



HAL
open science

Rôle de la triadine dans le développement de l'insuffisance cardiaque

Pauline Marck

► **To cite this version:**

Pauline Marck. Rôle de la triadine dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05S018 . tel-01397501

HAL Id: tel-01397501

<https://theses.hal.science/tel-01397501>

Submitted on 20 Feb 2017

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.

Université Paris V-Paris Descartes

Ecole doctorale « Hématologie, Oncogénèse, Biologie et Biothérapie » (HOB)

Spécialité : Pathologie cardio-vasculaire

Thèse présentée et soutenue publiquement par

Pauline Marck

Le 28 novembre 2014

Pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Rôle de la triadine dans le développement de l'insuffisance cardiaque

Thèse dirigée par le **Dr Christophe HEYMES**

JURY :

Dr Jean-Sébastien Silvestre, Directeur de recherche,	Président
Dr Flavien Charpentier, Directeur de recherche,	Rapporteur
Pr Laurent Monassier, PU-PH,	Rapporteur
Dr Isabelle Marty, Directeur de recherche,	Examineur
Dr Sylvain Richard, Directeur de recherche,	Examineur
Dr Christophe Heymes, Directeur de recherche,	Directeur de thèse

Université Paris V-Paris Descartes

Ecole doctorale « Hématologie, Oncogénèse, Biologie et Biothérapie » (HOB)

Spécialité : Pathologie cardio-vasculaire

Unité de Recherche Inserm/UPS UMR 1048 - I2MC

Thèse présentée et soutenue publiquement par

Pauline Marck

Le 28 novembre 2014

Pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Rôle de la triadine dans le développement de
l'insuffisance cardiaque

Thèse dirigée par le **Dr Christophe HEYMES**

JURY :

Dr Jean-Sébastien Silvestre, Directeur de recherche,	Président
Dr Flavien Charpentier, Directeur de recherche,	Rapporteur
Pr Laurent Monassier, PU-PH,	Rapporteur
Dr Isabelle Marty, Directeur de recherche,	Examineur
Dr Sylvain Richard, Directeur de recherche,	Examineur
Dr Christophe Heymes, Directeur de recherche,	Directeur de thèse

Remerciements

Mes travaux de thèse ont été réalisés à l'unité INSERM UMR970-PARCC à Paris dirigée par **Monsieur le Docteur Alain Tedgui** puis par la suite au sein de l'unité INSERM UMR1048-I2MC à Toulouse dirigée par **Monsieur le Professeur Angelo Parini**. Merci à eux pour leur accueil et d'avoir permis la réalisation de mes travaux.

Je remercie **Monsieur le Docteur Jean-Sébastien Silvestre** de m'avoir honoré en présidant mon jury de thèse.

Je remercie **Monsieur le Docteur Flavien Charpentier** et **Monsieur le Professeur Laurent Monassier**. Je suis profondément reconnaissante que vous ayez accepté d'être les rapporteurs de mon jury de thèse et ainsi d'évaluer ce travail.

Je remercie également **Madame le Docteur Isabelle Marty** et **Monsieur le Docteur Sylvain Richard** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail. Sans le Dr Isabelle Marty le projet triadine n'aurait pas pu exister avec toute l'aide qu'elle nous a apporté.

Je remercie **Monsieur le Docteur Jean-Sébastien Silvestre** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe à Paris et d'y avoir entretenu une ambiance chaleureuse.

Je remercie **Monsieur le Docteur Frank Lezoualc'h** qui par la suite m'a accueilli au sein de son équipe et s'est toujours préoccupé de l'avancée de mes travaux.

Je remercie particulièrement **Monsieur le Docteur Christophe Heymes** pour m'avoir accueilli dès mon master 2 dans son équipe et ensuite pour m'avoir dirigé dans mes travaux de thèse. Durant ces six années, tout n'a pas été « rose » comme la ville qui nous a accueillis mais finalement tout se termine bien. Grâce à ma petite « triadine » et toi, j'ai pu visiter le Sud de la France moi la « Parisienne » et profiter de l'expertise d'autres laboratoires (Grenoble, Montpellier). A tes côtés, j'ai beaucoup appris de mon futur métier mais aussi sur moi-même. Par contre, je ne vois toujours pas pourquoi je ne peux pas chanter dans le labo !

Je vais adresser maintenant (en essayant de ne pas en oublier) mes remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont soutenu humainement et scientifiquement de Paris à Toulouse en passