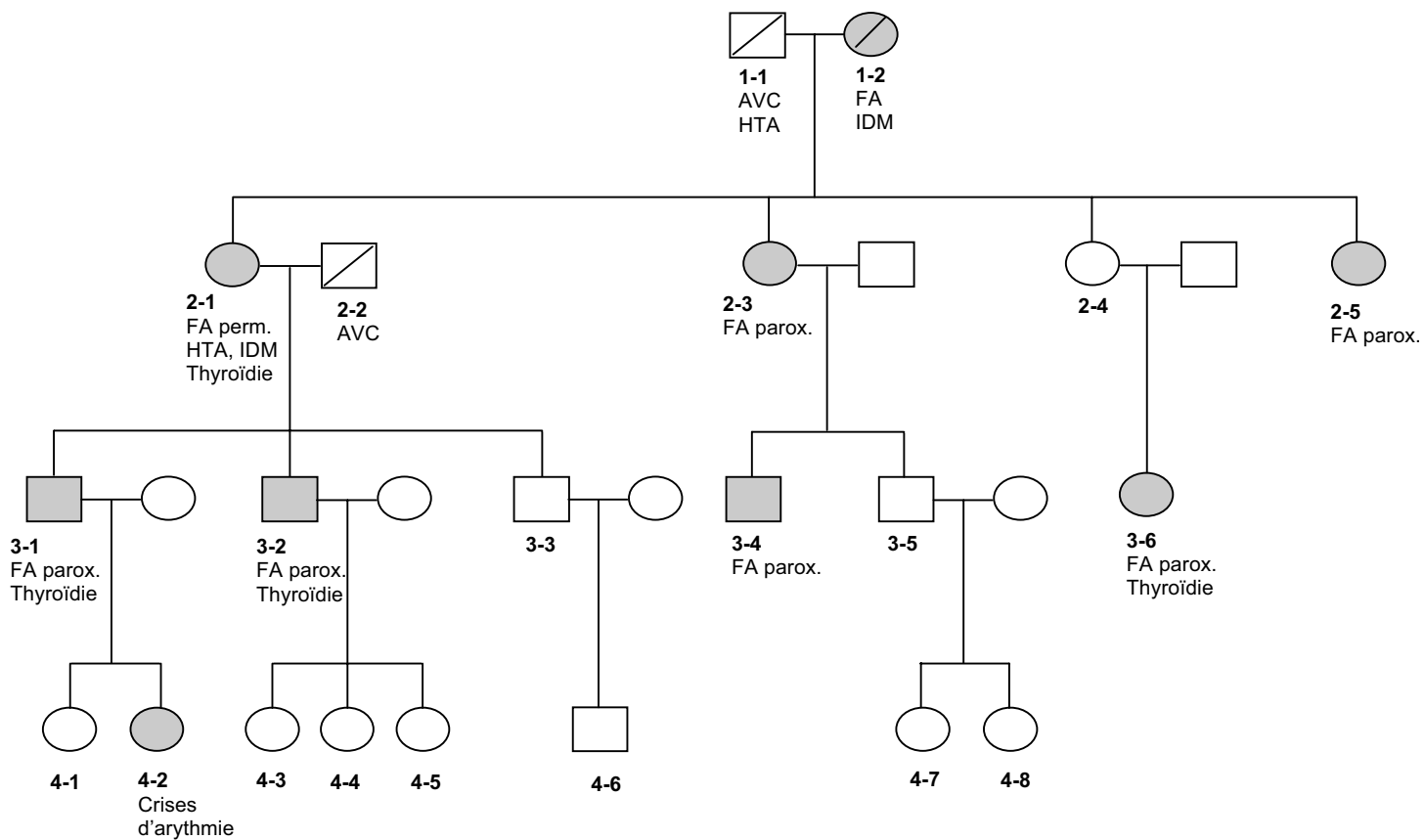


Figure 54: Arbre généalogique de la famille de fibrillation atriale

(AVC : accident vasculaire cérébral ; FA parox : FA paroxystique ; FA perm : FA permanente ; HTA : hypertension artérielle ; IDM : infarctus du myocarde)

Les données cliniques de la famille sont répertoriées dans le tableau 13 ci-dessous .

N = 11		FA	Sans FA
	Rapport H/F	3/5	2/1
	Age 1ers symptômes	39.8 +/-14.0 (deux sont asymptomatiques)	
Type de FA	FA permanente	1	
	FA persistante	0	
	FA paroxystique	6+1	
Traitement actuel	Flécaïne	3	0
	Cordarone	1	0
	Digoxine	1	0
	Aucun	4	0
	Ablation RF	2	0
Cardiopathie associée	Aucune	9	0
	Ischémique	1	0
	Dilatée	0	0
	HTA	1	0

Tableau 13: Données cliniques de la famille atteinte de fibrillation atriale (FA : fibrillation atriale ; H : Homme ; F : Femme ; RF : radiofréquence ; HTA : hypertension artérielle)

Onze membres de la famille (n°2-1 ; 2-3 ; 2-4 ; 2-5 ; 3-1 ; 3-2 ; 3-3 ; 3-4 ; 3-5 ; 3-6 ; 4-2) ont eu un prélèvement sanguin en vue d'une caractérisation génétique familiale. Ils ont au préalable signé un consentement d'accord pour participation à une étude génétique (annexe 7). Les prélèvements sanguins, effectués au sein de l'hôpital cardiologique Louis Pradel ou au sein de laboratoire d'analyses médicales de ville, ont tous été acheminés auprès du laboratoire de cardiogénétique du Centre de Biologie Est de Lyon (Hospices Civils de Lyon) pour en extraire l'ADN.

2. Principe de l'analyse génomique par recherche de zones d'intérêt et de gènes candidats

L'objectif est d'identifier une relation entre un ensemble de gènes et une caractéristique (pathologie, phénotype particulier) sur la base de variations d'expression entre différentes situations étudiées. Ces gènes sont des candidats valables pour l'identification de variations

génétiques associées à un risque morbide accru. L'identification d'un ensemble de variations génétiques permettant de prédire avec une bonne fiabilité un risque morbide peut permettre la mise en place d'un test de dépistage individuel de ces anomalies à l'échelle des populations à partir d'un échantillon sanguin. Ceci aboutira à une meilleure prédiction du risque à l'échelle de l'individu. L'étude de ces gènes et de leur fonction permettra également une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

La recherche de région génomique d'intérêt a été soumise auprès de la société DNA Vision SA (avenue George Lemaitre 25 - B-6041 Charleroi – Belgium ; www.dnavision.com). L'identification de régions d'intérêt permet de cibler des gènes intéressants à séquencer pour la recherche de mutations.

➤ **Protocole d'analyse** (figure 55)

250ng d'ADN génomique ont été soumis à l'enzyme de restriction NSP et 250ng d'ADN génomique ont été soumis à l'enzyme de restriction STY. Le produit de la restriction a été ligué avec les primers complémentaires des sites de coupure de l'enzyme de restriction. Respectivement, trois et quatre PCRs ont été réalisées à partir des restrictions NSP et STY. Les réactions PCR ont été vérifiées sur gel d'agarose avant leur purification. L'ADN obtenu est quantifié avec un spectrophotomètre afin de vérifier que l'ADN purifié soit en quantité suffisante pour la suite du protocole.

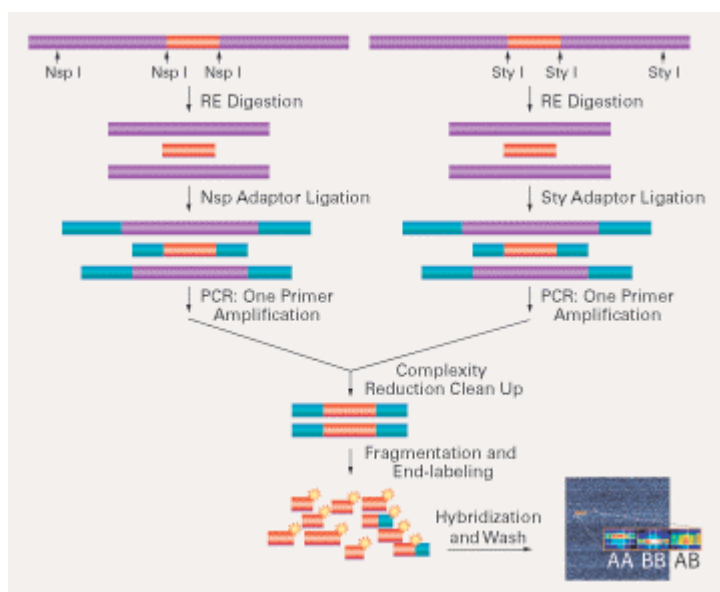


Figure 55: Principe du protocole d'analyse génétique

L'ADN est ensuite fragmenté et les produits de cette fragmentation sont vérifiés sur gel d'agarose. Après marquage de l'ADN fragmenté, les sondes sont hybridées sur les puces. Ces puces sont ensuite marquées et scannées. La qualité des résultats est vérifiée avec le logiciel Affymetrix GeneChip® Genotyping Console™ puis les génotypes sont extraits avec ce même logiciel.

3. Identification du gène *KCNE1L* au sein de la famille de fibrillation atriale

a. Stratégie d'étude

Il a été recherché, par une analyse biostatistique des génotypes extraits, des loci différents entre les patients avec fibrillation atriale et les patients sans fibrillation atriale. Sur la base de la découverte de nouveaux loci, les régions des loci considérés seront mises en évidence, aussi bien que les polymorphismes présents dans ces régions et les gènes associés.

Plusieurs hypothèses ont été testées en tenant notamment en compte du caractère récessif ou dominant de la pathologie.

Un modèle récessif nécessite la présence de deux allèles anormaux pour que la maladie s'exprime.

Un modèle dominant nécessite la présence d'un seul allèle anormal pour que la maladie s'exprime.

Les différentes études portant sur la génétique de la fibrillation atriale décrivent à la fois des modèles dominants et des modèles récessifs de fibrillation atriale. Deux loci associés à une forme autosomale dominante de la fibrillation atriale ont été localisés sur les régions chromosomiques 10q22–24 [517] et 6q14–16 [262]. Par ailleurs, C. Oberti et al ont identifié une mutation autosomale récessive sur la région chromosomique 5p13 liée à une fibrillation atriale néonatale et à la mort subite [267].

b. Résultats

L'étude des régions d'intérêt, en considérant la pathologie comme un modèle récessif, a mis en évidence une région d'intérêt en aval du gène *kcnell*, sur le chromosome X, homozygote chez les individus malades avec un génotype différent chez les individus sains.

Le choix de ce gène est appuyé par le grand nombre de polymorphismes retrouvés au niveau de cette région d'intérêt (figure 56).

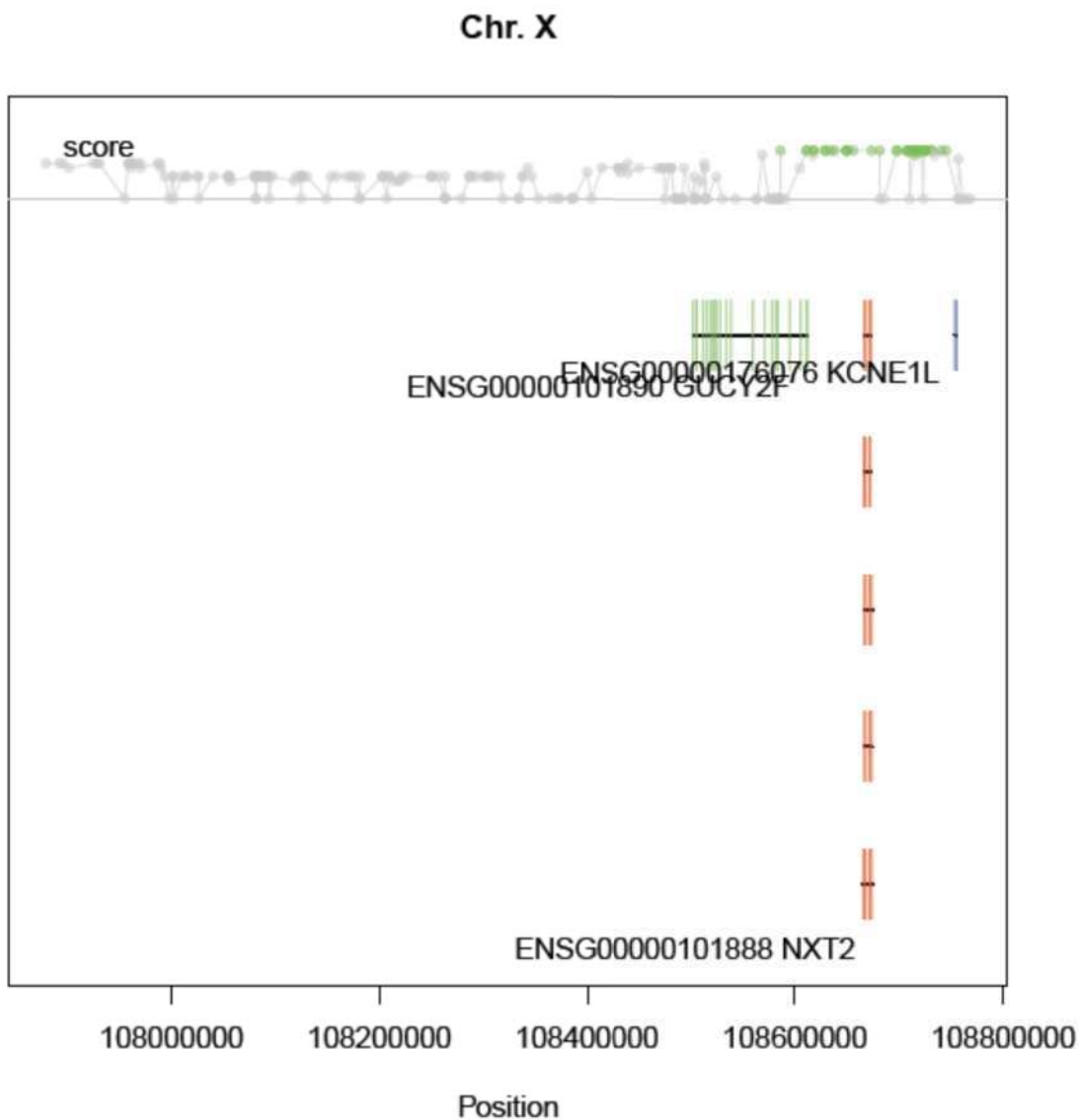


Figure 56: Région génomique du gène *kcnell* et les polymorphismes environnants. Les points verts correspondent aux polymorphismes proches de la région ciblée. En rouge sont représentés les transcrits alternatifs du gène.

➤ **Modèle récessif lié à l'X:**

Une maladie génétique transmise sur le mode récessif lié à l'X implique un gène porté par un chromosome X. La maladie affectera différemment les garçons et les filles : les garçons n'ont qu'un seul chromosome X dans chaque cellule, transmis par leur mère, tandis que les filles reçoivent un chromosome X de chacun de leurs parents et chacune de leurs cellules comporte donc deux chromosomes X.

Pour les garçons, il suffit que leur chromosome X porte l'allèle "maladie" pour qu'ils soient malades.

Pour les filles, il faut que les deux chromosomes X portent cet allèle pour qu'elles soient malades. Si un chromosome X porte l'allèle "maladie" et l'autre l'allèle "santé", la fille sera en bonne santé mais a 50% de risque de transmettre l'allèle "maladie".

Au sein de notre famille de fibrillation atriale, on observe que trois filles sur quatre à la deuxième génération sont atteintes de fibrillation atriale. Il n'y a pas de garçon sur cette génération. A la troisième génération, trois des cinq garçons et la seule fille sont atteints de fibrillation atriale. Le diagnostic des deux autres garçons reste incertain car ce sont les deux plus jeunes membres de cette génération âgés de moins de 50 ans ; ils peuvent donc encore développer de la fibrillation atriale dans les années à venir. A la quatrième génération, une fille âgée de 15 ans semble développer des crises d'arythmie pouvant correspondre à de la fibrillation atriale, mais aucun événement n'a été documenté. La pénétrance de la pathologie et la répartition des personnes atteintes posent tout de même des questions quant au mode de transmission déterminé (récessif lié au chromosome X) ; L'incertitude quant au phénotype de certaines personnes de cette famille rend compliqué et incertain la détermination du mode de transmission de la fibrillation atriale au sein de cette famille.

➤ **Implication de *KNE1L*(=*KCNE5*) dans les arythmies cardiaques**

Les protéines KCNE sont des régulateurs des canaux potassiques voltage-dépendant. Elles modulent plusieurs courants potassiques dans le cœur [518-522] dont les courants I_{Ks} [523] et I_{Kr} [518]. Elles comprennent cinq isoformes, KCNE1 à KCNE5, dont certaines sont impliquées dans les arythmies cardiaques [524]. Des mutations dans le gène *kcne1l* codant pour le canal potassium MinK peuvent causer le syndrome de Jervell & LangeNielsen (pathologie associant une surdité bilatérale congénitale avec un allongement de l'intervalle QT supérieur à 500 ms) [525]. Le polymorphisme 38G dans le gène *kcne1l* est associé avec une augmentation de la propension à la fibrillation atriale [277]. Des mutations dans le gène

kcne2, codant pour la sous-unité MiRP1, sont associées aux arythmies induites par les médicaments [519] et à la fibrillation atriale [279]. Une relation existe également entre la paralysie hypokaliémique et une mutation/polymorphisme dans le gène *kcne3* mais cette association reste toutefois controversée [526-527]. Toutes ces protéines modifient ainsi la fonction des canaux potassium repolarisants [524, 528].

Toutes les protéines KCNE sont des chaînes simples de polypeptides de 100 à 200 acides aminés. Elles contiennent un domaine N-terminal extracellulaire, un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire C-terminal [524].

Le gène *kne5* (= *kcne11*) est exprimé dans les oreillettes droites et gauches ainsi que dans les ventricules (figure 57) [529-530]. Il code pour la sous unité MiRP4 du canal potassique.

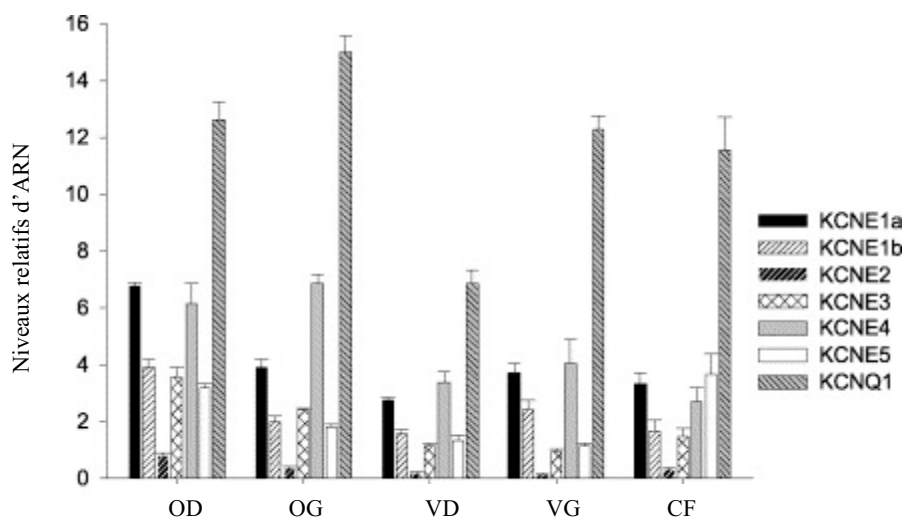


Figure 57: Expression relative des gènes *kcnq1* et *kne* dans le cœur humain par RT-PCR. Cinq tissus cardiaques ont été étudiés : OD : oreillette droite; OG : oreillette gauche; VD : ventricule droit; VG : ventricule gauche; CF : cœur fœtal. [529-530].

Tous les gènes codant pour les protéines KCNE sont exprimés dans le cœur mais à des niveaux différents [519, 526]. Un gradient a pu être observé quant à la quantité de gènes présente dans les myocytes atriaux humains : *kcne1* > *kcne4* > *kcne5* > *kcne3* > *kcne2* [529-530].

Le produit du gène *kcne5* [531] supprime le courant I_{Ks} dans les systèmes hétérologues. Il fonctionnerait comme une sous-unité down-régulatrice de la sous-unité alpha de KCNQ1, en compétition avec la sous-unité β stimulatrice de KCNE1 [532].

LS. Ravn et al (2005) a montré que l'allèle T du polymorphisme T97C est associé à un risque réduit de fibrillation atriale et indique donc que ce polymorphisme 97T est associé à une fonction anormale du produit du gène *kcne5* [282].

Une mutation dans le gène *kcne5* a été identifiée pour la première fois par LS. Ravn et al en 2008. 158 patients avec fibrillation atriale ont été investigués à partir de la cohorte SAFIR. Ils ont mis en évidence la mutation L65F dans le gène *kcne5* chez un patient avec fibrillation atriale non familiale et ayant un intervalle QT normal [533]. Cette mutation est localisée dans la région transmembranaire de la protéine, région décisive pour la fonction propre d'une protéine [529-530]. Des études de patch clamp sur les cellules CHO ont permis d'étudier l'effet de cette mutation sur le courant I_{Ks} . Ils ont ainsi montré que cette mutation faux-sens confère un gain de fonction au courant I_{Ks} . Ils expliquent cette susceptibilité à la fibrillation atriale chez ce patient par une plus haute expression du gène *kcne5* dans l'oreillette par rapport aux ventricules, comme l'avait montré AL. Lundquist et al [529]. L'étude transcriptomique précédemment réalisée n'a montré aucune modification de l'expression de *kcne11* chez les six patients avec fibrillation atriale.

Il est suggéré que la sous-unité KCNE5, dans des conditions physiologiques normales, affecte spécifiquement la cinétique du canal KCNQ1. Elle supprime le courant I_{Ks} si la quantité de KCNE5 est suffisante dans le tissu, via un shift positif de l'activation de KCNQ1. Ainsi, seule une dépolarisation forte et soutenue active le canal [532]. Le myocarde devient alors plus vulnérable au développement de tachyarythmies de ré-entrée. En condition normale, le courant I_{Ks} est physiologiquement supprimé de manière dose-dépendante par KCNE5 [523, 529, 532]. Cette suppression est annulée par la mutation L65F.

KCNE5 module également la fonction du canal Kv4.3 impliqué dans le courant Ito. Il est donc possible que cette mutation L65F puisse contribuer à d'autres modifications dans la balance responsable des caractéristiques de repolarisation du potentiel d'action atrial via son interaction avec Kv4.3 et les autres canaux [534].

Le rôle de KCNE5 a également été spéculé dans une autre arythmie, le syndrome du QT long, à savoir qu'une mutation gain de fonction résulterait en un QTL alors qu'une perte de fonction résulterait en un QT court [535].

Il reste désormais à démontrer la réelle implication du gène *kcne5* (*kcne1l*) au sein de cette famille. Dans un premier temps, il sera recherché une mutation au sein de ce gène. Puis si une mutation est identifiée, l'effet fonctionnel de celle-ci devra être élucidé afin de conclure à l'implication ou non de ce gène et de sa mutation dans la fibrillation atriale.

➤ *Lien potentiel entre les protéines KCNE et les troubles de la fonction thyroïde*

Fibrillation atriale et hyperthyroïdie

De nombreux patients atteints de fibrillation atriale présentent un trouble de la thyroïde. La thyroxine augmente l'activité arythmogène des cardiomyocytes des veines pulmonaires. Pour confirmer ce phénomène, YC. Chen et al ont incubé des cardiomyocytes d'oreillette gauche et de veines pulmonaires avec de la thyroxine (dans des conditions cliniques similaires à l'hyperthyroïdisme) [536]. Cette étude électrophysiologique a démontré que, dans ces conditions, les cardiomyocytes de veines pulmonaires étaient associés à une plus grande arythmogénicité que les cardiomyocytes de l'oreillette gauche (figure 58).

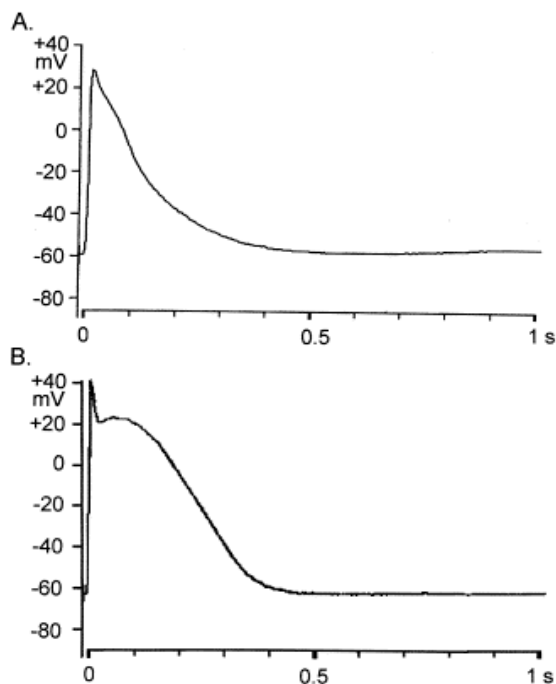


Figure 58: Effets de l'hormone thyroïdienne sur la durée du potentiel d'action (PA) de cardiomyocytes d'une veine pulmonaire (VP) alimentés électriquement à un taux de 0,1 Hz. Il y a une réduction de la durée du PA à 50% de la repolarisation et à 90% de la repolarisation dans le cas d'hyperthyroïdie (A) qu'il n'y en avait dans les cardiomyocytes de VP contrôle (B). [536].

L'hormone thyroïdienne modifie l'activité électrophysiologique des cardiomyocytes de veines pulmonaires. L'automatisme accrue et l'augmentation de l'activité déclenchée peut accroître l'activité arythmogène des veines pulmonaires dans l'hyperthyroïdie.

Quatre membres de la famille ont des problèmes de thyroïdie (fig 54).

Les dysfonctions de la thyroïde affectent 1 à 4% de la population mondiale causant des pathologies telles que des désordres du développement neuronal et des arythmies cardiaques. Environ 13% des patients en fibrillation atriale idiopathique présente des symptômes d'hyperthyroïdisme [537]. Les hormones thyroïdiennes sont très modifiées dans les syndromes métaboliques. Elles ont ainsi une forte influence au niveau nucléaire et donc sur l'expression génétique. L'analyse transcriptomique réalisée précédemment a en effet montré une modification de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les syndromes métaboliques et endocriniens.

TK. Roepke et al ont montré que KCNQ1 et l'une de ces sous-unités régulatrices KCNE2 formaient un canal potassique dans les thyrocytes. Ce canal est stimulé par la TSH (hormone de stimulation thyroïdienne) et KCNE2 est requis pour la biosynthèse normale de l'hormone thyroïde (TH) [538]. L'iodure I^- est un constituant essentiel des hormones thyroïdiennes T3 et T4. L'iodure I^- entre dans les thyrocytes via un symporteur basolatéral Na^+/I^- (NIS) et il est incorporé de manière covalente dans la thyroglobuline, le précurseur des T3 et T4. Le transport d'iodure médié par le NIS utilise le gradient sodium généré par la Na^+/K^+ ATPase au niveau de la membrane basolatérale du thyrocyte. Le rôle des canaux potassiques dans la thyroïde reste inconnu. Cependant, TK. Roepke et al ont démontré que KCNE2 et KCNQ1 étaient tous deux exprimés dans la glande thyroïde et qu'ils génèrent un courant potassique stimulé par la TSH et permettrait l'accumulation de l'iodine. Il suggère ainsi une reconsidération des patients avec maladie cardiaque structurale présentant des arythmies ventriculaires et atriales. Des mutations dans les gènes *kcnq1* et *kcne2* peuvent être arythmogéniques à cause des défauts électriques des canaux potassiques de myocytes contenant ces sous-unités et à cause d'anomalies structurales se développant secondairement à partir d'une dysfonction thyroïdienne due à des canaux KCNQ1-KCNE2 défectueux au niveau de la thyroïde.

Il peut ainsi être suggéré un mécanisme similaire de KCNQ1 et sa sous-unité régulatrice KCNE1L sur la fonction thyroïdienne, expliquant ainsi les problèmes thyroïdiens au sein de cette famille. Les membres atteints de cette dysfonction thyroïdienne sont tous des patients atteints également de fibrillation atriale.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A. Synthèse des résultats

La fibrillation atriale est une pathologie faisant intervenir différents aspects physiologiques tels que des activités ectopiques, une anisotropie particulière, l'implication du système nerveux autonome, l'aspect génétique, l'inflammation et des remodelages structuraux et électriques.

L'approche multifacette a permis d'étudier ces différents paramètres à partir de prélèvements tissulaires et sanguins humains de patients avec et sans fibrillation atriale.

L'étude histologique a révélé différents patterns de l'organisation du manchon musculaire dans les veines pulmonaires. Cependant, aucun pattern particulier n'a pu être relié à la présence de fibrillation atriale. En revanche, des cellules interstitielles connues pour avoir une activité ectopique dans l'intestin ont été mises en évidence au sein du manchon musculaire dans les veines pulmonaires de patients avec fibrillation atriale. La présence de ces cellules interstitielles de type Cajal pourrait être à l'origine de l'activité ectopique des veines pulmonaires de part notamment leur capacité à générer des ondes lentes. L'étude de ces cellules en culture a révélé qu'elles portent notamment les marqueurs de l'acétylcholine et peuvent donc être impliquées dans la régulation du système nerveux parasympathique. Celui-ci étant fortement impliqué dans la fibrillation atriale. La jonction de l'oreillette gauche avec les veines pulmonaires, zone prédominante de l'activité ectopique, est également richement innervée en fibres acétylcholinergiques. Ainsi, les cellules interstitielles de type Cajal peuvent d'une part créer des ondes lentes qui seront transmises aux cellules musculaires pour créer une activité automatique et d'autre part elles peuvent médier l'influx nerveux acétylcholinergique afin de créer un substrat favorable au développement de la fibrillation atriale.

L'identification des altérations transcriptomiques associées à la fibrillation atriale permet de proposer des bases moléculaires de cette pathologie et du remodelage atrial engendré. Des gènes de la morphogénèse semblent ainsi être impliqués dans la susceptibilité à la fibrillation atriale, via une absence de l'expression du gène *pitx2*. Ce gène *pitx2*, impliqué dans la formation du myocarde pulmonaire, semble être un élément clé de la susceptibilité du substrat

atrial à développer de la fibrillation atriale. Il a ainsi été mis en évidence une modification de la régulation des courants I_{Ks} et I_{CaL} , des propriétés physiologiques de la contractilité myocardique et du système nerveux autonome sympathique et parasympathique. La stimulation adrénergique accentue l'hyperexcitabilité des veines pulmonaires alors que le système nerveux parasympathique (voie cholinergique nicotinique) tendrait à le contre-balancer.

Le rôle du courant I_{Ks} dans l'initiation de la fibrillation atriale est également montré dans l'étude génétique d'une famille atteinte de fibrillation atriale. Cette étude a mis en évidence l'implication du gène *kcne5*, codant pour une sous-unité régulatrice du canal KCNQ1, au sein d'une famille dont quatre générations sont atteintes de fibrillation atriale. Ce gène serait présent sous forme homozygote au sein des membres de la famille atteint de fibrillation atriale.

Un autre paramètre pouvant être impliqué dans l'initiation de la fibrillation atriale est l'inflammation, qui est notamment responsable des fibrillations atriales post-opératoires. La coagulation plasmatique, la fibrinolyse et l'activation endothéliale jouent un rôle important dans cette pathologie. En effet, la fibrillation atriale est associée à un risque majeur d'accident vasculaire cérébral par un mécanisme thrombo-embolique. Le VEGF semble être un élément clé des processus inflammatoires et hémostatiques dans la fibrillation atriale. Par ailleurs, l'étude transcriptomique a également montré l'implication accrue du facteur de Van Willebrand chez les patients en fibrillation atriale. Ce facteur peut être responsable de la formation accrue de caillot sanguin chez les patients en fibrillation atriale.

Les différentes données apportées dans cette étude peuvent mener à une proposition de la physiopathologie de la fibrillation atriale schématisée en figure 59. Cette étude a également renforcé le rôle central des manchons myocardiques des veines pulmonaires qui est le lieu d'initiation des différents mécanismes. En effet, l'organisation de ce manchon est notamment favorable à la distribution de foyers ectopiques et de délais de conduction

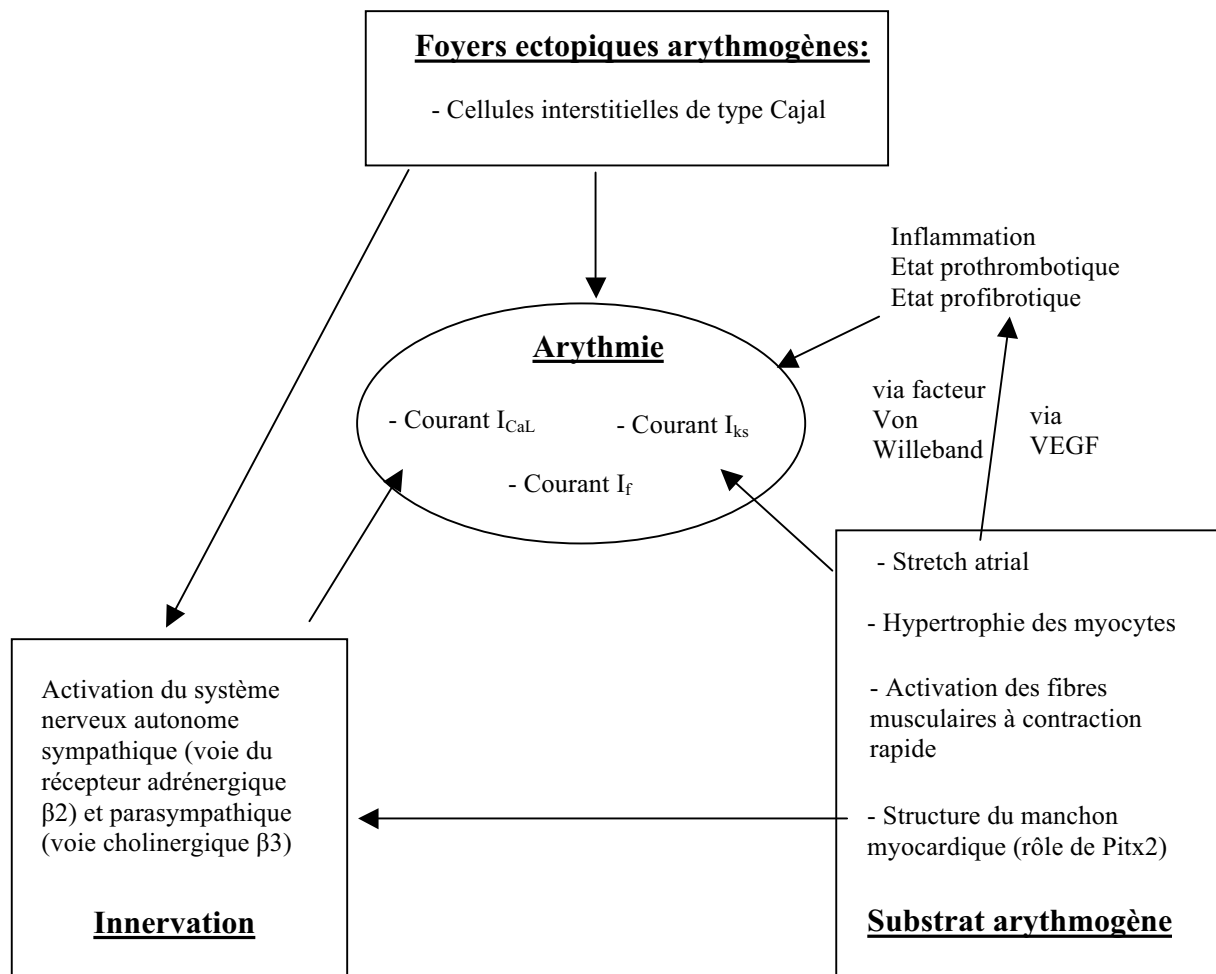


Figure 59: Proposition du mécanisme de la physiopathologie de la fibrillation atriale à partir des données de la littérature et des données de cette présente étude.

B. Perspectives

Cette approche multifacette de la fibrillation atriale a confirmé de nombreux paramètres pouvant intervenir dans la fibrillation atriale et a mis en avant de nouvelles cibles potentielles pouvant être impliquées dans l'initiation de cette pathologie.

Cette étude a principalement porté sur l'analyse de données de patients atteints de fibrillation atriale paroxystique. Les mécanismes de chaque type de fibrillation atriale semblent différents, il est donc important de bien caractériser le type de fibrillation atriale. L'élucidation des mécanismes relatifs à chacun de ces types de fibrillation pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution des fibrillations. Il est actuellement suggéré que le mécanisme sous-jacent au développement de la fibrillation atriale paroxystique soit une origine ectopique dans les veines pulmonaires. Au contraire, la persistance de la fibrillation atriale reposerait davantage sur un remodelage du tissu atrial.

L'origine du foyer ectopique des veines pulmonaires reste un élément peu connu dans la fibrillation atriale. De nombreux foyers peuvent être observés dans les veines pulmonaires, sans que ceux-ci ne soient clairement identifiés. Cette étude a ainsi montré la présence de cellules interstitielles de type Cajal chez les patients en fibrillation atriale. Les propriétés connues de ces cellules peuvent nous permettre de suggérer fortement un rôle de celles-ci dans le déclenchement de la fibrillation atriale. Ces études histologiques ont notamment montré que ces cellules interstitielles de type Cajal sont localisées dans et près des manchons myocardiques qui parcourent les veines pulmonaires. Des études complémentaires, portant sur l'électrophysiologie de ces cellules dans les veines pulmonaires de patients en fibrillation atriale pourront permettre de caractériser leur rôle fonctionnel au sein de ce tissu. La localisation et le fonctionnement précis de ces cellules pourraient permettre de mieux cibler l'ablation des veines pulmonaires, voire d'éviter cette thérapie.

L'anisotropie du tissu atrial et de la jonction entre l'oreillette gauche et les veines pulmonaires est également un substrat clé dans l'initiation de la fibrillation atriale. La présence du manchon musculaire myocardique dans les veines pulmonaires, de part son organisation structurale particulière, est considérée comme une source majeure de foyers ectopiques et de zones de délai de conduction. L'étude transcriptomique a notamment révélé une forte implication du gène *pitx2* chez les patients en fibrillation atriale de part l'absence de son

expression dans le tissu atrial en fibrillation. *Pitx2* est notamment impliqué dans la formation du manchon myocardique lors des étapes embryonnaires. Ainsi, une origine embryonnaire précoce de la fibrillation atriale peut ainsi être envisagée. La constitution et l'organisation du manchon musculaire dans les veines pulmonaires confèrent ainsi une plus forte susceptibilité à développer de la fibrillation atriale. Il reste à montrer de quelle manière l'absence de l'expression du gène *pitx2* engendre des réorganisations structurales (cytosquelette, fibres musculaires), l'implication du système nerveux autonome et des modifications des flux potassiques et calciques à l'origine de la fibrillation atriale.

L'une des conséquences de la fibrillation atriale est notamment la survenue d'accidents vasculaires cérébraux. La surexpression du gène du facteur de Von Willebrand et une expression protéique accrue du facteur de croissance endothélial VEGF peuvent être à l'origine de cette susceptibilité. Il semble important de poursuivre les investigations du rôle précis du VEGF dans les différents types de fibrillation atriale, notamment, en corrélant le taux de surexpression du gène *esml*, cible du VEGF, avec la concentration de celui-ci en fonction des différents types de fibrillation atriale afin d'en étudier les répercussions physiologiques. Ces données peuvent aider au suivi des patients en fibrillation atriale et notamment à la détection précoce et à la prévention de tout événement thromboembolique.

L'analyse transcriptomique permet d'apporter des informations précises sur les mécanismes d'expression génique mis en jeu au cours de cette pathologie. Désormais, il serait intéressant d'étudier l'expression protéique des gènes dérégulés afin de pouvoir émettre des hypothèses quant à leur rôle dans l'initiation et la maintenance de la fibrillation atriale.

A chaque étape de la transformation du gène vers la protéine, l'étude du transcriptome, du protéome ou du physiome est le reflet de l'état d'une cellule et de son fonctionnement. Une étude globale et comparative à un de ces trois niveaux, dans le contexte de l'étude d'une pathologie, peut apporter des éléments de réponse sur les mécanismes fondamentaux de la maladie et ainsi permettre le développement d'éléments diagnostics, pronostics et thérapeutiques.

Les études génétiques familiales portant sur la fibrillation atriale sont actuellement peu nombreuses. Les familles présentant une fibrillation atriale isolée sont en effet rares. Chacune d'elles a révélé l'implication d'un gène différent. Ces données peuvent laisser sous-entendre

le caractère polyfactoriel de cette pathologie et le rôle de tous ces gènes en tant que facteur de prédisposition à la fibrillation atriale.

Il reste à élucider si le gène *kcne11*, mis en évidence dans cette étude, porte une mutation qui pourrait être responsable de la fibrillation atriale au sein de cette famille.

L'augmentation du nombre de ces études permettra de révéler dans les années à venir des gènes impliqués dans les différentes formes de fibrillation atriale en lien avec des cardiopathies sous-jacentes. Ces nouvelles données permettront de mieux stratifier le risque lié à la fibrillation atriale et apporter de nouvelles données pour envisager de nouvelles réponses pharmacologiques.

Ainsi, toutes ces données tendent à améliorer les connaissances de cette pathologie très fréquente mais encore actuellement mal traitée. L'identification précise des mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrillation atriale permettra à l'avenir de mieux traiter les patients et éviter les récurrences à long terme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Go, A.S., et al., *Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study*. JAMA, 2001. 285(18): p. 2370-5.
2. Miyasaka, Y., et al., *Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence*. Circulation, 2006. 114(2): p. 119-25.
3. Wolf, P.A., et al., *Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: The Framingham Study*. Am Heart J, 1996. 131(4): p. 790-5.
4. Veenhuizen, G.D., C.S. Simpson, and H. Abdollah, *Atrial fibrillation*. CMAJ, 2004. 171(7): p. 755-60.
5. Page, R.L. and D.M. Roden, *Drug therapy for atrial fibrillation: where do we go from here?* Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(11): p. 899-910.
6. Bosch, R.F., et al., *Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation*. Cardiovasc Res, 1999. 44(1): p. 121-31.
7. Van Wagoner, D.R., et al., *Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation*. Circ Res, 1999. 85(5): p. 428-36.
8. Dobrev, D. and U. Ravens, *Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation*. Basic Res Cardiol, 2003. 98(3): p. 137-48.
9. Schotten, U., et al., *The L-type Ca²⁺-channel subunits alpha1C and beta2 are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation*. J Mol Cell Cardiol, 2003. 35(5): p. 437-43
10. Deroubaix, E., et al., *Moderate and chronic hemodynamic overload of sheep atria induces reversible cellular electrophysiologic abnormalities and atrial vulnerability*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(9): p. 1918-26
11. Le Grand, B.L., et al., *Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria*. Cardiovasc Res, 1994. 28(4): p. 548-56.
12. Vest, J.A., et al., *Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation*. Circulation, 2005. 111(16): p. 2025-32
13. Van Wagoner, D.R. and J.M. Nerbonne, *Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation*. J Mol Cell Cardiol, 2000. 32(6): p. 1101-17.

14. Nattel, S. and D. Li, *Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation*. *Circ Res*, 2000. 87(6): p. 440-7.
15. Shiroshita-Takeshita, A., B.J. Brundel, and S. Nattel, *Atrial fibrillation: basic mechanisms, remodeling and triggers*. *J Interv Card Electrophysiol*, 2005. 13(3): p. 181-93.
16. Van Wagoner, D.R., et al., *Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation*. *Circ Res*, 1997. 80(6): p. 772-81.
17. Brundel, B.J., et al., *Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation*. *Circulation*, 2001. 103(5): p. 684-90
18. Yue, L., et al., *Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation*. *Circ Res*, 1999. 84(7): p. 776-84.
19. European Heart Rhythm Association et al. *Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*. 2010 Oct;31(19):2369-429
20. Levy, S., et al., *Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study*. *The College of French Cardiologists*. *Circulation*, 1999. 99(23): p. 3028-35.
21. Patton, K.K., et al., *Clinical subtypes of lone atrial fibrillation*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2005. 28(7): p. 630-8.
22. Kato, T., et al., *Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation. Observations from a 14-year follow-up study*. *Circ J*, 2004. 68(6): p. 568-72
23. Nabauer, M., et al., *The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management*. *Europace*, 2009. 11(4): p. 423-34.
24. Kopecky, S.L., et al., *The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades*. *N Engl J Med*, 1987. 317(11): p. 669-74.
25. Kozlowski, D., et al., *Lone Atrial Fibrillation - What Do We Know?* *Heart*, 2009.
26. Jahangir, A., et al., *Long-term progression and outcomes with aging in patients with lone atrial fibrillation: a 30-year follow-up study*. *Circulation*, 2007. 115(24): p. 3050-6.

27. Osranek, M., et al., *Left atrial volume predicts cardiovascular events in patients originally diagnosed with lone atrial fibrillation: three-decade follow-up.* Eur Heart J, 2005. 26(23): p. 2556-61.
28. Hohnloser, S.H., K.H. Kuck, and J. Lilienthal, *Rhythm or rate control in atrial fibrillation--Pharmacological Intervention in Atrial Fibrillation (PIAF): a randomised trial.* Lancet, 2000. 356(9244): p. 1789-94
29. Israel, C.W., et al., *Long-term risk of recurrent atrial fibrillation as documented by an implantable monitoring device: implications for optimal patient care.* J Am Coll Cardiol, 2004. 43(1): p. 47-52.
30. Kannel, W.B., et al., *Coronary heart disease and atrial fibrillation: the Framingham Study.* Am Heart J, 1983. 106(2): p. 389-96.
31. Chen, L.Y. and W.K. Shen, *Epidemiology of atrial fibrillation: a current perspective.* Heart Rhythm, 2007. 4(3 Suppl): p. S1-6.
32. Ruo, B., et al., *Racial variation in the prevalence of atrial fibrillation among patients with heart failure: the Epidemiology, Practice, Outcomes, and Costs of Heart Failure (EPOCH) study.* J Am Coll Cardiol, 2004. 43(3): p. 429-35
33. Marcus, G.M., et al., *Racial differences in atrial fibrillation prevalence and left atrial size.* Am J Med, 2010. 123(4): p. 375 e1-7.
34. Benjamin, E.J., et al., *Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort.* The Framingham Heart Study. JAMA, 1994. 271(11): p. 840-4.
35. Psaty, B.M., et al., *Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults.* Circulation, 1997. 96(7): p. 2455-61.
36. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study.* Circulation, 2004. 110(9): p. 1042-6.
37. Kannel, W.B., et al., *Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates.* Am J Cardiol, 1998. 82(8A): p. 2N-9N.
38. Feinberg, W.M., et al., *Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications.* Arch Intern Med, 1995. 155(5): p. 469-73.
39. De Bacquer, D., G. De Backer, and M. Kornitzer, *Prevalences of ECG findings in large population based samples of men and women.* Heart, 2000. 84(6): p. 625-33.
40. Motsinger, A.A., et al., *Risk factor interactions and genetic effects associated with post-operative atrial fibrillation.* Pac Symp Biocomput, 2006: p. 584-95.

41. Kannel, W.B., et al., *Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study*. N Engl J Med, 1982. 306(17): p. 1018-22
42. Gajewski, J. and R.B. Singer, *Mortality in an insured population with atrial fibrillation*. JAMA, 1981. 245(15): p. 1540-4
43. Benjamin, E.J., et al., *Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study*. Circulation, 1998. 98(10): p. 946-52.18
44. Wyse, D.G., et al., *A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2002. 347(23): p. 1825-33
45. Van Gelder, I.C., et al., *A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2002. 347(23): p. 1834-40
46. *Baseline characteristics of patients with atrial fibrillation: the AFFIRM Study*. Am Heart J, 2002. 143(6): p. 991-1001.
47. Krahn, A.D., et al., *The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study*. Am J Med, 1995. 98(5): p. 476-84
48. Mitchell, G.F., et al., *Pulse pressure and risk of new-onset atrial fibrillation*. JAMA, 2007. 297(7): p. 709-15.
49. Conen, D., et al., *Influence of systolic and diastolic blood pressure on the risk of incident atrial fibrillation in women*. Circulation, 2009. 119(16): p. 2146-52.
50. McEwan, P.E., et al., *Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo*. Circulation, 1998. 98(24): p. 2765-73.
51. Seccia, T.M., et al., *Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II*. J Am Coll Cardiol, 2003. 41(4): p. 666-73.
52. Hassink, R.J., et al., *Morphology of atrial myocardium in human pulmonary veins: a postmortem analysis in patients with and without atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2003. 42(6): p. 1108-14.
53. Vaziri, S.M., et al., *Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study*. Circulation, 1994. 89(2): p. 724-30.
54. Tsang, T.S., et al., *Prediction of cardiovascular outcomes with left atrial size: is volume superior to area or diameter?* J Am Coll Cardiol, 2006. 47(5): p. 1018-23.
55. Wang, T.J., et al., *Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2003. 107(23): p. 2920-5.

56. Nieuwlaat, R., et al., *Atrial fibrillation management: a prospective survey in ESC member countries: the Euro Heart Survey on Atrial Fibrillation*. Eur Heart J, 2005. 26(22): p. 2422-34.
57. Dublin, S., et al., *Risk of new-onset atrial fibrillation in relation to body mass index*. Arch Intern Med, 2006. 166(21): p. 2322-8.
58. Frost, L., L.J. Hune, and P. Vestergaard, *Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study*. Am J Med, 2005. 118(5): p. 489-95.
59. Wang, T.J., et al., *Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation*. JAMA, 2004. 292(20): p. 2471-7.
60. Tsang, T.S., et al., *Obesity as a risk factor for the progression of paroxysmal to permanent atrial fibrillation: a longitudinal cohort study of 21 years*. Eur Heart J, 2008. 29(18): p. 2227-33.
61. Watanabe, H., et al., *Metabolic syndrome and risk of development of atrial fibrillation: the Niigata preventive medicine study*. Circulation, 2008. 117(10): p. 1255-60.
62. Lauer, M.S., et al., *The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study*. JAMA, 1991. 266(2): p. 231-6.
63. Messerli, F.H., et al., *Borderline hypertension and obesity: two prehypertensive states with elevated cardiac output*. Circulation, 1982. 66(1): p. 55-60.
64. Engeli, S. and A.M. Sharma, *The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension*. J Mol Med, 2001. 79(1): p. 21-9.
65. Gami, A.S., et al., *Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2007. 49(5): p. 565-71.
66. Gami, A.S., et al., *Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea*. Circulation, 2004. 110(4): p. 364-7.
67. Mehra, R., et al., *Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(8): p. 910-6.
68. Kanagala, R., et al., *Obstructive sleep apnea and the recurrence of atrial fibrillation*. Circulation, 2003. 107(20): p. 2589-94.
69. Wang, T.J., et al., *A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study*. JAMA, 2003. 290(8): p. 1049-56.

70. Wolf, P.A., et al., *Impact of atrial fibrillation on mortality, stroke, and medical costs*. Arch Intern Med, 1998. 158(3): p. 229-34.
71. Nattel, S., *Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation*. Cardiovasc Res, 1999. 42(2): p. 298-308.
72. Wijffels, M.C., et al., *Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats*. Circulation, 1995. 92(7): p. 1954-68.
73. Garratt, C.J., et al., *Repetitive electrical remodeling by paroxysms of atrial fibrillation in the goat: no cumulative effect on inducibility or stability of atrial fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. 10(8): p. 1101-8.
74. Allessie, M.A., et al., *Electrophysiologic mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation*. Am J Cardiol, 1996. 77(3): p. 10A-23A.
75. Friberg, J., et al., *Comparison of the impact of atrial fibrillation on the risk of stroke and cardiovascular death in women versus men (The Copenhagen City Heart Study)*. Am J Cardiol, 2004. 94(7): p. 889-94
76. Mabo P, Pavin D, Donal E. [Rate control or rhythm control]. Ann Cardiol Angeiol (Paris). 2009 Dec;58 Suppl 1:S31-4. French.
77. Crijns HJ. Rate versus rhythm control in patients with atrial fibrillation: what the trials really say. Drugs. 2005;65(12):1651-67. Review.
78. Chen, S.A., et al., *Radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation initiated by pulmonary vein ectopic beats*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2000. 11(2): p. 218-27.
79. Haissaguerre, M., et al., *Catheter ablation of chronic atrial fibrillation targeting the reinitiating triggers*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2000. 11(1): p. 2-10.
80. Haissaguerre, M., et al., *Electrophysiological end point for catheter ablation of atrial fibrillation initiated from multiple pulmonary venous foci*. Circulation, 2000. 101(12): p. 1409-17.
81. Haissaguerre, M., et al., *Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins*. Circulation, 2000. 102(20): p. 2463-5.
82. Natale, A., et al., *First human experience with pulmonary vein isolation using a through-the-balloon circumferential ultrasound ablation system for recurrent atrial fibrillation*. Circulation, 2000. 102(16): p. 1879-82.
83. Pappone, C., et al., *Circumferential radiofrequency ablation of pulmonary vein ostia: A new anatomic approach for curing atrial fibrillation*. Circulation, 2000. 102(21): p. 2619-28.

84. Robbins, I.M., et al., *Pulmonary vein stenosis after catheter ablation of atrial fibrillation*. *Circulation*, 1998. 98(17): p. 1769-75.
85. Taylor, G.W., et al., *Pathological effects of extensive radiofrequency energy applications in the pulmonary veins in dogs*. *Circulation*, 2000. 101(14): p. 1736-42.
86. Thomas, L., et al., *Comparison of left atrial volume and function after linear ablation and after cardioversion for chronic atrial fibrillation*. *Am J Cardiol*, 2004. 93(2): p. 165-70.
87. Le Heuzey, J.Y., et al., *Cost of care distribution in atrial fibrillation patients: the COCAF study*. *Am Heart J*, 2004. 147(1): p. 121-6.
88. Nathan, H. and M. Eliakim, *The junction between the left atrium and the pulmonary veins. An anatomic study of human hearts*. *Circulation*, 1966. 34(3): p. 412-22.
89. Haissaguerre, M., et al., *Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins*. *N Engl J Med*, 1998. 339(10): p. 659-66.
90. Coumel, P., *Management of atrial fibrillation*. *Isr J Med Sci*, 1996. 32(10): p. 871-2
91. Nattel, S. and L.H. Opie, *Controversies in atrial fibrillation*. *Lancet*, 2006. 367(9506): p. 262-72
92. Fynn, S.P. and J.M. Kalman, *Pulmonary veins: anatomy, electrophysiology, tachycardia, and fibrillation*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2004. 27(11): p. 1547-59.
93. Hsieh, M.H., et al., *Mechanism of spontaneous transition from typical atrial flutter to atrial fibrillation: role of ectopic atrial fibrillation foci*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2001. 24(1): p. 46-52.
94. Jais, P., et al., *A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation*. *Circulation*, 1997. 95(3): p. 572-6.
95. Tsai, C.F., et al., *Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the superior vena cava: electrophysiological characteristics and results of radiofrequency ablation*. *Circulation*, 2000. 102(1): p. 67-74.
96. Doshi, R.N., et al., *Relation between ligament of Marshall and adrenergic atrial tachyarrhythmia*. *Circulation*, 1999. 100(8): p. 876-83
97. Todd, D.M., et al., *Role of the posterior left atrium and pulmonary veins in human lone atrial fibrillation: electrophysiological and pathological data from patients undergoing atrial fibrillation surgery*. *Circulation*, 2003. 108(25): p. 3108-14.
98. Kumagai, K., et al., *Role of rapid focal activation in the maintenance of atrial fibrillation originating from the pulmonary veins*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2000. 23(11 Pt 2): p. 1823-7

99. Pappone, C., et al., *Circumferential radiofrequency ablation of pulmonary vein ostia: A new anatomic approach for curing atrial fibrillation*. *Circulation*, 2000. 102(21): p. 2619-28.
100. Natale, A., et al., *First human experience with pulmonary vein isolation using a through-the-balloon circumferential ultrasound ablation system for recurrent atrial fibrillation*. *Circulation*, 2000. 102(16): p. 1879-82
101. Coumel, P., *Paroxysmal atrial fibrillation: a disorder of autonomic tone?* *Eur Heart J*, 1994. 15 Suppl A: p. 9-16.
102. Verrier, R.L. and C. Antzelevitch, *Autonomic aspects of arrhythmogenesis: the enduring and the new*. *Curr Opin Cardiol*, 2004. 19(1): p. 2-11.
103. Ninomiya, I., *Direct evidence of nonuniform distribution of vagal effects on dog atria*. *Circ Res*, 1966. 19(3): p. 576-83.
104. Liu, L. and S. Nattel, *Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity*. *Am J Physiol*, 1997. 273(2 Pt 2): p. H805-16.
105. Coumel, P., et al., *[Atrial arrhythmias of vagal or catecholaminergic origin: comparative effects of beta-blocker treatment and the escape phenomenon]*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1982. 75(4): p. 373-87.
106. Eckberg, D.L., *Sympathovagal balance: a critical appraisal*. *Circulation*, 1997. 96(9): p. 3224-32.
107. Chen, J., S.L. Wasmund, and M.H. Hamdan, *Back to the future: the role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation*. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2006. 29(4): p. 413-21
108. Chevalier, P., et al., *Quantitative study of nerves of the human left atrium*. *Heart Rhythm*, 2005. 2(5): p. 518-22.
109. Armour, J.A., et al., *Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system*. *Anat Rec*, 1997. 247(2): p. 289-98.
110. Marron, K., et al., *Distribution, morphology, and neurochemistry of endocardial and epicardial nerve terminal arborizations in the human heart*. *Circulation*, 1995. 92(8): p. 2343-51.
111. Wharton, J., et al., *Immunohistochemical demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation*. *Circ Res*, 1990. 66(4): p. 900-12

112. Chiou, C.W., J.N. Eble, and D.P. Zipes, *Efferent vagal innervation of the canine atria and sinus and atrioventricular nodes. The third fat pad*. *Circulation*, 1997. 95(11): p. 2573-84.
113. Reuter, H., *Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs*. *Nature*, 1983. 301(5901): p. 569-74.
114. Bennett, P.B. and T.B. Begenisich, *Catecholamines modulate the delayed rectifying potassium current (IK) in guinea pig ventricular myocytes*. *Pflugers Arch*, 1987. 410(1-2): p. 217-9.
115. DiFrancesco, D., et al., *Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node*. *J Physiol*, 1986. 377: p. 61-88
116. Boyett, M.R., et al., *Ionic basis of the chronotropic effect of acetylcholine on the rabbit sinoatrial node*. *Cardiovasc Res*, 1995. 29(6): p. 867-78.
117. Noma, A. and W. Trautwein, *Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell*. *Pflugers Arch*, 1978. 377(3): p. 193-200.
118. Coumel, P., *Clinical approach to paroxysmal atrial fibrillation*. *Clin Cardiol*, 1990. 13(3): p. 209-12
119. Bettoni, M. and M. Zimmermann, *Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation*. *Circulation*, 2002. 105(23): p. 2753-9
120. Hwang, C., H.S. Karagueuzian, and P.S. Chen, *Idiopathic paroxysmal atrial fibrillation induced by a focal discharge mechanism in the left superior pulmonary vein: possible roles of the ligament of Marshall*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999. 10(5): p. 636-48.
121. Chen, S.A., et al., *Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation*. *Circulation*, 1999. 100(18): p. 1879-86.
122. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N. Characterization of in vivo and in vitro electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel IKACH blocker, NIP-151: a comparison with an IKr-blocker dofetilide. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Feb;51(2):162-9
123. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N. Tertiapin, a selective IKACH blocker, terminates atrial fibrillation with selective atrial effective refractory period prolongation. *Pharmacol Res*. 2006 Aug;54(2):136-41).

124. Oral, H., et al., *Pulmonary vein isolation for vagotonic, adrenergic, and random episodes of paroxysmal atrial fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2004. 15(4): p. 402-6.
125. Zimmermann, M. and D. Kalusche, *Fluctuation in autonomic tone is a major determinant of sustained atrial arrhythmias in patients with focal ectopy originating from the pulmonary veins*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2001. 12(3): p. 285-91.
126. Sharifov, O.F., et al., *Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs*. J Am Coll Cardiol, 2004. 43(3): p. 483-90
127. Gould, P.A., et al., *Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation*. Pacing Clin Electrophysiol, 2006. 29(8): p. 821-9
128. Chang, C.M., et al., *Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing*. Circulation, 2001. 103(1): p. 22-5
129. Jayachandran, J.V., et al., *Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation*. Circulation, 2000. 101(10): p. 1185-91
130. Pappone, C., et al., *Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation*. Circulation, 2004. 109(3): p. 327-34.
131. Okuyama, Y., et al., *Nerve sprouting induced by radiofrequency catheter ablation in dogs*. Heart Rhythm, 2004. 1(6): p. 712-7
132. Schauerte, P., et al., *Focal atrial fibrillation: experimental evidence for a pathophysiologic role of the autonomic nervous system*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2001. 12(5): p. 592-9.
133. Schauerte, P., et al., *Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of vagal atrial fibrillation*. Circulation, 2000. 102(22): p. 2774-80.
134. Tai, C.T., et al., *Effect of phenylephrine on focal atrial fibrillation originating in the pulmonary veins and superior vena cava*. J Am Coll Cardiol, 2000. 36(3): p. 788-93
135. Lombardi, F., et al., *Heart rate variability and early recurrence of atrial fibrillation after electrical cardioversion*. J Am Coll Cardiol, 2001. 37(1): p. 157-62.
136. Lombardi, F., et al., *Autonomic nervous system and paroxysmal atrial fibrillation: a study based on the analysis of RR interval changes before, during and after paroxysmal atrial fibrillation*. Eur Heart J, 2004. 25(14): p. 1242-8.

137. Chen, Y.J., et al., *Inducibility of atrial fibrillation during atrioventricular pacing with varying intervals: role of atrial electrophysiology and the autonomic nervous system.* J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. 10(12): p. 1578-85
138. Ghias, M., et al., *The role of ganglionated plexi in apnea-related atrial fibrillation.* J Am Coll Cardiol, 2009. 54(22): p. 2075-83.
139. Roche, F., et al., *Relationship among the severity of sleep apnea syndrome, cardiac arrhythmias, and autonomic imbalance.* Pacing Clin Electrophysiol, 2003. 26(3): p. 669-77.
140. Niroumand, M., et al., *Impact of obstructive sleep apnea on left ventricular mass and diastolic function.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(7): p. 1632-6
141. Kalifa, J., et al., *Intra-atrial pressure increases rate and organization of waves emanating from the superior pulmonary veins during atrial fibrillation.* Circulation, 2003. 108(6): p. 668-71.
142. Nattel, S., *New ideas about atrial fibrillation 50 years on.* Nature, 2002. 415(6868): p. 219-26.
143. Page, R.L. and D.M. Roden, *Drug therapy for atrial fibrillation: where do we go from here?* Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(11): p. 899-910.
144. Pappone, C., *Atrial fibrillation--a curable condition?* Eur Heart J, 2002. 23(7): p. 514-7.
145. Wijffels, M.C. and H.J. Crijns, *Non-invasive characteristics of atrial fibrillation: the value of Holter recordings for the treatment of AF.* Card Electrophysiol Rev, 2002. 6(3): p. 233-8.
146. Masani, F., *Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats: an ultrastructural study.* J Anat, 1986. 145: p. 133-42.
147. Perez-Lugones, A., et al., *Evidence of specialized conduction cells in human pulmonary veins of patients with atrial fibrillation.* J Cardiovasc Electrophysiol, 2003. 14(8): p. 803-9.
148. Chen, Y.J., et al., *Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation.* Cardiovasc Res, 2000. 48(2): p. 265-73.
149. Verheule, S., et al., *Tissue structure and connexin expression of canine pulmonary veins.* Cardiovasc Res, 2002. 55(4): p. 727-38.

150. Chen, Y.J., et al., *Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation*. *Circulation*, 2001. 104(23): p. 2849-54.
151. Jalife, J., O. Berenfeld, and M. Mansour, *Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2002. 54(2): p. 204-16.
152. Scherlag, B.J., et al., *Endovascular stimulation within the left pulmonary artery to induce slowing of heart rate and paroxysmal atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2002. 54(2): p. 470-5.
153. Miyauchi, Y., M.C. Fishbein, and H.S. Karagueuzian, *Electrical current-induced atrial and pulmonary vein action potential duration shortening and repetitive activity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(1): p. H178-86.
154. Patterson, E., et al., *Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation*. *Heart Rhythm*, 2005. 2(6): p. 624-31
155. Bosch, R.F. and S. Nattel, *Cellular electrophysiology of atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2002. 54(2): p. 259-69.
156. Khan, R., *Identifying and understanding the role of pulmonary vein activity in atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2004. 64(3): p. 387-94.
157. Melnyk, P., et al., *Comparison of ion channel distribution and expression in cardiomyocytes of canine pulmonary veins versus left atrium*. *Cardiovasc Res*, 2005. 65(1): p. 104-16.
158. Chen, S.A. and H.I. Yeh, *Specialized conduction cells in human pulmonary veins: fact and controversy*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003. 14(8): p. 810-1.
159. Wijffels, M.C., et al., *Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats*. *Circulation*, 1995. 92(7): p. 1954-68.
160. Allesie, M.A., *Atrial electrophysiologic remodeling: another vicious circle?* *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1998. 9(12): p. 1378-93.
161. Nattel, S., *Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 1999. 42(2): p. 298-308.
162. Nattel, S. and D. Li, *Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation*. *Circ Res*, 2000. 87(6): p. 440-7.
163. Nattel, S., D. Li, and L. Yue, *Basic mechanisms of atrial fibrillation--very new insights into very old ideas*. *Annu Rev Physiol*, 2000. 62: p. 51-77.

164. Allessie, M.A., et al., *Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation*. Circulation, 2001. 103(5): p. 769-77.
165. Spach, M.S., *Changes in the topology of gap junctions as an adaptive structural response of the myocardium*. Circulation, 1994. 90(2): p. 1103-6.
166. Hobbs, W.J., et al., *The role of atrial electrical remodeling in the progression of focal atrial ectopy to persistent atrial fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. 10(6): p. 866-70.
167. Wu, T.J., et al., *Pulmonary veins and ligament of Marshall as sources of rapid activations in a canine model of sustained atrial fibrillation*. Circulation, 2001. 103(8): p. 1157-63.
168. Sueda, T., et al., *Efficacy of pulmonary vein isolation for the elimination of chronic atrial fibrillation in cardiac valvular surgery*. Ann Thorac Surg, 2001. 71(4): p. 1189-93.
169. Arora, R., et al., *Arrhythmogenic substrate of the pulmonary veins assessed by high-resolution optical mapping*. Circulation, 2003. 107(13): p. 1816-21.
170. Nahum et al Production of auricular fibrillation by applications of acetyl-beta-methylcholine to localized regions of the auricular surface. Am J Physiol 1940;129-248
171. Kumagai K, et al. Electrophysiological properties in chronic lone atrial fibrillation. Circulation. 1991 Oct;84(4):1662-8.
172. Nadeau et al Role of the sinus node in the mechanism of cholinergic atrial fibrillation Circ Res 1970;27:129
173. Ausma, J., et al., *Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat*. Circulation, 1997. 96(9): p. 3157-63.
174. Ausma, J., et al., *Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes as a result of chronic atrial fibrillation*. Am J Pathol, 1997. 151(4): p. 985-97.
175. Everett, T.H.t., et al., *Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation*. Circulation, 2000. 102(12): p. 1454-60.
176. Thijssen, V.L., J. Ausma, and M. Borgers, *Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival*. Cardiovasc Res, 2001. 52(1): p. 14-24.
177. Ausma, J., et al., *Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the goat*. J Mol Cell Cardiol, 2001. 33(12): p. 2083-94.

178. Frustaci, A., et al., *Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation*. *Circulation*, 1997. 96(4): p. 1180-4.
179. Thijssen, V.L., et al., *Structural changes of atrial myocardium during chronic atrial fibrillation*. *Cardiovasc Pathol*, 2000. 9(1): p. 17-28.
180. Aime-Sempe, C., et al., *Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 34(5): p. 1577-86.
181. Tieleman, R.G. and H.J. Crijns, *The 'second factor' of tachycardia-induced atrial remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2000. 46(3): p. 364-6.
182. Spach, M.S. and P.C. Dolber, *Relating extracellular potentials and their derivatives to anisotropic propagation at a microscopic level in human cardiac muscle. Evidence for electrical uncoupling of side-to-side fiber connections with increasing age*. *Circ Res*, 1986. 58(3): p. 356-71
183. Jongsma, H.J. and R. Wilders, *Gap junctions in cardiovascular disease*. *Circ Res*, 2000. 86(12): p. 1193-7.
184. Saffitz, J.E., R.B. Schuessler, and K.A. Yamada, *Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias*. *Cardiovasc Res*, 1999. 42(2): p. 309-17.
185. Severs, N.J., et al., *Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system*. *Microsc Res Tech*, 2001. 52(3): p. 301-22.
186. Litchenberg, W.H., et al., *The rate and anisotropy of impulse propagation in the postnatal terminal crest are correlated with remodeling of Cx43 gap junction pattern*. *Cardiovasc Res*, 2000. 45(2): p. 379-87
187. Van der Velden HM, Jongsma HJ. *Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets*. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):270-9. Review.
188. Coppen, S.R., et al., *Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart*. *Circ Res*, 1998. 82(2): p. 232-43.
189. Davis, L.M., et al., *Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties*. *J Am Coll Cardiol*, 1994. 24(4): p. 1124-32.
190. Van der Velden, H.M., et al., *Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1998. 9(6): p. 596-607.

191. Verheule S, et al. *Tissue structure and connexin expression of canine pulmonary veins.* *Cardiovasc Res.* 2002 Sep;55(4):727-38.
192. Vozzi, C., et al., *Chamber-related differences in connexin expression in the human heart.* *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31(5): p. 991-1003.
193. Kanagaratnam P, et al. 2004. *Relationship between connexins in atrial activation during human atrial fibrillation.* *J Cardiovasc Electrophysiol.* 15:206-213.
194. Polontchouk L, et al. *Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria.* *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38:883-91
195. Wilhelm M, et al. *Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, and postoperative atrial fibrillation.* *Heart Lung Circ.* 2006 Feb;15(1):30-7.
196. Takeuchi S, et al. *Disorganization of gap junction distribution in dilated atria of patients with chronic atrial fibrillation.* *Circ J.* 2006 May;70(5):575-82.
197. Kostin S, Klein G, Szalahy Z et al. *Structural correlate of atrial fibrillation in human patients.* *Cardiovasc Res.* 2002; 54:361-79
198. Kaprielian RR, et al. 1998. *Downregulation of immuno-detectable connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human ventricle.* *Circulation.* 97:651-660
199. Chaldoupi SM, et al. *The role of connexin40 in atrial fibrillation.* *Cardiovasc Res.* 2009 Oct 1;84(1):15-23. Epub 2009 Jun 17. Review.
200. Luke, R.A. and J.E. Saffitz, *Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones.* *J Clin Invest*, 1991. 87(5): p. 1594-602.
201. Smith, J.H., et al., *Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy.* *Am J Pathol*, 1991. 139(4): p. 801-21.
202. Peters, N.S., et al., *Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia.* *Circulation*, 1997. 95(4): p. 988-96.
203. Sepp, R., N.J. Severs, and R.G. Gourdie, *Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy.* *Heart*, 1996. 76(5): p. 412-7.
204. Dupont, E., et al., *Altered connexin expression in human congestive heart failure.* *J Mol Cell Cardiol*, 2001. 33(2): p. 359-71.
205. Peters, N.S. and A.L. Wit, *Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis.* *Circulation*, 1998. 97(17): p. 1746-54.

206. Van Veen, A.A., H.V. van Rijen, and T. Opthof, *Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties*. Cardiovasc Res, 2001. 51(2): p. 217-29.
207. Kostin, S. and J. Schaper, *Tissue-specific patterns of Gap junctions in adult rat atrial and ventricular cardiomyocytes in vivo and in vitro*. Circ Res, 2001. 88(9): p. 933-9.
208. Verheule, S., et al., *Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium*. Circ Res, 1997. 80(5): p. 673-81.
209. Gros, D.B. and H.J. Jongsma, *Connexins in mammalian heart function*. Bioessays, 1996. 18(9): p. 719-30.
210. Kwong, K.F., et al., *Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node*. Circ Res, 1998. 82(5): p. 604-12.
211. Verheule, S., et al., *Gap junctions in the rabbit sinoatrial node*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. 280(5): p. H2103-15.
212. Cheung, D.W., *Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig*. J Physiol, 1981. 314: p. 445-56.
213. Ho, S.Y., et al., *Anatomy of the left atrium: implications for radiofrequency ablation of atrial fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. 10(11): p. 1525-33.
214. Ho, S.Y., et al., *Architecture of the pulmonary veins: relevance to radiofrequency ablation*. Heart, 2001. 86(3): p. 265-70.
215. Chen, S.A., et al., *Pathophysiology of the pulmonary vein as an atrial fibrillation initiator*. Pacing Clin Electrophysiol, 2003. 26(7 Pt 2): p. 1576-82.
216. Hassink, R.J., et al., *Morphology of atrial myocardium in human pulmonary veins: a postmortem analysis in patients with and without atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2003. 42(6): p. 1108-14.
217. Kholova, I. and J. Kautzner, *Anatomic characteristics of extensions of atrial myocardium into the pulmonary veins in subjects with and without atrial fibrillation*. Pacing Clin Electrophysiol, 2003. 26(6): p. 1348-55.
218. Steiner, I., et al., *Myocardial sleeves of pulmonary veins and atrial fibrillation: a postmortem histopathological study of 100 subjects*. Virchows Arch, 2006. 449(1): p. 88-95.
219. Mommersteeg, M.T., et al., *Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium*. Circ Res, 2007. 101(9): p. 902-9.

220. Mueller-Hoecker, J., et al., *Of rodents and humans: a light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in pulmonary veins*. Int J Med Sci, 2008. 5(3): p. 152-8.
221. Tsao, H.M., et al., *Pulmonary vein dilation in patients with atrial fibrillation: detection by magnetic resonance imaging*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2001. 12(7): p. 809-13.
222. Chen, Y.J. and S.A. Chen, *Electrophysiology of pulmonary veins*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006. 17(2): p. 220-4.
223. Lin, W.S., et al., *Pulmonary vein morphology in patients with paroxysmal atrial fibrillation initiated by ectopic beats originating from the pulmonary veins: implications for catheter ablation*. Circulation, 2000. 101(11): p. 1274-81
224. Bode, F., F. Sachs, and M.R. Franz, *Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation*. Nature, 2001. 409(6816): p. 35-6.
225. Chen, Y.J., et al., *Electrophysiology of single cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary veins: implication in initiation of focal atrial fibrillation*. Basic Res Cardiol, 2002. 97(1): p. 26-34
226. DiFrancesco, D., *Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells*. Nature, 1986. 324(6096): p. 470-3.
227. Tseng, G.N. and A.L. Wit, *Characteristics of a transient inward current that causes delayed afterdepolarizations in atrial cells of the canine coronary sinus*. J Mol Cell Cardiol, 1987. 19(11): p. 1105-19.
228. Cheung, D.W., *Pulmonary vein as an ectopic focus in digitalis-induced arrhythmia*. Nature, 1981. 294(5841): p. 582-4.
229. Hamabe, A., et al., *Correlation between anatomy and electrical activation in canine pulmonary veins*. Circulation, 2003. 107(11): p. 1550-5.
230. Hocini, M., et al., *Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation*. Circulation, 2002. 105(20): p. 2442-8.
231. Jais, P., et al., *Distinctive electrophysiological properties of pulmonary veins in patients with atrial fibrillation*. Circulation, 2002. 106(19): p. 2479-85.
232. Kucera, J.P. and Y. Rudy, *Mechanistic insights into very slow conduction in branching cardiac tissue: a model study*. Circ Res, 2001. 89(9): p. 799-806.
233. Li, D., et al., *Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort*. Circulation, 1999. 100(1): p. 87-95.

234. Weber, K.T., C.G. Brilla, and J.S. Janicki, *Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors*. Cardiovasc Res, 1993. 27(3): p. 341-8.
235. Goette, A., et al., *Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2000. 35(6): p. 1669-77.
236. Goette, A., et al., *Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans*. Circulation, 2000. 101(23): p. 2678-81
237. Hatem S. Atrial fibrillation: the tip of the iceberg. Arch Mal Coeur Vaiss. 2002 Sep;95(9):827-32.
238. Liu, T. and G. Li, *Is atrial fibrillation an inflammatory disease?* Med Hypotheses, 2005. 64(6): p. 1237-8.
239. Chung, M.K., et al., *C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation*. Circulation, 2001. 104(24): p. 2886-91.
240. Bruins, P., et al., *Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia*. Circulation, 1997. 96(10): p. 3542-8.
241. Gaudino M, et al. *The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication?* Circulation. 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II195-9.
242. Aviles, R.J., et al., *Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation*. Circulation, 2003. 108(24): p. 3006-10.
243. Dernellis, J. and M. Panaretou, *C-reactive protein and paroxysmal atrial fibrillation: evidence of the implication of an inflammatory process in paroxysmal atrial fibrillation*. Acta Cardiol, 2001. 56(6): p. 375-80.
244. Schnabel, R.B., et al., *Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation*. Am J Cardiol, 2009. 104(1): p. 92-6.
245. Kallergis EM, et al. *The role of the post-cardioversion time course of hs-CRP levels in clarifying the relationship between inflammation and persistence of atrial fibrillation*. Heart. 2008 Feb;94(2):200-4.
246. Elahi, M.M., et al. *Tracing the origins of postoperative atrial fibrillation: the concept of oxidative stress-mediated myocardial injury phenomenon*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2008. 15(6): p. 735-41

247. Tselentakis EV, et al. *Inflammation effects on the electrical properties of atrial tissue and inducibility of postoperative atrial fibrillation*. J Surg Res. 2006 Sep;135(1):68-75.
248. Ishii, Y., et al., *Inflammation of atrium after cardiac surgery is associated with inhomogeneity of atrial conduction and atrial fibrillation*. Circulation, 2005. 111(22): p. 2881-8
249. Ryu K, et al. *Effects of sterile pericarditis on connexins 40 and 43 in the atria: correlation with abnormal conduction and atrial arrhythmias*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Aug;293(2):H1231-41. Epub 2007 Apr 13
250. Roberts, R., *Mechanisms of disease: Genetic mechanisms of atrial fibrillation*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. 3(5): p. 276-82.
251. Ellinor PT, et al. *Familial aggregation in lone atrial fibrillation*. Hum Genet. 2005 Nov;118(2):179-84.
252. Roden, D.M., *Human genomics and its impact on arrhythmias*. Trends Cardiovasc Med, 2004. 14(3): p. 112-6.
253. Sinner, M.F., A. Pfeufer, and S. Kaab, [*Genetics of atrial fibrillation: rare mutations, common variants and clinical relevance?*]. Herzschriltmacherther Elektrophysiol, 2006. 17(2): p. 95-105.
254. Arnar, D.O., et al., *Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland*. Eur Heart J, 2006. 27(6): p. 708-12.
255. Andalib, A., R. Brugada, and S. Nattel, *Atrial fibrillation: evidence for genetically determined disease*. Curr Opin Cardiol, 2008. 23(3): p. 176-83.
256. Mommersteeg, M.T., et al., *Atrial fibrillation: A developmental point of view*. Heart Rhythm, 2009.
257. Tsai, C.T., et al., *Molecular genetics of atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2008. 52(4): p. 241-50
258. Lubitz, S.A., B.A. Yi, and P.T. Ellinor, *Genetics of atrial fibrillation*. Cardiol Clin, 2009. 27(1): p. 25-33, vii.
- 259 Benjamin, E.J., et al., *Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry*. Nat Genet, 2009. 41(8): p. 879-81.
260. Darbar, D., et al., *Prolonged signal-averaged P-wave duration as an intermediate phenotype for familial atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(11): p. 1083-9.
261. Volders, P.G., et al., *Mapping a novel locus for familial atrial fibrillation on chromosome 10p11-q21*. Heart Rhythm, 2007. 4(4): p. 469-75.

262. Ellinor, P.T., et al., *Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16*. *Circulation*, 2003. 107(23): p. 2880-3.
263. Darbar, D., et al., *Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41(12): p. 2185-92.
264. Kaab, S., et al., *Large scale replication and meta-analysis of variants on chromosome 4q25 associated with atrial fibrillation*. *Eur Heart J*, 2009. 30(7): p. 813-9.
265. Viviani Anselmi, C., et al., *Association of rs2200733 at 4q25 with atrial flutter/fibrillation diseases in an Italian population*. *Heart*, 2008. 94(11): p. 1394-6.
266. Pfeufer A, et al. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):153-9.
267. Oberti, C., et al., *Genome-wide linkage scan identifies a novel genetic locus on chromosome 5p13 for neonatal atrial fibrillation associated with sudden death and variable cardiomyopathy*. *Circulation*, 2004. 110(25): p. 3753-9
268. Ellinor, P.T., et al., *Potassium channel gene mutations rarely cause atrial fibrillation*. *BMC Med Genet*, 2006. 7: p. 70
269. Hatem SN, et al. *Specificities of atrial electrophysiology: Clues to a better understanding of cardiac function and the mechanisms of arrhythmias*. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Jan;48(1):90-5. Epub 2009 Sep 8. Review.
270. Abraham, R.L., et al., *Augmented potassium current is a shared phenotype for two genetic defects associated with familial atrial fibrillation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009.
271. Das, S., et al., *Mutation in the S3 segment of KCNQ1 results in familial lone atrial fibrillation*. *Heart Rhythm*, 2009. 6(8): p. 1146-53.
272. Lundby, A., et al., *KCNQ1 mutation Q147R is associated with atrial fibrillation and prolonged QT interval*. *Heart Rhythm*, 2007. 4(12): p. 1532-41.
273. Otway, R., et al., *Stretch-sensitive KCNQ1 mutation A link between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atrial fibrillation?* *J Am Coll Cardiol*, 2007. 49(5): p. 578-86.
274. Prystupa, A., et al., *MinK gene polymorphism in the pathogenesis of lone atrial fibrillation*. *Kardiol Pol*, 2006. 64(11): p. 1205-11; discussion 1212-3.
275. Fatini, C., et al., *Analysis of minK and eNOS genes as candidate loci for predisposition to non-valvular atrial fibrillation*. *Eur Heart J*, 2006. 27(14): p. 1712-8.
276. Ehrlich, J.R., et al., *Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization*. *Cardiovasc Res*, 2005. 67(3): p. 520-8.

277. Lai, L.P., et al., *Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation*. *Am Heart J*, 2002. 144(3): p. 485-90.
278. Xu, L.X., et al., [*Study on the correlation between CETP TaqIB, KCNE1 S38G and eNOS T-786C gene polymorphisms for predisposition and non-valvular atrial fibrillation*]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2008. 29(5): p. 486-92.
279. Yang, Y., et al., *Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation*. *Am J Hum Genet*, 2004. 75(5): p. 899-905.
280. Lundby, A., et al., *KCNE3 mutation V17M identified in a patient with lone atrial fibrillation*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. 21(1-3): p. 47-54.
281. Ma, K.J., et al., *Modulation of KCNQ1 current by atrial fibrillation-associated KCNE4 (145E/D) gene polymorphism*. *Chin Med J (Engl)*, 2007. 120(2): p. 150-4.
282. Ravn, L.S., et al., *Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation*. *Am J Cardiol*, 2005. 96(3): p. 405-7.
283. Plante, I., et al., *A pilot study to estimate the feasibility of assessing the relationships between polymorphisms in hKv1.5 and atrial fibrillation in patients following coronary artery bypass graft surgery*. *Can J Cardiol*, 2008. 24(1): p. 41-4.
284. Drolet, B., et al., *Ischemic, genetic and pharmacological origins of cardiac arrhythmias: the contribution of the Quebec Heart Institute*. *Can J Cardiol*, 2007. 23 Suppl B: p. 15B-22B.
285. Olson, T.M., et al., *Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation*. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(14): p. 2185-91.
286. Yang, Y., et al., *Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation*. *J Hum Genet*, 2009. 54(5): p. 277-83.
287. Zhang, C., et al., *The single nucleotide polymorphisms of Kir3.4 gene and their correlation with lone paroxysmal atrial fibrillation in Chinese Han population*. *Heart Lung Circ*, 2009. 18(4): p. 257-61.
288. Ellinor, P.T., et al., *Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation*. *Nat Genet*, 2010. 42(3): p. 240-4.
289. Schreieck, J., et al., *C825T polymorphism of the G-protein beta3 subunit gene and atrial fibrillation: association of the TT genotype with a reduced risk for atrial fibrillation*. *Am Heart J*, 2004. 148(3): p. 545-50.
290. Ruan, Y., N. Liu, and S.G. Priori, *Sodium channel mutations and arrhythmias*. *Nat Rev Cardiol*, 2009. 6(5): p. 337-48.

291. Kusano, K.F., et al., *Atrial fibrillation in patients with Brugada syndrome relationships of gene mutation, electrophysiology, and clinical backgrounds*. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(12): p. 1169-75.
292. Li, Q., et al., *Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 380(1): p. 132-7.
293. Ellinor, P.T., et al., *Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2008. 5(1): p. 99-105.
294. Olson, T.M., et al., *Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation*. JAMA, 2005. 293(4): p. 447-54.
295. Chen, L.Y., et al., *A common polymorphism in SCN5A is associated with lone atrial fibrillation*. Clin Pharmacol Ther, 2007. 81(1): p. 35-41.
296. Benito, B., et al., *A mutation in the sodium channel is responsible for the association of long QT syndrome and familial atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2008. 5(10): p. 1434-40.
297. Makiyama, T., et al., *A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2008. 52(16): p. 1326-34.
298. Watanabe, H., et al., *Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009. 2(3): p. 268-75.
299. Hove-Madsen L, et al. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. Circulation. 2004 Sep 14;110(11):1358-63.
300. Nyberg, M.T., et al., *The variation of the sarcolipin gene (SLN) in atrial fibrillation, long QT syndrome and sudden arrhythmic death syndrome*. Clin Chim Acta, 2007. 375(1-2): p. 87-91.
301. Gai, X., et al., *Association of MMP-9 gene polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients*. Clin Chim Acta, 2009. 408(1-2): p. 105-9.
302. Kato, K., et al., *Genetic factors for lone atrial fibrillation*. Int J Mol Med, 2007. 19(6): p. 933-9.
303. Gai, X., et al., *MMP-2 and TIMP-2 gene polymorphisms and susceptibility to atrial fibrillation in Chinese Han patients with hypertensive heart disease*. Clin Chim Acta, 2010.

304. Olson, T.M., et al., *KATP channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007. 4(2): p. 110-6.
305. Bedi, M., et al., *Genetic susceptibility to atrial fibrillation in patients with congestive heart failure*. *Heart Rhythm*, 2006. 3(7): p. 808-12.
306. Nikulina, S., et al., [*Genetics of atrial fibrillation*]. *Kardiologia*, 2009. 49(3): p. 43-8.
307. Tziakas, D.N., et al., *Effect of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype on collagen type I synthesis and degradation in patients with atrial fibrillation and arterial hypertension*. *Expert Opin Pharmacother*, 2007. 8(14): p. 2225-34.
308. Gensini F, et al. *Angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with atrial fibrillation*. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2003 Jan;26(1 Pt 2):295-8.
309. Fatini, C., et al., *Lone and secondary nonvalvular atrial fibrillation: role of a genetic susceptibility*. *Int J Cardiol*, 2007. 120(1): p. 59-65.
310. Amir, O., et al., *Aldosterone synthase gene polymorphism as a determinant of atrial fibrillation in patients with heart failure*. *Am J Cardiol*, 2008. 102(3): p. 326-9.
311. Cao, F.F., et al., [*Associations of the genetic polymorphisms in CYP11B2 gene with nonfamilial structural atrial fibrillation*]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2009. 30(10): p. 1069-72.
312. Wang, Q.S., et al., *Angiotensinogen polymorphisms and acquired atrial fibrillation in Chinese*. *J Electrocardiol*, 2009.
313. Nagai, T., et al., *A985G polymorphism of the endothelin-2 gene and atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. *Circ J*, 2007. 71(12): p. 1932-6.
314. Afzal, A.R., et al., *Association of Met439Thr substitution in heat shock protein 70 gene with postoperative atrial fibrillation and serum HSP70 protein levels*. *Cardiology*, 2008. 110(1): p. 45-52.
315. Motsinger, A.A., et al., *Risk factor interactions and genetic effects associated with post-operative atrial fibrillation*. *Pac Symp Biocomput*, 2006: p. 584-95.
316. Juang, J.M., et al., *The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation*. *Int J Cardiol*, 2007. 116(1): p. 107-12.
317. Hauer, R.N., et al., *Cx40 polymorphism in human atrial fibrillation*. *Adv Cardiol*, 2006. 42: p. 284-91.

318. Firouzi, M., et al., *The human Cx40 promoter polymorphism -44G-->A differentially affects transcriptional regulation by Sp1 and GATA4*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1759(10): p. 491-6.
319. Gollob, M.H., et al., *Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation*. *N Engl J Med*, 2006. 354(25): p. 2677-88.
320. Firouzi, M., et al., *Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation*. *Circ Res*, 2004. 95(4): p. e29-33.
321. Hatcher, C.J., M.S. Kim, and C.T. Basson, *Atrial form and function: lessons from human molecular genetics*. *Trends Cardiovasc Med*, 2000. 10(3): p. 93-101.
322. Boldt, L.H., et al., *Mutational analysis of the PITX2 and NKX2-5 genes in patients with idiopathic atrial fibrillation*. *Int J Cardiol*, 2009.
323. Postma, A.V., et al., *A gain-of-function TBX5 mutation is associated with atypical Holt-Oram syndrome and paroxysmal atrial fibrillation*. *Circ Res*, 2008. 102(11): p. 1433-42.
- 325 Roberts JACC 2010 Roberts JD, Gollob MH. *Impact of genetic discoveries on the classification of lone atrial fibrillation*. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Feb 23;55(8):705-12. Review.
326. Ausma, J., et al., *Changes in ultrastructural calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(3): p. 355-64.
327. Sun, H., et al., *Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes*. *Cardiovasc Res*, 2001. 49(4): p. 751-61.
328. Brundel, B.J., H.H. Kampinga, and R.H. Henning, *Calpain inhibition prevents pacing-induced cellular remodeling in a HL-1 myocyte model for atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2004. 62(3): p. 521-8.
329. Ausma, J., et al., *Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat*. *Circulation*, 2003. 107(15): p. 2051-8.
330. Xu, J., et al., *Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation*. *Circulation*, 2004. 109(3): p. 363-8.
331. Tan, A.Y., et al., *Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 48(1): p. 132-43.
332. Scherlag BJ, et al. *Autonomically induced conversion of pulmonary vein focal firing into atrial fibrillation*. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jun 7;45(11):1878-86.

333. Pagé PL, et al. *Regional distribution of atrial electrical changes induced by stimulation of extracardiac and intracardiac neural elements.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1995 Feb;109(2):377-88.
334. Morel, E., et al., *Identification and distribution of interstitial Cajal cells in human pulmonary veins.* Heart Rhythm, 2008. 5(7): p. 1063-7.
335. Mei, F., et al., *Interstitial cells of Cajal could regenerate and restore their normal distribution after disrupted by intestinal transection and anastomosis in the adult guinea pigs.* Virchows Arch, 2006. 449(3): p. 348-57.
336. Duquette, R.A., et al., *Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking?* Biol Reprod, 2005. 72(2): p. 276-83.
337. Bettolli, M., et al., *The use of rapid assessment of enteric ICC and neuronal morphology may improve patient management in pediatric surgery: a new clinical pathological protocol.* Pediatr Surg Int, 2006. 22(1): p. 78-83.
338. Hinescu, M.E., et al., *Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization.* J Cell Mol Med, 2006. 10(1): p. 243-57.
339. Popescu, L.M., et al., *Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC).* J Cell Mol Med, 2006. 10(2): p. 429-58.
340. Zarate, N., et al., *Intramuscular interstitial cells of Cajal associated with mast cells survive nitroergic nerves in achalasia.* Neurogastroenterol Motil, 2006. 18(7): p. 556-68.
341. Burns, A.J., et al., *Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry.* Cell Tissue Res, 1997. 290(1): p. 11-20.
342. Belzer, V., et al., *Coupling among interstitial cells of Cajal in the human ileum.* Neurogastroenterol Motil, 2004. 16(1): p. 75-80.
343. Povstyan, O.V., et al., *Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein.* Cell Calcium, 2003. 33(4): p. 223-39.
344. Maeda, H., et al., *Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system.* Development, 1992. 116(2): p. 369-75.
345. Huizinga, J.D., et al., *W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity.* Nature, 1995. 373(6512): p. 347-9.
346. Torihashi, S., et al., *c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract.* Cell Tissue Res, 1995. 280(1): p. 97-111.

347. Zarate, N., et al., *Intramuscular interstitial cells of Cajal associated with mast cells survive nitroergic nerves in achalasia*. *Neurogastroenterol Motil*, 2006. 18(7): p. 556-68.
348. Sperr, W.R., et al., *The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization*. *Blood*, 1994. 84(11): p. 3876-84.
349. Lecoin, L., G. Gabella, and N. Le Douarin, *Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel*. *Development*, 1996. 122(3): p. 725-33
350. Motro, B., et al., *Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci*. *Development*, 1991. 113(4): p. 1207-21.
351. Sanders, K.M., et al., *A Novel Pacemaker Mechanism Drives Gastrointestinal Rhythmicity*. *News Physiol Sci*, 2000. 15: p. 291-298.
352. Ward, S.M. and K.M. Sanders, *Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(3): p. G602-11.
353. Toyofuku, T., et al., *Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling*. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(12): p. 1204-11.
354. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. *Cell*, 1996. 86(3): p. 353-64.
355. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. *J Pathol*, 2004. 204(1): p. 1-10.
356. Fazel, S., et al., *Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines*. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1865-77.
357. Sanders, K.M., et al., *Development and plasticity of interstitial cells of Cajal*. *Neurogastroenterol Motil*, 1999. 11(5): p. 311-38.
358. Komuro, T., *Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract*. *J Physiol*, 2006. 576(Pt 3): p. 653-8
359. Cretoiu, D., et al., *Interstitial Cajal-like cells (ICLC) as steroid hormone sensors in human myometrium: immunocytochemical approach*. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(3): p. 789-95.
360. Gherghiceanu, M., et al., *Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in myocardial sleeves of human pulmonary veins*. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(5A): p. 1777-81.

361. Kostin, S. and L.M. Popescu, *A distinct type of cell in myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLCs)*. J Cell Mol Med, 2009. 13(2): p. 295-308.
362. Popescu, L.M., S.M. Ciontea, and D. Cretoiu, *Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1101: p. 139-65.
363. Popescu, L.M., et al., *Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches*. J Cell Mol Med, 2009. 13(5): p. 866-86.
364. Popescu, L.M., et al., *Interstitial cells of Cajal in pancreas*. J Cell Mol Med, 2005. 9(1): p. 169-90.
365. Suciu, L., et al., *Epicardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC) highlighted by immunofluorescence*. J Cell Mol Med, 2009. 13(4): p. 771-7.
366. Harhun, M.I., et al., *Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein*. Circ Res, 2004. 95(6): p. 619-26.
367. Hermsmeyer, K., *Multiple pacemaker sites in spontaneously active vascular muscle*. Circ Res, 1973. 33(2): p. 244-51.
368. Ward, S.M., et al., *Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine*. J Physiol, 1994. 480 (Pt 1): p. 91-7.
369. Ward, S.M., et al., *Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants*. Am J Physiol, 1995. 269(6 Pt 1): p. C1577-85.
370. Sanders, K.M., *A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract*. Gastroenterology, 1996. 111(2): p. 492-515.
371. Langton, P., et al., *Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(18): p. 7280-4.
372. Camborova, P., et al., *The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity*. Physiol Res, 2003. 52(3): p. 275-84
373. Bettolli M, et al. *Colonic dysmotility in postsurgical patients with Hirschsprung's disease. Potential significance of abnormalities in the interstitial cells of Cajal and the enteric nervous system*. J Pediatr Surg. 2008 Aug;43(8):1433-8.
374. Wang H, et al. *Interstitial cells of Cajal reduce in number in recto-sigmoid Hirschsprung's disease and total colonic aganglionosis*. Neurosci Lett. 2009 Feb 27;451(3):208-11.

375. Rolle U, et al. *Interstitial cells of Cajal in the normal gut and in intestinal motility disorders of childhood. Pediatr Surg Int.* 2007 Dec;23(12):1139-52. Review.
376. Vanderwinden JM, et al. *Study of the interstitial cells of Cajal in infantile hypertrophic pyloric stenosis. Gastroenterology.* 1996 Aug;111(2):279-88. Erratum in: *Gastroenterology* 1996 Nov;111(5):1403.
377. Isozaki K, et al. *Deficiency of c-kit⁺ cells in patients with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. Am J Gastroenterol.* 1997 Feb;92(2):332-4. Review.
378. Van den Berg MM, et al. *Morphological changes of the enteric nervous system, interstitial cells of cajal, and smooth muscle in children with colonic motility disorders. J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Jan;48(1):22-9.
379. Torihashi, S., et al., *Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. Gastroenterology,* 1999. 117(1): p. 140-8.
380. Monges, G., et al., *The estimated incidence of gastrointestinal stromal tumors in France. Results of PROGIST study conducted among pathologists. Bull Cancer,* 2010.
381. Koh, et al. *Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. J Physiol,* 1998. 513 (Pt 1): p. 203-13.
382. Thomsen, L., et al., *Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. Nat Med,* 1998. 4(7): p. 848-51.
383. Hirst, G.D. and S.M. Ward, *Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle. J Physiol,* 2003. 550(Pt 2): p. 337-46.
384. Won, K.J., K.M. Sanders, and S.M. Ward, *Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. Proc Natl Acad Sci U S A,* 2005. 102(41): p. 14913-8.
385. Horowitz, B., S.M. Ward, and K.M. Sanders, *Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. Annu Rev Physiol,* 1999. 61: p. 19-43.
386. Dickens, E.J., G.D. Hirst, and T. Tomita, *Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. J Physiol,* 1999. 514 (Pt 2): p. 515-31.
387. Lee, H.K. and K.M. Sanders, *Comparison of ionic currents from interstitial cells and smooth muscle cells of canine colon. J Physiol,* 1993. 460: p. 135-52.
388. Kitamura, Y., S. Hirota, and T. Nishida, *A loss-of-function mutation of c-kit results in depletion of mast cells and interstitial cells of Cajal, while its gain-of-function mutation results in their oncogenesis. Mutat Res,* 2001. 477(1-2): p. 165-71.

389. Beckett, E.A., et al., *Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice*. J Physiol, 2002. 543(Pt 3): p. 871-87.
390. Burns, A.J., et al., *Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 12008-13.
391. Chen, H., et al., *Selective labeling and isolation of functional classes of interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. 292(1): p. C497-507.
392. Ward, S.M., et al., *Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons*. J Neurosci, 2000. 20(4): p. 1393-403.
393. Zhang, L.B. and I.L. Buxton, *Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle. II. Signal transduction pathways*. Mol Pharmacol, 1991. 40(6): p. 952-9.
394. Wang, X.Y., et al., *PKC-epsilon translocation in enteric neurons and interstitial cells of Cajal in response to muscarinic stimulation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. 285(3): p. G593-601.
395. Ward, S.M., et al., *Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters*. Gastroenterology, 1998. 115(2): p. 314-29.
396. Matini, P. and M.S. Faussone-Pellegrini, *Ultrastructural localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in the rat ileum*. Neurosci Lett, 1997. 229(1): p. 45-8.
397. Iino, S. and K. Horiguchi, *Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract*. Acta Histochem Cytochem, 2006. 39(6): p. 145-53.
398. Vannucchi, M.G., R. De Giorgio, and M.S. Faussone-Pellegrini, *NK1 receptor expression in the interstitial cells of Cajal and neurons and tachykinins distribution in rat ileum during development*. J Comp Neurol, 1997. 383(2): p. 153-62.
399. Grady, E.F., et al., *Characterization of antisera specific to NK1, NK2, and NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract*. J Neurosci, 1996. 16(21): p. 6975-86.
400. Zhang, L.B., B. Horowitz, and I.L. Buxton, *Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle. I. Coexistence of M2 and M3 subtypes*. Mol Pharmacol, 1991. 40(6): p. 943-51
401. Epperson, A., et al., *Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. 279(2): p. C529-39.

402. McKay, C.M., J. Ye, and J.D. Huizinga, *Characterization of depolarization-evoked ERG K currents in interstitial cells of Cajal*. *Neurogastroenterol Motil*, 2006. 18(4): p. 324-33.
403. Kim, T.W., et al., *Muscarinic regulation of pacemaker frequency in murine gastric interstitial cells of Cajal*. *J Physiol*, 2003. 546(Pt 2): p. 415-25.
404. Jun, J.Y., et al., *Noradrenaline inhibits pacemaker currents through stimulation of beta 1-adrenoceptors in cultured interstitial cells of Cajal from murine small intestine*. *Br J Pharmacol*, 2004. 141(4): p. 670-7.
405. Chang, S.L., et al., *Mechanoelectrical feedback regulates the arrhythmogenic activity of pulmonary veins*. *Heart*, 2007. 93(1): p. 82-8.
406. Strege, P.R., et al., *Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. 285(6): p. G1111-21.
407. McNair WP, et al. *Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia*. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2163-7.
408. Proenza, C. and G. Yellen, *Distinct populations of HCN pacemaker channels produce voltage-dependent and voltage-independent currents*. *J Gen Physiol*, 2006. 127(2): p. 183-90.
409. Lin, W., et al., *Dual stretch responses of mHCN2 pacemaker channels: accelerated activation, accelerated deactivation*. *Biophys J*, 2007. 92(5): p. 1559-72.
410. Yu Wang, Z., et al., *Pacemaking activity is regulated by membrane stretch via the CICR pathway in cultured interstitial cells of Cajal from murine intestine*. *J Biomech*, 2010.
411. Watanabe, E., et al., *High-sensitivity C-reactive protein is predictive of successful cardioversion for atrial fibrillation and maintenance of sinus rhythm after conversion*. *Int J Cardiol*, 2006. 108(3): p. 346-53.
412. Roldan, V., et al., *Interleukin-6, endothelial activation and thrombogenesis in chronic atrial fibrillation*. *Eur Heart J*, 2003. 24(14): p. 1373-80.
413. Mukamal, K.J., et al., *Fibrinogen and albumin levels and risk of atrial fibrillation in men and women (the Copenhagen City Heart Study)*. *Am J Cardiol*, 2006. 98(1): p. 75-81.
414. Conway, D.S., et al., *Prognostic significance of raised plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein in atrial fibrillation*. *Am Heart J*, 2004. 148(3): p. 462-6.

415. Liu, T., et al., *Association between C-reactive protein and recurrence of atrial fibrillation after successful electrical cardioversion: a meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2007. 49(15): p. 1642-8.
416. Fromer, M., et al., *Is there an isolated arrhythmogenic right atrial myocarditis?* Eur Heart J, 1990. 11(6): p. 566-71.
417. Korantzopoulos, P., et al., *Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress*. Med Sci Monit, 2003. 9(9): p. RA225-9.
418. Shiroshita-Takeshita, A., et al., *Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs*. Circulation, 2004. 110(16): p. 2313-9.
419. Seko, Y., et al., *Serum levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in patients with atrial fibrillation undergoing defibrillation therapy*. Jpn Heart J, 2000. 41(1): p. 27-32.
420. Li, X., et al., *The fibrosis and atrial fibrillation: is the transforming growth factor-beta 1 a candidate etiology of atrial fibrillation*. Med Hypotheses, 2008. 70(2): p. 317-9.
421. Gramley, F., et al., *Atrial fibrosis and atrial fibrillation: The role of the TGF-beta(1) signaling pathway*. Int J Cardiol, 2009.
422. Lijnen, P.J., V.V. Petrov, and R.H. Fagard, *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)*. Mol Genet Metab, 2000. 71(1-2): p. 418-35.
423. Hao, J., et al., *Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing*. J Mol Cell Cardiol, 1999. 31(3): p. 667-78.
424. Burstein, B. and S. Nattel, *Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(8): p. 802-9.
425. Verheule S, et al. *Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1*. Circ Res. 2004 Jun 11;94(11):1458-65.
426. Hogg, N., P.A. Bates, and J. Harvey, *Structure and function of intercellular adhesion molecule-1*. Chem Immunol, 1991. 50: p. 98-115.
427. Witkowska, A.M. and M.H. Borawska, *Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview*. Eur Cytokine Netw, 2004. 15(2): p. 91-8.
428. Benson, V., A.C. McMahon, and H.C. Lowe, *ICAM-1 in acute myocardial infarction: a potential therapeutic target*. Curr Mol Med, 2007. 7(2): p. 219-27.

429. Hoogeveen, R.C., et al., *Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study*. Diabetologia, 2007. 50(1): p. 36-42.
430. Cottone, S., et al., *C-reactive protein and intercellular adhesion molecule-1 are stronger predictors of oxidant stress than blood pressure in established hypertension*. J Hypertens, 2007. 25(2): p. 423-8.
431. Brake, D.K., et al., *ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. 291(6): p. C1232-9.
432. Madej, A., et al., *Plasma concentrations of adhesion molecules and chemokines in patients with essential hypertension*. Pharmacol Rep, 2005. 57(6): p. 878-81.
433. Constans, J. and C. Conri, *Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease*. Clin Chim Acta, 2006. 368(1-2): p. 33-47.
434. Kamiyama, N., *Expression of cell adhesion molecules and the appearance of adherent leukocytes on the left atrial endothelium with atrial fibrillation: rabbit experimental model*. Jpn Circ J, 1998. 62(11): p. 837-43.
435. Hammwohner, M., et al., *Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. 232(4): p. 581-9.
436. Gawaz, M., et al., *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. Circulation, 1998. 98(12): p. 1164-71.
437. McGregor, L., J. Martin, and J.L. McGregor, *Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis*. Front Biosci, 2006. 11: p. 830-7.
438. Goette, A., et al., *Calpains and cytokines in fibrillating human atria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(1): p. H264-72.
439. Liuba I, Ahlmroth H, Jonasson L, Englund A, Jönsson A, Säfström K, Walfridsson H. *Source of inflammatory markers in patients with atrial fibrillation*. Europace. 2008 Jul;10(7):848-53.
440. Ellinor, P.T., et al., *C-Reactive protein in lone atrial fibrillation*. Am J Cardiol, 2006. 97(9): p. 1346-50.
441. Liuba, I., et al., *Source of inflammatory markers in patients with atrial fibrillation*. Europace, 2008. 10(7): p. 848-53

442. Clauss M, et al. *Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration*. J Exp Med. 1990 Dec 1;172(6):1535-45.
443. Seko, Y., et al., *Pulsatile stretch stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by cultured rat cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 254(2): p. 462-5
444. Nikitovic, D., et al., *Plasma Levels of Nitrites/Nitrates in Patients with Chronic Atrial Fibrillation are Increased after Electrical Restoration of Sinus Rhythm*. J Interv Card Electrophysiol, 2002. 7(2): p. 171-6.
445. Freestone, B., et al., *Soluble E-selectin, von Willebrand factor, soluble thrombomodulin, and total body nitrate/nitrite product as indices of endothelial damage/dysfunction in paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation*. Chest, 2007. 132(4): p. 1253-8.
446. Seko, Y., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor after application of mechanical stress to retinal pigment epithelium of the rat in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. 40(13): p. 3287-91.
447. Ogi, H., et al., *Is Structural Remodeling of Fibrillated Atria the Consequence of Tissue Hypoxia?* Circ J, 2010.
448. Nakano, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2004. 43(5): p. 818-25.
449. Ohki-Kaneda, R., et al., *Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 320(4): p. 1328-36.
450. Kharlap, M.S., et al., *Atrial appendage transcriptional profile in patients with atrial fibrillation with structural heart diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1091: p. 205-17.
451. Barth, A.S., et al., *Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature*. Circ Res, 2005. 96(9): p. 1022-9.
452. Hamada, H., et al., *Establishment of vertebrate left-right asymmetry*. Nat Rev Genet, 2002. 3(2): p. 103-13.
453. Gudbjartsson DF, et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. Nature. 2007 Jul 19;448(7151):353-7.
454. Husser D, et al. Chromosome 4q25 variants and atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. J Am Coll Cardiol. 2010 Feb 23;55(8):747-53.

455. Lubitz SA, et al. Independent susceptibility markers for atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Circulation*. 2010 Sep 7;122(10):976-84.
456. Wang, J., et al., *Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(21): p. 9753-8.
457. Kemp, T.J., et al., *Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein*. *Genomics*, 2000. 66(3): p. 229-41.
458. Pallavicini, A., et al., *Characterization of human skeletal muscle Ankrd2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 285(2): p. 378-86.
459. Moriyama, M., et al., *Identification of a novel human ankyrin-repeated protein homologous to CARP*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 285(3): p. 715-23.
460. Tsukamoto, Y., et al., *Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type I skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation*. *Lab Invest*, 2002. 82(5): p. 645-55.
461. Jeyaseelan, R., et al., *A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes*. *J Biol Chem*, 1997. 272(36): p. 22800-8.
462. Zou, Y., et al., *CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway*. *Development*, 1997. 124(4): p. 793-804.
463. Baumeister, A., S. Arber, and P. Caroni, *Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis*. *J Cell Biol*, 1997. 139(5): p. 1231-42.
464. Ishiguro N, et al . *Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas*. *Am J Pathol*. 2002 May;160(5):1767-78.
465. Bean C, et al. *The effects of Ankrd2 alteration indicate its involvement in cell cycle regulation during muscle differentiation*. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jun;1783(6):1023-35.
466. Mohamed JS, et al. *Anisotropic regulation of Ankrd2 gene expression in skeletal muscle by mechanical stretch*. *FASEB J*. 2010 Sep;24(9):3330-40.
467. Epstein, N.D. and J.S. Davis, *Sensing stretch is fundamental*. *Cell*, 2003. 112(2): p. 147-50
468. Bang, M.L., et al., *Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies*. *J Cell Biol*, 2001. 153(2): p. 413-27.

469. Clark, K.A., et al., *Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002. 18: p. 637-706.
470. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. *Annu Rev Physiol*, 2003. 65: p. 45-79.
471. Knoll, R., et al., *The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy*. *Cell*, 2002. 111(7): p. 943-55.
472. Furukawa, T., et al., *Specific interaction of the potassium channel beta-subunit minK with the sarcomeric protein T-cap suggests a T-tubule-myofibril linking system*. *J Mol Biol*, 2001. 313(4): p. 775-84.
473. Chen, Y.H., et al., *KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation*. *Science*, 2003. 299(5604): p. 251-4.
474. Solaro, R.J. and J. Van Eyk, *Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function*. *J Mol Cell Cardiol*, 1996. 28(2): p. 217-30.
475. Thierfelder, L., et al., *Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere*. *Cell*, 1994. 77(5): p. 701-12.
476. Maron, B.J., *Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review*. *JAMA*, 2002. 287(10): p. 1308-20.
477. Kamisago, M., et al., *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 2000. 343(23): p. 1688-96.
478. Kubo, T., et al., *Clinical impact of atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Results from Kochi RYOMA Study*. *Circ J*, 2009. 73(9): p. 1599-605.
479. Hannigan, G.E., et al., *Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase*. *Nature*, 1996. 379(6560): p. 91-6.
480. Hannigan, G.E., J.G. Coles, and S. Dedhar, *Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease*. *Circ Res*, 2007. 100(10): p. 1408-14.
481. Lai, Z.F., et al., *Overexpression of TNNI3K, a cardiac-specific MAP kinase, promotes P19CL6-derived cardiac myogenesis and prevents myocardial infarction-induced injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 295(2): p. H708-16.
482. Zhao, Y., et al., *Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin I*. *J Mol Med*, 2003. 81(5): p. 297-304.

483. He, X., et al., *ASK1 associates with troponin T and induces troponin T phosphorylation and contractile dysfunction in cardiomyocytes*. Am J Pathol, 2003. 163(1): p. 243-51.
484. Fabiato, A. and F. Fabiato, *Calcium and cardiac excitation-contraction coupling*. Annu Rev Physiol, 1979. 41: p. 473-84.
485. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. 415(6868): p. 198-205.
486. Bodi, I., et al., *The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on*. J Clin Invest, 2005. 115(12): p. 3306-17.
487. Gaspo, R., et al., *Dihydropyridine and beta adrenergic receptor binding in dogs with tachycardia-induced atrial fibrillation*. Cardiovasc Res, 1999. 42(2): p. 434-42.
488. Lai, L.P., et al., *Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling*. J Am Coll Cardiol, 1999. 33(5): p. 1231-7.
489. Haase, H., et al., *Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK*. FASEB J, 1999. 13(15): p. 2161-72.
490. Haase, H., et al., *The carboxyl-terminal ahnak domain induces actin bundling and stabilizes muscle contraction*. FASEB J, 2004. 18(7): p. 839-41.
491. Hohaus, A., et al., *The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca²⁺ channels and the actin-based cytoskeleton*. FASEB J, 2002. 16(10): p. 1205-16.
492. Benaud, C., et al., *AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture*. J Cell Biol, 2004. 164(1): p. 133-44.
493. Alvarez, J., et al., *Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain*. J Biol Chem, 2004. 279(13): p. 12456-61.
494. Li, D., et al., *Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology*. Circulation, 2000. 101(22): p. 2631-8
495. Dinanian S, et al. *Downregulation of the calcium current in human right atrial myocytes from patients in sinus rhythm but with a high risk of atrial fibrillation*. Eur Heart J. 2008 May;29(9):1190-7

496. Schotten, U., et al., *Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation*. *Circulation*, 2001. 103(5): p. 691-8.
497. Gaborit, N., et al., *Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation*. *Circulation*, 2005. 112(4): p. 471-81.
498. Honjo, H., et al., *Pacing-induced spontaneous activity in myocardial sleeves of pulmonary veins after treatment with ryanodine*. *Circulation*, 2003. 107(14): p. 1937-43.
499. Boyden, P.A., et al., *Effects of left atrial enlargement on atrial transmembrane potentials and structure in dogs with mitral valve fibrosis*. *Am J Cardiol*, 1982. 49(8): p. 1896-908.
500. Carnes, C.A., et al., *Atrial glutathione content, calcium current, and contractility*. *J Biol Chem*, 2007. 282(38): p. 28063-73.
501. Hool, L.C. and P.G. Arthur, *Decreasing cellular hydrogen peroxide with catalase mimics the effects of hypoxia on the sensitivity of the L-type Ca²⁺ channel to beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2002. 91(7): p. 601-9.
502. Goette, A., et al, *Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms*. *Circulation*, 1996. 94(11): p. 2968-74
503. Xiao, R.P., et al., *Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(6): p. 330-7
504. Osadchii OE. *Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects*. *Heart Fail Rev*. 2007 Mar;12(1):66-86. Epub 2007 Mar 27. Review.
505. Osadchii OE, et al. *Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure following chronic beta-adrenoreceptor activation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Apr;292(4):H1898-905.
506. Hou, Z.Y., et al., *Role of acetylcholine in induction of repetitive activity in human atrial fibers*. *Am J Physiol*, 1989. 256(1 Pt 2): p. H74-84.
507. Shin, J.W., R. Huggenberger, and M. Detmar, *Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis*. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2318-26.

508. Lassalle, P., et al., *ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines*. J Biol Chem, 1996. 271(34): p. 20458-64.
509. Bechar, D., et al., *Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity*. J Biol Chem, 2001. 276(51): p. 48341-9.
510. Fujisawa, T., et al., *Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 106(3): p. 507-13.
511. Kallankari, H., et al., *Chemokine CCL18 predicts intraventricular hemorrhage in very preterm infants*. Ann Med, 2010.
512. Chang, C.Y., et al., *CC-chemokine ligand 18/pulmonary activation-regulated chemokine expression in the CNS with special reference to traumatic brain injuries and neoplastic disorders*. Neuroscience, 2010. 165(4): p. 1233-43.
513. Vulcano, M., et al., *Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells*. J Immunol, 2003. 170(7): p. 3843-9.
514. Ricciardi, A., et al., *Transcriptome of hypoxic immature dendritic cells: modulation of chemokine/receptor expression*. Mol Cancer Res, 2008. 6(2): p. 175-85.
515. Prasse, A., et al., *A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(7): p. 781-92.
516. Conway DS, et al. *Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation*. Circulation. 2003 Jul 1;107(25):3141-5.
517. Brugada, R., et al., *Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation*. N Engl J Med, 1997. 336(13): p. 905-11.
518. Abbott, G.W. and S.A. Goldstein, *Disease-associated mutations in KCNE potassium channel subunits (MiRPs) reveal promiscuous disruption of multiple currents and conservation of mechanism*. FASEB J, 2002. 16(3): p. 390-400.
519. Abbott, G.W., et al., *MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia*. Cell, 1999. 97(2): p. 175-87.
520. Grunnet, M., et al., *KCNE4 is an inhibitory subunit to Kv1.1 and Kv1.3 potassium channels*. Biophys J, 2003. 85(3): p. 1525-37.
521. Lewis, A., Z.A. McCrossan, and G.W. Abbott, *MinK, MiRP1, and MiRP2 diversify Kv3.1 and Kv3.2 potassium channel gating*. J Biol Chem, 2004. 279(9): p. 7884-92.

522. Yu, L., M. Moshelion, and N. Moran, *Extracellular protons inhibit the activity of inward-rectifying potassium channels in the motor cells of Samanea saman pulvini*. Plant Physiol, 2001. 127(3): p. 1310-22.
523. Bendahhou, S., et al., *In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart*. Cardiovasc Res, 2005. 67(3): p. 529-38.
524. Abbott, G.W. and S.A. Goldstein, *Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs)*. Mol Interv, 2001. 1(2): p. 95-107.
525. Schulze-Bahr, E., et al., *KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome*. Nat Genet, 1997. 17(3): p. 267-8.
526. Abbott GW, et al. *MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis*. Cell. 2001 Jan 26;104(2):217-31.
527. Sternberg D, et al. *Lack of association of the potassium channel-associated peptide MiRP2-R83H variant with periodic paralysis*. Neurology. 2003 Sep 23;61(6):857-9.
528. Barhanin, J., et al., *K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current*. Nature, 1996. 384(6604): p. 78-80.
529. Lundquist, A.L., et al., *Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks)*. J Mol Cell Cardiol, 2005. 38(2): p. 277-87.
530. Lundquist, A.L., et al., *Expression and transcriptional control of human KCNE genes*. Genomics, 2006. 87(1): p. 119-28.
531. Piccini, M., et al., *KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs*. Genomics, 1999. 60(3): p. 251-7.
532. Angelo, K., et al., *KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current*. Biophys J, 2002. 83(4): p. 1997-2006.
533. Ravn, L.S., et al., *Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2008. 5(3): p. 427-35.
534. Radicke, S., et al., *Functional modulation of the transient outward current Ito by KCNE beta-subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts*. Cardiovasc Res, 2006. 71(4): p. 695-703.
535. Hofman-Bang, J., et al., *Does KCNE5 play a role in long QT syndrome?* Clin Chim Acta, 2004. 345(1-2): p. 49-53.
536. Chen, Y.C., et al., *Effects of thyroid hormone on the arrhythmogenic activity of pulmonary vein cardiomyocytes*. J Am Coll Cardiol, 2002. 39(2): p. 366-72

537. Forfar, J.C., H.C. Miller, and A.D. Toft, *Occult thyrotoxicosis: a correctable cause of "idiopathic" atrial fibrillation*. *Am J Cardiol*, 1979. 44(1): p. 9-12.
538. Roepke, T.K., et al., *Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis*. *Nat Med*, 2009. 15(10): p. 1186-94.

ANNEXES

Identification and distribution of interstitial Cajal cells in human pulmonary veins

Elodie Morel,* David Meyronet, MD, PhD,[†] Françoise Thivolet-Bejuy, MD, PhD,[†] Philippe Chevalier, MD, PhD*

From the *Service de Rythmologie, Hôpital cardiologique Louis Pradel, and [†]Service d'anatomie et de cytologie pathologiques, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, France.

BACKGROUND The major determinant of atrial fibrillation (AF) initiation is focal firing within the muscular portion of the pulmonary veins. We hypothesized that interstitial Cajal cells (ICCs), a known type of pacemaker cells, could underlie the pacemaking activity of isolated pulmonary veins.

OBJECTIVE The aim of the study was to characterize the presence and the distribution of ICCs in human pulmonary veins.

METHODS Immunohistochemistry was performed on a transversal section of each pulmonary vein of eight adult human hearts obtained at autopsy from January 2005 to December 2005. A history of AF was documented in two of these eight patients. Two immunostainings were performed on successive sections to differentiate ICCs from mast cells (antibody c-kit and antibody AA1). Morphological and distribution analyses were performed manually and automatically. Electron microscopy and immunostaining with HCN4 and smooth muscle alpha-actin antibodies were also used to further characterize Cajal cells.

RESULTS ICCs were found in the pulmonary vein sections of three of the eight patients and were mainly identified in sections with a thick muscular sleeve. Two of these three patients had a history of AF. The mean distribution density of these cells was 0.6 ICCs/3 mm², with the highest density reaching 14.6 ICCs/3 mm² in a pulmonary vein of a patient with a history of AF. A positive immunostaining of Cajal cells with HCN4 was also demonstrated.

CONCLUSIONS ICCs may be detected in human pulmonary veins, particularly in patients with AF. Given the electrophysiological attributes of these cells, their role as AF triggers deserve to be more documented.

KEYWORDS Cajal cell; Atrial fibrillation; Pulmonary vein (Heart Rhythm 2008;5:1063-1067) © 2008 Heart Rhythm Society. All rights reserved.

Introduction

Because the pathophysiology of atrial fibrillation (AF) is not fully understood, this common arrhythmia remains difficult to treat. Pulmonary veins (PVs) are considered to be the main trigger of AF initiation, but the precise identification of the substrate underlying ectopic firing within the muscular layers is unknown.^{1,2} Independent pacemaker activity of the isolated PVs has been demonstrated in many mammalian species.^{3,4} Numerous studies have shown that interstitial Cajal cells (ICC) are responsible for the pacemaker activity of the gastrointestinal (GI) muscles along the alimentary tract.^{5,6} These cells have the unique property that they generate and propagate slow waves in GI muscles. They form a three-dimensional network between smooth muscle cells and nerves and are responsible for peristaltic activity in concert with the enteric nervous system.⁷ A decrease of ICC density has also been observed in many GI motility disorders.⁸⁻¹² For these reasons, we hypothesized

that ICCs are present in human PVs and that they may be the substrate of normal or abnormal electrical activity in the PVs of patients with AF.

The goal of this study was to identify ICCs and to analyze their distribution in human PVs.

Methods

Eight adult human hearts were obtained at autopsy from January 2005 to December 2005. Two of the patients had histories of AF. Samples of PVs and atrium were preserved in alcohol-formalin-acetic acid fixative solution. For seven patients, one transversal section of each PV was performed, perpendicular to the direction of blood flow. The segments were embedded in paraffin blocks and cut into 7- μ m slides. These 28 samples (7 \times 4PV) were used to analyze the locations and distributions of ICCs in the muscular sleeve of the PV. For the last patient only, the left PV was used for electronic microscopy analysis.

Immunohistochemistry

For each paraffin block, three serial sections were cut. One slide was stained with hematoxyline phloxine saffron and underwent immunostainings twice successively. To investigate the presence and distribution of ICCs, one section was stained for c-kit (polyclonal rabbit anti-human CD117/c-kit

This work was supported by a grant from Biosense Webster, Inc. Address reprint requests and correspondence: Philippe Chevalier, Service de Rythmologie, Hôpital cardiologique Louis Pradel, 28 avenue Doyen Lépine, 69677 Lyon cedex 03, France. E-mail address: philippe.chevalier@chu-lyon.fr. (Received December 22, 2007; accepted March 27, 2008.)

antibody, 1/200 dilution, A4502, Dako Cytomation). To differentiate mast cells from ICCs, a second immunostaining for human mast cell tryptase AA1 (primary mouse monoclonal anti-mast cell tryptase antibody, 1/2000 dilution, clone AA1, M7052-29, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) was performed. Slides were immunostained with Benchmark automated system (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA). Sections were deparaffinized with EZ Prep (Ventana) for 8 minutes at 75°C. Pretreatment was required only for c-kit immunostaining (heating in a reaction buffer at 42°C for 2 minutes to retrieve antigens).

After incubation with hydrogen peroxide 3% for 4 minutes at 42°C to block endogenous peroxidase, sections were incubated with either the primary rabbit polyclonal anti-c-kit antibody or the antibody AA1 for 30 minutes at 42°C. The sections were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with secondary antibody (peroxydase-labeled antibody IgG, iView Biotin Ig, Ventana) for 8 minutes at 42°C then with the conjugate (streptavidin horseradish peroxidase, Ventana) for 8 minutes at 42°C. The sections were washed with PBS, and the labeling was revealed with a mix of 3,3-diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Ventana) for 8 minutes at 42°C.

For manual immunostaining with HCN4, antibody sections were deparaffinized. Antigen retrieval was accomplished by microwaving slides in citrate buffer (Target Retrieval Antigen, Dako) for 20 minutes. After incubation with hydrogen peroxide 3% (Universal DakoCytomation LSAB+ kit, K0679, Dako) for 5 minutes at room temperature, sections were incubated with the primary goat polyclonal anti-HCN4 antibody (1/200 in Dako Real Antibody Diluant, sc-19714, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA) overnight at 4°C. The sections were washed with PBS and incubated with secondary antibody (Biotinylated Link, Universal DakoCytomation LSAB+ kit, K0679, Dako) for 30 minutes at room temperature and then with the conjugate (streptavidin horseradish peroxidase, Universal DakoCytomation LSAB+ kit, K0679, Dako) for 30 minutes at room temperature. The sections were washed with PBS, and the labeling was revealed by 3,3-diaminobenzidine for 1 minute at room temperature.

For automatic immunostaining with smooth muscle alpha-actin antibody (monoclonal mouse anti-human antibody, 1/100 dilution, M0851, Dako Cytomation), sections were deparaffinized with EZ Prep (Ventana) for 8 minutes at 75°C. After incubation with hydrogen peroxide 3% for 4 minutes at 42°C to block endogenous peroxidase, sections were incubated with the primary monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin antibody at 42°C for 18 minutes. The sections were washed with PBS and incubated with a secondary antibody (peroxydase-labeled antibody IgG, iView Biotin Ig, Ventana) for 8 minutes at 42°C and then with the conjugate (streptavidin horseradish peroxidase, Ventana) for 8 minutes at 42°C. The sections were washed with PBS, and the labeling was revealed with a mix of 3,3-diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Ventana) for 4 minutes at 42°C.

Morphological and distribution analysis

Manual morphological analyses (E.M., D.M.) under light microscope were used to differentiate the two populations of cells. Mast cells are larger than ICCs and contain granulations corresponding to mediators such as tryptase. On the other hand, ICCs have a long cytoplasmic process and oval nuclei. The number of either c-kit-positive or AA1-positive cells in the PVs was counted in five selected fields in a randomized region for a specimen under a light microscope at a magnification of $\times 100$. ICCs were identified by the subtraction of the AA1-positive cells, which represented the mast cell population, from the c-kit-positive cells.

For morphological analyses under transmission electron microscopy, a PV was cut into small pieces and fixed in 2% glutaraldehyde for 2 hours at 4°C, postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 hour at 4°C, dehydrated, and embedded in Epon (Epon 812, Fulham, Latham, NY) at transverse orientation. The tissue was then cut using an RMC/MTX ultramicrotome (Elxience, Verrières-le-Buisson, France), and ultrathin sections (60–80 nm) were mounted on copper grids, contrasted with 8% uranyl acetate and lead citrate and observed with a Jeol 1200 EX transmission electron microscope (Jeol Ltd. Tokyo, Japan) equipped with a MegaView II (Camera: C&S Company, Ltd, Seoul, Korea) high-resolution transmission electron microscopy camera. The analysis was performed with the Soft Imaging System (Eloise SARL, Roissy, France). The identification of interstitial cells of Cajal was based on the shape of the body cells and the presence of the long cytoplasmic process.

For automatic analysis, images were obtained using a DMR-RXA Leica microscope (Leica Microsystems 35578, Wetzlar, Germany), X10 objective (NA 0.5) lens, and a Sony DXC-990P 3CCD, (UK) color camera. Slides were reconstituted from 512×512 pixels color images by tiling (typically 400 images for one slide). Positive cells were identified in three steps. The tissue edge was obtained by a first threshold in gray intensity. A second threshold was applied on the red plane to obtain the cell images. Brown color objects were then detected by RGB (Red, green, blue) color thresholds. A conditional dilation was finally applied using the brown objects as seeds and cell images as masks. Tiling and image analysis were performed using ImageJ (created by Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Maryland, USA). Custom macroinstructions were developed in the imaging platform "Centre Commun de Quantimétrie" (Université Claude Bernard Lyon1).

All numerical data are expressed as mean \pm standard error of the mean. The Student's *t*-test was used to assess the significance of differences between groups. $P < .05$ was considered statistically significant.

Results

ICCs were found in PV sections in three of the eight patients. Two of these three patients had documented AF. Sections without muscular sleeves were generally poorer in c-kit-positive cells compared with sections of PV with a thick muscular sleeve. In the various sections of PVs, the

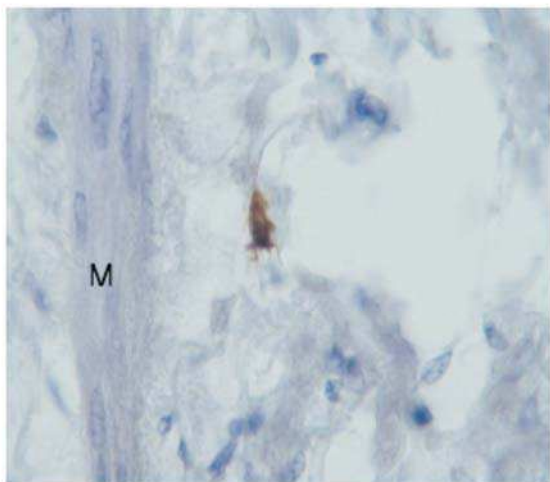


Figure 1 c-kit immunostaining of human PV. The c-kit⁺ cell has a pyramidal shape and three cytoplasmic prolongations. It is localized after the end of the extension of the myocardium sleeve in the PV. M = media of the PV.

proportion of mast cells was found to be higher than that of ICCs. Not all of the PV sections in the same patient contained ICCs. The mean density distribution of ICCs for these three patients was 2.6 ± 4.3 ICCs/ 3 mm^2 . ICCs were observed in the external side or in the middle of the muscular wall. These cells were sparse at various locations or clustered in the same area.

In one patient with no known history of AF, ICCs were found exclusively at the PV-left atrium (LA) junction. The mean ICC density for this patient section was 2.8 ± 3.7 ICCs/ 3 mm^2 . In the second patient with a history of AF, ICCs were found at the PV-LA junction (0.6 ± 0.9 ICCs/ 3 mm^2) as well as in the muscle layer of two PVs (1 ± 1.5 ICCs/ 3 mm^2). In the third patient who also had documented AF, ICCs were found in the four PVs. In the latter case, the density varied from 0.8 ± 0.6 to 14.6 ± 12.2 ICCs/ 3 mm^2 . The distribution of ICCs decreased from the proximal to the distal PV (14.6 ± 12.2 ICCs/ 3 mm^2 vs. 2.2 ± 1.8 ICCs/ 3 mm^2 , respectively) in this patient. When taking into account the LA samples, the mean ICC density was significantly higher in patients with AF than in patients without arrhythmia (0.085 ± 0.487 ICCs/ 3 mm^2 vs. 1.677 ± 3.920 ICCs/ 3 mm^2 ; $P < .01$). With automatic image analysis, the density of Cajal cells ranged from six to 90 cells per slide in the two patients with AF.

Two typical shapes of ICC were observed: multipolar with a stellate or pyramidal shape and spindle shape ICC. Multipolar cells have several cytoplasmic prolongations, which appear to be in close apposition to the surrounding cells (Figure 1). This type of cell was generally found at the external side of the muscular layer or inside it. The cell body of the spindle-shaped ICC was thinner than that of the multipolar ones (Figure 2). These ICCs have only two cytoplasmic prolongations and were found to predominate

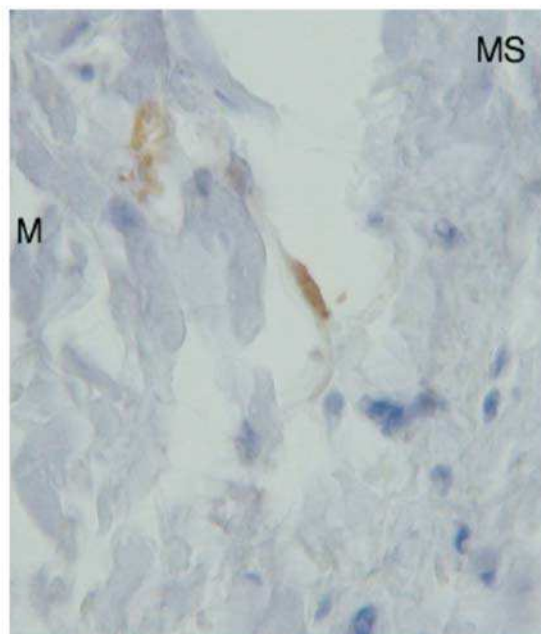


Figure 2 c-kit immunostaining of human PV. The c-kit⁺ cell has a spindle shape and two cytoplasmic prolongations. It is located between the extension of the atrial myocardium and the media layer of the PV. M = media of the PV; MS = muscular sleeve from the atria.

in the middle of the muscular layer along the fascicules of muscle fibers. Cajal cells were found to be positive to immunostaining to HCN4 (Figure 3) but did not react positively to smooth muscle actine antibody (Figure 4).

Although the cell structure was mildly damaged because the heart was fixed 11 hours after death, we were easily able to identify Cajal cells in the interstitium with electronic microscopy. With this technique, we found evidence that these cells can be in close proximity to muscle cells (Figures 5A and 5B).

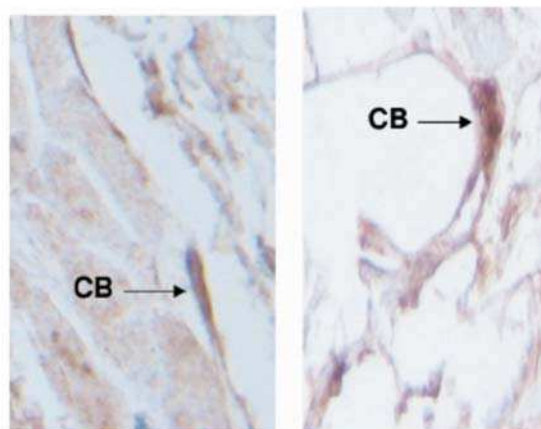


Figure 3 Positive immunomarking of Cajal cells with HCN4 ($\times 40$). CB = cell body.

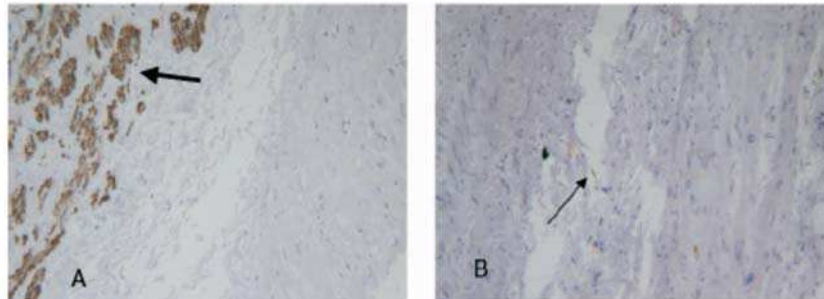


Figure 4 Smooth muscle alpha-actin (A) and c-kit (B) immunostaining showing no overlap between smooth muscle cell (*thick arrow*) and Cajal cells (*thin arrow*).

Discussion

To our knowledge, this study is the first to demonstrate the presence of Cajal cells in human PVs. Cells that resemble ICCs have been described in ventricular and atrial myocardium of the heart.^{13,14} The morphology of these cells with long processes is unique, and the demonstration that they react positively to HCN4 suggests that they may govern the rhythmicity of the PVs.

ICCs had been identified in the rabbit portal vein by Povstyan et al.⁴ In that study, ICCs were located in the subendothelial muscular layer and in the deeper muscular layer of the tunica media. Their close contact with muscular cells suggested that ICCs may influence myocyte activity. Subsequently, Harhun et al.^{15,16} showed that these ICCs were able to generate an electrical signal and act as a pacemaker for vascular smooth muscle cell. These cells also release depolarizing smooth muscle cell substances¹⁵ and display rhythmical $[Ca^{2+}]_i$ oscillation, resulting in a release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum.¹⁶ In the gastrointestinal tract (GIT), these two types of ICCs have different functions. The multipolar cells (triangular and stellate) localized in the myenteric plexus region are responsible for the pace-

maker activity.¹⁷ The spindle-shaped cells appeared to play a role in neurotransmission and are found in the circular and longitudinal muscle layers.¹⁸ Indeed, ICCs depolarize the smooth-muscle syncytium by increasing the probability of opening the voltage-dependent ionic channels of those cells. In our study, two types of ICCs were observed in the circumference of some human PVs, multipolar and spindle-shaped cells. Not every section contained ICCs, and the cell density varied among sections of PV. Only sections of PVs of patients with AF contain ICCs in the circumference of PVs. For one patient with no known history of AF, ICCs were found at the PV-LA junction.

The fact that a higher density of ICCs was found in two patients with AF strengthens the hypothesis of ICC-mediated PV arrhythmias. It is accepted that excessive dilatation of PVs could trigger abnormal ectopic firing in the PVs.¹⁹ Mechanical stretch could possibly destabilize PV electrical activity by enhancing abnormal automaticity.²⁰ Strege et al.²¹ described Na^+ current in human intestinal ICCs that may play a role in the generation of slow waves. Interestingly, this Na^+ current can be modulated by stretch.²² More-

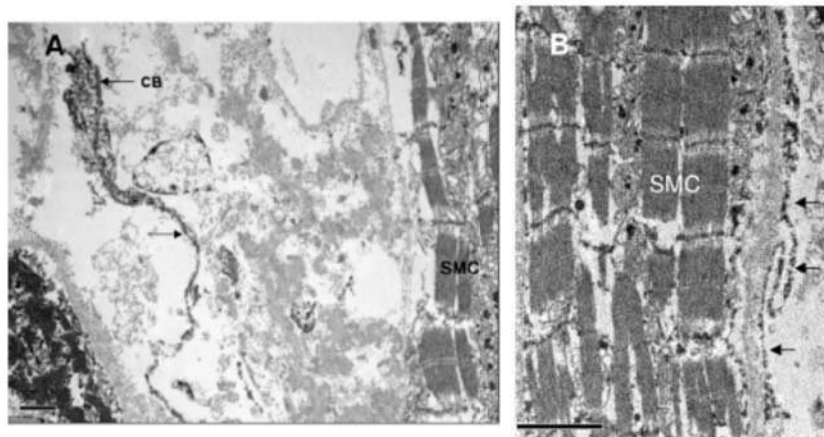


Figure 5 Electronic microscopy. A: A Cajal cell from PV interstitium. B: A long thin process lying on the myocyte is seen (*arrows*). The sinuous trajectory is typical of Cajal cells. CB = cell body; SMC = smooth muscle cell.

over, mutations in the Na⁺ channel (Nav1.5) coded by the SCN5A gene are known to be involved in cardiac arrhythmias.^{23,24} It is therefore tempting to speculate that triggering the Na⁺ current present in the ICCs can explain the link between AF and PV stretch. The same holds true for the ionic channel HCN (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide sensitive) that produces the I_f current, which is known as a pacemaker current.²⁵ The gating of these HCN channels is modulated by stretch. Lin et al²⁶ showed that these channels are involved in stretch arrhythmias and other mechano-electrical feedback phenomena. PV stretching can therefore activate the HCN4 channels from the ICCs, which in turn may fire rapidly and participate in AF initiation. ICCs can also express muscarinic receptors^{27,28} and thus may intervene in vagal AF.

Limitations

First, because there are c-kit-negative ICC-like cells that display spontaneous electrical activity,²⁹ we have probably underestimated the number of ICCs in PVs. Second, we recognize that the presence of Cajal cells in two patients with AF does not prove that these cells are implicated in AF initiation.

Conclusion

This study has demonstrated, for the first time, the presence of interstitial cells of Cajal in human PVs. According to the known function of these types of cells, we could expect that they act as pacemaker cells in PVs. The abnormal density or function of these cells could be at the origin of abnormal firing focus, trigger AF, and fit into the "venous wave" hypothesis described by M. Haissaguerre et al.³⁰ Additional studies are required to characterize the electrical properties of PV ICCs and to investigate their relationship with intrinsic innervation and atrial myocytes.

Acknowledgments

Tissues samples were provided by Cardiobiotec, biological resource center from Hospices Civils de Lyon.

The authors thank Simone Peyrol and Elisabeth Errazuriz from the Centre commun d'imagerie Laennec (CeCIL, Université Claude Bernard Lyon 1) and Yves Tourneur and Anne Beghin from the "Centre Commun de quantimétrie" (Université Claude Bernard Lyon 1).

References

- Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;339:659–666.
- Chen YJ, Chen SA, Chang MS, et al. Arrhythmogenic activity of cardiac muscles in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2000;48:265–273.
- Hudson NP, Mayhew IG, Pearson GT. Interstitial cells of Cajal and electrical activity of smooth muscle in porcine ileum. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;187:391–397.
- Povstyan OV, Gordienko DV, Harhun MI, et al. Identification of ICC in the rabbit portal vein. *Cell Calcium* 2003;33:223–239.
- Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996;111:492–515.
- Langton P, Ward SM, Carl A, et al. Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7280–7284.
- Camborova P, Hubka P, Sulkova I, et al. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res* 2003;52:275–284.
- Forster J, Damjanov I, Lin Z, et al. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg* 2005;9:102–108.
- Wedel T, Spiegler J, Soellner S, et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 2002;123:1459–1467.
- Vanderwielen JM, Ruessens JJ, Liu H, et al. Interstitial cells of Cajal in human colon and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1996;111:901–910.
- Ruessens JJ. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submucosal border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996;111:1447–1455.
- Ordog T, Takayama I, Cheung WK, et al. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000;49:1731–1739.
- Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, et al. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med* 2006;10:243–257.
- Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, et al. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med* 2006;10:429–458.
- Harhun M, Gordienko D, Povstyan O, et al. Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res* 2004;95:619–626.
- Harhun M, Gordienko D, Kryshal D, et al. Role of intracellular stores in the regulation of rhythmic [Ca²⁺]_i changes in interstitial cells of Cajal from rabbit portal vein. *Cell Calcium* 2006;40:287–298.
- Sanders KM, Ordog T, Kch SD, et al. A novel pacemaker mechanism drives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci* 2000;15:291–298.
- Tsao HM, Jalife SA, Cheng HC, et al. Pulmonary vein dilatation in patients with atrial fibrillation: detection by magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12:809–813.
- Chang SL, Chen YC, Chen YJ, et al. Mechano-electrical feedback regulates the arrhythmogenic activity of pulmonary veins. *Heart* 2007;93:82–88.
- Stroge PR, Ou Y, Sha L, et al. Sodium current in human interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1111–G1121.
- Morris CE, Juranka PF. Nav channel mechanosensitivity: activation and inactivation accelerate reversibly with stretch. *Biophys J* 2007;93:822–833.
- Olson TM, Michels VV, Ballew JD, et al. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA* 2005;293:447–454.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. Familial cardiomyopathy registry research group. *Circulation* 2004;110:2163–2167.
- Proenza C, Yellen G. Distinct populations of HCN pacemaker channels produce voltage-dependent and voltage-independent currents. *J Gen Physiol* 2006;127:183–190.
- Lin W, Laitko U, Juranka PF, et al. Dual stretch responses of mHCN2 pacemaker channels: accelerated activation, accelerated deactivation. *Biophys J* 2007;92:1559–1572.
- Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, et al. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C529–C539.
- Chen H, Redelman D, Ro S, et al. Selective labelling and isolation of functional classes on interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C497–507.
- Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, et al. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2006;41:1076–1087.
- Lang RJ, Klemm MF. Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract. *J Cell Mol Med* 2005;9:543–556.
- Haissaguerre M, Sanders P, Hocini M, et al. Pulmonary veins in the substrate for atrial fibrillation: the "venous wave" hypothesis. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2290–2292.

Annexe 3 : Résumé synoptique de l'étude sur la Quantification des marqueurs myocardiques chez les patients avec fibrillation atriale

Titre du protocole :

Quantification des marqueurs de l'inflammation myocardique chez les patients avec fibrillation atriale (Etude REMI)

Investigateur principal :

Pr Philippe Chevalier, Service de rythmologie, Hôpital cardiologique Louis Pradel, 69677 Bron - Cedex

Justification et retombées attendues :

Bien que la fibrillation atriale soit une arythmie très fréquente, les mécanismes de son installation chez un patient donné ne sont pas connus. L'hypothèse d'un syndrome inflammatoire pro arythmique a été récemment étayée par un ensemble de constatations cliniques et expérimentales. La démonstration d'un syndrome inflammatoire myocardique par la mesure des marqueurs sériques de l'inflammation et par la présence de marqueurs de surface des cellules sanguines, jamais réalisée auparavant chez les patients avec FA, doit être évaluée. Il est attendu que les résultats de l'analyse biologique permettent une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la FA et de la manière de la traiter.

Objectif principal :

Mettre en évidence un syndrome inflammatoire myocardique chez les patients avec FA.

Critères d'évaluations :

L'existence d'une différence de concentration en certaines protéines inflammatoires entre le sang veineux périphérique et le sang prélevé au niveau du sinus coronaire, de la veine pulmonaire supérieure gauche et de l'oreillette gauche sera recherchée statistiquement. Une différence significative permettra d'affirmer l'origine cardiaque de l'inflammation. Cette inflammation locale sera précisément quantifiée.

Plan expérimental :

Etude comparative cas-témoin.

Sujets concernés :

Patients avec et sans fibrillation atriale présents en hospitalisation de jour pour une intervention programmée d'exploration électrophysiologique ou d'ablation.

Groupes comparés :

- **Groupe A** : 50 patients avec fibrillation atriale
- **Groupe B** : 50 patients sans fibrillation atriale (groupe contrôle)

Les deux groupes de patients seront appariés sur l'âge et le sexe.

Organisation :

L'étude sera proposée aux patients planifiés pour une exploration électrophysiologique ou une ablation. Après vérification des critères d'inclusion, la signature d'un consentement leur sera demandée. Tous les prélèvements sanguins seront effectués par l'intermédiaire du cathéter d'exploration. Pour le prélèvement périphérique, le sang sera prélevé à l'introduction du cathéter dans la veine. Ensuite, les prélèvements au niveau du cœur, à savoir le sinus coronaire, l'oreillette gauche et la veine pulmonaire supérieure gauche seront effectués au fur et à mesure de l'exploration.

Méthodes d'analyse :

Pour l'ensemble des prélèvements (veine périphérique, sinus coronaire, oreillette gauche et veine pulmonaire supérieure gauche), deux types de dosage sont réalisés sur anticoagulant (EDTA), à savoir :

- le dosage des marqueurs sériques présents en cas d'inflammation systémique (cytokines et protéines inflammatoires).
 - la présence de marqueurs de surface des cellules sanguines
-

Calendrier de l'étude :

- Durée totale de l'étude : 1 an
- Mise en place de l'étude : 5 mois
- Inclusion des patients et collecte des données : 12 mois (sept 2008-sept 2009)
- Validation des critères de jugement, analyse et rédaction de rapport : dernier trimestre 2009
- Fin de l'étude : janvier 2010

Annexe 4 : Accord du comité de protection des personnes pour l'étude sur la quantification des marqueurs myocardiques chez les patients avec fibrillation atriale

**COMITE DES PROTECTION
DES PERSONNES SUD-EST II**

Hôpital HOTEL-DIEU
Porte 16
Place de l'Hôpital
69288 LYON CEDEX 02
Tél : 04.78.42.94.48
Fax : 04.78.42.94.69
E-mail : francoise.leclet@chu-lyon.fr

Lyon le 4 octobre 2007

Monsieur le Professeur CHEVALIER
Service de Rythmologie

HOPITAL CARDIOLOGIQUE

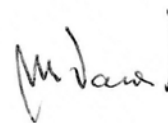
Monsieur,

Le Comité de Protection des Personnes SUD-EST II, lors de sa séance du 3 octobre 2007, a pris connaissance du projet d'étude que vous envisagez de mener et relatif à la mesure des paramètres inflammatoires chez les patients avec fibrillation atriale.

A l'issue de la délibération, le Comité a considéré que *cette étude n'entrait pas dans le champ d'application de la Loi du 9 août 2004* dans la mesure où il s'agit d'une étude, « non interventionnelle ».

La procédure est habituelle, sans aucun geste invasif ou positionnement d'un cathéter autres que ceux faits dans la pratique courante. Il n'y a aucun risque lié à l'étude proprement dite.

Recevez, Monsieur, mes salutations les meilleures.



Pour le CPP SUD-EST-II
Le Président – Professeur Michel David

Membres ayant participé à la séance :

AMIET Nicole (Domaine Juridique) - BIENVENU Jacques (Recherche Biomédicale) - BOISRIVEAUD Christine (Psychologue) - BONIFAIT Christian (Domaine Juridique) - CHEVAUX Raphaël (Représentant Association Malades et Usagers) - DAVID Michel (Recherche Biomédicale) - GIMENEZ-GEAY Isabelle (Infirmière) - GUEYFFIER François (Recherche Biomédicale – méthodologie) - HODGKINSON Isabelle (Recherche Biomédicale) - PAULIGNAN Yves (Recherche Biomédicale) - PELEGRIN Serge (Représentant Association Malades et Usagers) - PHILIPPE Noël (Recherche Biomédicale) - PHILIPPE-JANON Chantal (Domaine Social) -

Annexe5 : Consentement de l'étude sur la quantification des marqueurs
myocardiques chez les patients avec fibrillation atriale

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE DU PATIENT
ETUDE REMI**

Titre de l'étude : « Quantification des marqueurs de l'inflammation myocardique chez les patients avec fibrillation atriale »

Je soussigné(e)(Nom Prénom) déclare avoir été informé(e) et avoir entièrement compris les informations relatives à cette étude.

Le **Professeur Philippe CHEVALIER** m'a proposé de participer à une étude visant à mettre en évidence un syndrome inflammatoire myocardique chez les patients avec fibrillation atriale. Il m'a fourni toutes les informations que je souhaitais et j'ai pu lui poser toutes les questions voulues au cours de l'entretien médical.

J'accepte librement et volontairement de participer à cette recherche.

J'ai compris que cette étude peut être interrompue à tout moment par le **Professeur Philippe CHEVALIER**.

Les données qui me concernent ainsi que cette fiche de consentement resteront strictement confidentielles. Seules les personnes collaborant à ce protocole seront habilitées à les consulter. Ces données font l'objet d'un traitement informatisé et mon droit d'accès, de rectification et d'opposition (retrait) de ces données (prévu par la loi « informatique et liberté » du 06/08/04) pourra s'exercer à tout moment par l'intermédiaire du **Professeur Philippe CHEVALIER** au **04 72 68 49 46**.

Je comprends que je suis libre de choisir de participer ou non à ce protocole et que je peux décider à tout moment d'en sortir sans préjudice pour ma prise en charge ultérieure.

De plus, je pourrai, à tout moment, demander toute information complémentaire au **Professeur Philippe CHEVALIER**.

Je confirme avoir reçu une copie de ce document ainsi que de la lettre d'information.

Fait en double exemplaire à,

le / /

A..... , le / /

Nom du patient :.....

Nom du médecin :

Signature du patient :

Signature du Médecin :

Annexe 6 : article “Increased left atrial blood levels of VEGF in patients with paroxysmal atrial fibrillation” soumis à l’European Heart Journal en juillet 2010

Increased left atrial blood levels of VEGF in patients with paroxysmal atrial fibrillation

Auteurs : Elodie Morel¹, Alina Scridon¹, MD, Nicolas Girerd¹, M.D., M.Sc.; Emilie Nonin¹, MD, Philippe Chevalier¹, MD, PhD.

¹ : Service rythmologie, Hôpital cardiologique Louis Pradel, Lyon, Hospices Civils de Lyon, France

Address for correspondence : philippe.chevalier@chu-lyon.fr

ABSTRACT

Background: Although, it is established that in patients with atrial fibrillation (AF) inflammatory markers are elevated, the extent and possible source of inflammation in these patients is unknown.

Objectives: The aim of this was to assess the inflammatory cytokines in the left atrium, coronary sinus and in the systemic circulation in patients with paroxysmal, persistent and permanent AF, compared with a control group of patients with no history of AF referred for catheter ablation.

Methods: Using a prospective case-control study, 72 patients with AF were compared to 9 control patients. AF was subcategorized as paroxysmal, persistent and permanent AF. Peripheral and left atrial blood samples were obtained during routine cardiac catheterization prior to ablation. Additional coronary sinus and left pulmonary vein blood samples were obtained in 15 patients with AF. Serum concentrations of IL-8, sICAM1, TGF β and VEGF were measured by enzyme linked immuno-sorbent assay.

Results : Patients with and without AF had similar left atrial or peripheral blood levels of CRP, TGF β , sICAM1 and IL-8. In contrast, patients with paroxysmal AF or with persistent/permanent AF had significantly higher left atrial VEGF blood levels when compared to controls (respectively $p=0.03$ and $p=0.02$). In the subset of patients with AF, VEGF blood levels in the coronary sinus and left atrium were higher when compared to VEGF levels in the left superior pulmonary vein (respectively $p= 0.02$ and $p<0.001$).

Conclusions

This study suggests that left atrial blood levels of VEGF levels are significantly increased in patients with paroxysmal and persistent/permanent AF. Higher levels of VEGF might be explained by left atrial endothelial dysfunction triggered by AF.

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia found in clinical practice^{1, 2}. Both clinical and experimental evidence has supported the contribution of inflammation to the development and persistence of AF³, although the exact mechanisms are not well understood. The first observations linking AF to inflammation were made by Frustaci et al. who demonstrated the high prevalence of inflammatory infiltrates, myocyte necrosis and fibrosis in atrial biopsies from patients with AF⁴. A consistent finding in manifest AF is elevated inflammatory activity at the atrial tissue level³.

The significance of these findings, however, remains unclear. The inflammatory state may be related to the AF itself, but also to other conditions that are often associated with AF, such as heart failure, coronary artery disease, or diabetes mellitus. In addition, the source of inflammatory markers is unknown. Inflammatory changes have been reported in the atria in some patients with focal tachycardias.

In order to better understand the implication of inflammatory processes in the pathophysiology of the AF, we conducted a study to assess the extent and possible source of inflammation in patients with AF. The aim of this was to assess the inflammatory cytokines in the left atrium and in the systemic circulation in patients with paroxysmal, persistent and permanent AF, compared with a control group of patients with no history of AF referred for catheter ablation or electrophysiological study.

METHODS

Study population and patient selection

Our study enrolled 84 individuals. We studied 74 patients with AF (40 patients with paroxysmal AF, 28 with persistent AF and 6 with permanent AF).

The classification of AF was made in accordance with current ESC guidelines. We therefore defined paroxysmal AF as episodes of AF lasting fewer than 7 days and that terminate spontaneously. Persistent AF was defined as episodes of AF lasting more than 7 days and that do not terminate spontaneously and permanent AF as the form for which electrical or pharmacological cardioversion were attempted, but unsuccessful, or none of these procedures was attempted. The control group included 10 patients with Wolf Parkinson White (WPW) syndrome due to left-sided accessory

pathways, with no history of AF. All patients were hospitalized at the Louis Pradel Hospital in Lyon, France, for catheter ablation or electrophysiological exploration.

Exclusion criteria included a history of pulmonary or inflammatory disease (all types), and ongoing anti-inflammatory treatment. All patients underwent standard history, physical examination, and routine laboratory tests. Transthoracic echocardiography was performed to assess left atrial diameter and surface and to rule out the presence of an intracardiac thrombus.

The South-East II People's Protection Committee and the Advisory Committee on Information Processing in Medical Research Field approved the study protocols, and all participants provided written informed consent.

Blood samples and laboratory tests

*The blood samples were obtained during routine cardiac catheterization prior to ablation. Peripheral blood samples were taken via venous sheath and catheter. The left atrium was accessed through transseptal puncture. Left atrium and pulmonary blood samples were collected via transseptal sheath. Protein markers or cytokines (TGFB, IL-8, VEGF and sICAM1, R&D Systems) were measured on serum sample by enzyme linked immuno-sorbent assay.

The lower limits of detection were 30 ng/mL for soluble intercellular adhesion molecule (sICAM1), 4 pg/mL, for interleukin-8 (IL-8), and 4 pg/mL, for the vascular endothelial growth factor (VEGF). The circulating levels of all previously described markers were assessed in blood samples from the femoral vein and left atrium.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean \pm SD and were compared by t tests for independent or dependant samples when appropriate. When more than two groups were involved, we used ANOVA with LSD post hoc tests. Variables were log transformed if not normally distributed. Differences in proportion were compared using a Chi² test.

Pearson's correlation was used to assess associations between continuous variables.

Multiple linear regression was used to identify independent predictors of VEGF blood levels.

A probability value of less than 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed with SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Baseline patient characteristics

Patient clinical characteristics are provided in Table 1. The mean duration of AF history was 7.9 ± 7.2 years in the group of patients with paroxysmal AF, 6.9 ± 4.9 years in the group with persistent AF and 4.3 ± 3.7 years for the group with permanent AF. The left atrial diameter and surface measured by echocardiography in parasternal long axis were greater in AF patients than in controls ($p = 0.029$ respectively $p = 0.026$). 9 patients (23%) with paroxysmal AF, 20 (71%) with persistent AF, and 5 (83%) with permanent AF were in AF at the moment of blood sampling, whereas the rest were in sinus rhythm. 12 patients (30%) with paroxysmal AF, 10 (36%) with persistent AF, and 3 (50%) with permanent AF had had prior ablation therapies by cryotherapy or radiofrequency ablation.

When compared to controls, patients with AF were older ($p=0.001$), had greater BMI ($p<0.001$) and had a higher left atrial surface measured by echocardiography ($p=0.001$). Patients with AF were also more likely to be treated with ACE inhibitors or ARAII medication ($p=0.002$). Mean duration of AF history were similar in patients with paroxysmal AF when compared to patients with persistent or permanent AF (7.9 ± 7.2 years vs 6.4 ± 4.8 years respectively, $p=0.29$).

Inflammatory markers

The values of sICAM1, IL-8*, VEGF, and TGF β obtained at the two sites sampled are presented in Table 2.

Inflammatory markers in patients or without atrial fibrillation

Patients with and without AF had similar left atrial or peripheral blood levels of CRP, TGF β , sICAM1 and IL8 (Table 2). In contrast, left atrial blood levels of VEGF tended to be different according to AF

status (none, paroxysmal AF or persistent/permanent AF; $p=0.08$) and peripheral blood levels of VEGF were significantly higher in patients with AF compared to controls (24.9 ± 21.9 pg/mL vs 17.0 ± 27.3 pg/mL respectively, $p=0.01$). Post-hoc analysis (Graph 1) identified that patients with paroxysmal AF tended to have greater left atrial blood levels of VEGF ($p=0.05$) and had significantly higher peripheral blood levels of VEGF ($p=0.03$) when compared to controls. Patients with persistent or permanent AF had significantly higher peripheral blood levels of VEGF ($p=0.02$) but similar left atrial blood levels of VEGF ($p=0.38$) when compared to controls. When compared to patients with persistent or permanent AF, patients with paroxysmal AF had similar peripheral blood levels of VEGF ($p=0.72$), but tended to have higher left atrial blood levels of VEGF ($p=0.09$) (Graph 1).

VEGF blood levels predictors. Gender, hypertension, diabetes, current smoking status, statins and ACE inhibitors or ARAII treatment were not significantly associated with peripheral and left atrial blood levels of VEGF (all $p>0.10$). Age, BMI, left atrial surface (as measured by echocardiography) and duration of AF history were not significantly correlated with peripheral and left atrial blood levels of VEGF (all Pearson's correlation coefficient <0.20 and all $p>0.10$).

When adjusting on age and gender, atrial fibrillation remained a significant predictor of higher peripheral blood levels of VEGF ($\beta=0.35$ in log scale, $p=0.02$).

Intracardiac gradients of inflammatory markers in patients with atrial fibrillation

We analyzed VEGF blood levels in the subset of patients with AF and other available intra-cardiac blood samples (i.e. superior pulmonary vein and coronary sinus). In this subset, VEGF blood levels in the coronary sinus and left atrium were higher when compared to VEGF levels in the left superior pulmonary vein (respectively $p=0.02$ and $p<0.001$) (Graph2). VEGF blood levels in the coronary sinus and left atrium were similar ($p=0.93$).

DISCUSSION

This prospective study suggests that VEGF levels are significantly increased in patients with paroxysmal AF. We have also found that left atrial biological dysfunction is likely the cause of this abnormality. This latter may be part of the prothrombotic state observed in some patients with AF. Epidemiological studies have shown an association between C-reactive protein and both the presence of AF and the risk of developing future AF. Elevated plasma levels of C-reactive protein and interleukin-6 have been reported in patients with both paroxysmal and persistent AF^{5, 6}. Although a large number of studies suggest the existence of an association between inflammation and AF, there are other studies that show that paroxysmal AF alone, not associated with other concomitant heart and inflammatory conditions, is not associated with elevated levels of C-reactive protein, IL-6, and IL-8 in the systemic and pulmonary circulation^{7, 8}, so the exact place of inflammation in the pathophysiology of AF remains unclear.

Several inflammatory markers have been studied with regard to the mechanisms of AF. The most used markers are C-reactive protein and interleukins 6 and 8. However, there are cytokines that are more specific to the cardio-vascular system.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an endothelial cell mitogen involved in vascular development and angiogenesis. This cytokine is known to be a potent angiogenic mitogen secreted from tumor cells and cells exposed to hypoxia. There is increasing evidence that VEGF and VEGF receptor mRNAs are expressed in the heart tissue and their expression is markedly increased in response to hypoxia⁹.

The increased level of VEGF may correspond to two distinct mechanisms depending on which type of atrial fibrillation is present. It has also been shown that myocardial stretch induced *in vivo* increased VEGF mRNA levels in the heart¹⁰. Pulsatile mechanical stretch *in vitro* induced rapid secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by cultured cardiac myocytes and the stretch-induced secretion of VEGF was mainly mediated by secretion of transforming growth factor (TGF)-beta1 by cardiac myocytes in an autocrine fashion⁹.

In paroxysmal fibrillation the stretch of the pulmonary veins is often cited has a potential cause of electrical instability. Seko et al have demonstrated that stretching of cultured retinal epithelial cell results in an increased production of VEGF¹¹. It would be interesting to test whether pulmonary veins mechanical stretching could trigger have the same result. In the persistent and permanent form of AF the main arrhythmogenic substrate is represented by atrial myocyte remodeling. Ogi H et al. have investigated the expression of VEGF in atrial tissue of patients with and without AF¹². They have found that upregulation of VEGF was involved in the increase of matrix metalloproteases (MMP-9) expression. Thus, atrial remodeling is perhaps initiated by an effect of VEGF at an early stage of AF.

This hypothesis may explain why VEGF is less elevated in patients with paroxysmal AF when compared to patients with persistent or permanent type of the arrhythmia. The damaged and remodeled tissue may be less able to produce VEGF. This finding however has not been confirmed by the study of Li et al.¹³.

Study limitations

Certain limitations of this study should be noted. It could be argued that the process of catheterization *per se* induced an artificial increase in the inflammatory markers that overwhelmed a possible low-level inflammatory state in AF patients. Studies have shown that vascular catheterization may lead to the local production of inflammatory markers. However, the increase in the plasma concentration of these inflammatory markers was detectable only 3 hours after the catheterization, whereas in our patients, blood sampling was usually performed within 30 min of catheterization.

CONCLUSIONS

This study shows that left atrial VEGF blood levels were significantly increased in patients with paroxysmal AF and in patients with persistent or permanent AF. These changes in VEGF blood levels might be the consequence of AF. The role of this parameter in identifying patients at risk of embolic event deserves further studies.

Acknowledgements

No

Conflict of interest: none.

1. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA*. 2001; 285: 2370-2375.
2. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*. 2006; 114: 119-125.
3. Y. Nakamura, K. Nakamura, K. Fukushima-Kusano, K. Ohta, H. Matsubara, T. Hamuro, C. Yutani and T. Ohe, Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular

- atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis, *Thromb Res* 111 (2003), pp. 137–142.
4. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997;96:1180–1184
 5. Wazni O, Martin DO, Marrouche NF, et al. C reactive protein concentration and recurrence of atrial fibrillation after electrical cardioversion. *Heart* 2005; 91: 1303-1305
 6. Chung MK, Martin DO, Sprecher D, et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 104: 2886–91.
 7. I. Liuba, H. Ahlmroth, Lena Jonasson, A. Englund, K. Safstrom, H. Walfridsson, Source of inflammatory markers in patients with atrial fibrillation, *Europace* (2008) 10 (7): 848-853.
 8. Ellinor PT, Low A, Patton KK, Shea MA, MacRae CA. C-Reactive protein in lone atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2006; 97(9): 1346-1350.
 9. Seko Y, Seko Y, Takahashi N, Shibuya M, Yazaki Y. Pulsatile stretch stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 462-5.
 10. Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest* 1997; 100: 18-24.
 11. Seko, Y Seko Y, Seko Y, Fujikura H, Pang J, Tokoro T, Shimokawa H. *Induction of vascular endothelial growth factor after application of mechanical stress to retinal pigment epithelium of the rat in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. 40(13): p. 3287-91.
 12. Ogi H, Nakano Y, Niida S, Dote K, Hirai Y, Suenari K, Tonouchi Y, Oda N, Makita Y, Ueda S, Kajihara K, Imai K, Sueda T, Chayama K, Kihara Y. *Is Structural Remodeling of Fibrillated Atria the Consequence of Tissue Hypoxia?* *Circ J*, 2010 Jul 10.
 13. Li J, Solus J, Chen Q, Rho YH, Milne G, Stein CM, Darbar D. *Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation*. *Heart Rhythm*. 2010 Apr;7(4):438-44.

Table 1: Baseline patient characteristics

	Controls n=9	Paroxysmal AF n=39	Persistent or permanent AF n=33	p-value
Age (years)	43.0±17.7	55.8±9.2	58.2±8.1	0.001
Men	66.7%	82.1%	84.8%	0.46
Body mass index (kg/m ²)	22.2±3.5	27.1±3.4	29.2±5.2	<0.001
Hypertension	22.2%	41.0%	57.6%	0.12
Diabetes	0.0%	12.8%	9.1%	0.50
Smokers	11.1%	30.8%	33.3%	0.42
History of AF (years)	/	7.9±7.2	6.4±4.8	0.29
Statin treatment	0.0%	23.1%	30.3%	0.16
ACE inhibitors or ARAII treatment	0.0%	20.5%	51.6%	0.002
Left atrial surface (cm ²)	15.7±2.5	20.6±3.7	25.2±6.1	0.001
AF during blood sampling	/	20.5%	72.7%	<0.001
Prior ablation interventions	0.1±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.39

Table 2: Inflammation markers with regards to atrial fibrillation status

	Controls n=9	Patients with atrial fibrillation				p value**
		Whole group n=72	p value*	Paroxysmal AF n=39	Persistent or Permanent AF n=33	
CRP (mg/L) in peripheral blood	10.2±21.5	4.8±9.2	0.63†	4.7±10.52	5.0±7.8	0.29†
VEGF (pg/mL)						
Left atrium	10.6±8.9	20.5±26.5	0.13†	25.2±32.79	15.0±14.74	0.08†
Peripheral blood	17.0±27.3	24.9±21.9	0.01†	24.1±23.33	25.8±20.36	0.04†
TGFβ (ng/mL)						
Left atrium	12.3±8.9	16.2±14.8	0.69†	16.2±16.8	16.1±12.3	0.73†
Peripheral blood	23.6±27.4	18.9±16.3	0.70†	15.1±11.5	23.4±19.9	0.23†
sICAM1 (ng/mL)						
Left atrium	162.7±41.7	173.4±46.8	0.52	177.4±48.8	168.7±48.7	0.59
Peripheral blood	169.7±48.6	179.2±47.3	0.57	182.8±47.5	175.0±47.5	0.67
IL8 (pg/mL)						
Left atrium	7.7±7.3	7.5±6.2	0.67†	7.8±7.04	7.0±5.01	0.81†
Peripheral blood	8.4±12.2	7.4±5.1	0.37†	6.9±3.11	8.0±6.68	0.53†

* p value associated with the comparison to controls using t test.

** p value associated with the comparison of controls, patients with paroxysmal AF and patients with persistent or permanent AF using ANOVA test.

† Tests were made on log-transformed variables.

Graph 1: VEGF blood levels according to the atrial fibrillation status (none, paroxysmal or persistent/permanent) in peripheral venous circulation (panel A) and in left atrium (panel B).

Fig1A

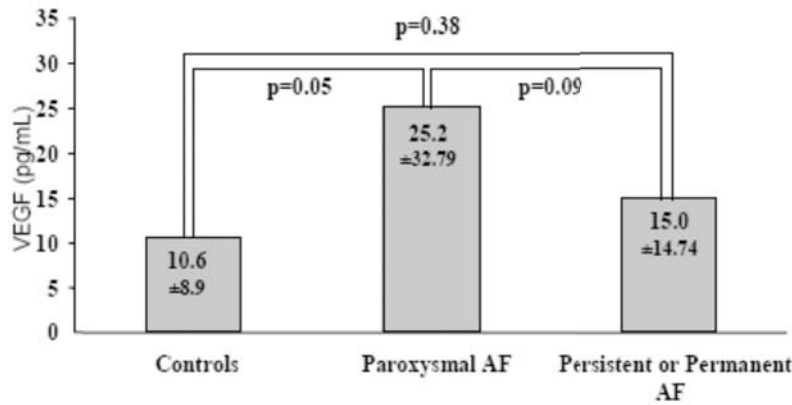
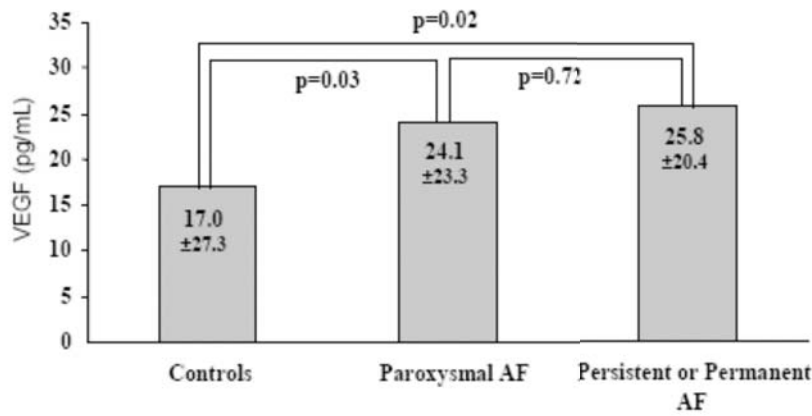
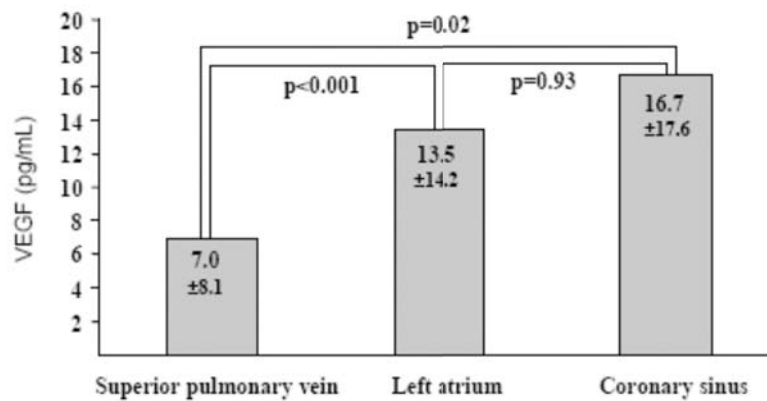


Fig1B



Graph 2: VEGF blood levels in superior pulmonary vein, left atrium and coronary sinus in patients with atrial fibrillation (either paroxysmal, persistent or permanent).



Annexe 7 : Consentement pour étude génétique

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE
MOLECULAIRE A FINALITE MEDICALE CHEZ UNE PERSONNE
MAJEURE**

Je soussignée Monsieur, Madame,

Né(e) le.....

Demeurant à

Je reconnais avoir été informé par le Docteur sur la nature de la pathologie que je présente, ou que présente(nt) certain(s) membre(s) de ma famille, ainsi que sur les études actuellement possibles, et sur les études destinées à compléter ces investigations.

Je donne mon consentement pour un prélèvement de sang et pour la transmission qui me sera faite des informations le concernant.

Je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations nécessaires à la compréhension de cet acte biologique, de sa finalité et de ses conséquences (conformément à l'article R162-16-7 et de la loi de bioéthique de juillet 1994 et du décret n°2000-570 du 23 juin 2000).

Fait à Lyon, le

Signature du praticien

Signature du patient
Précédée de la mention « lu et approuvé »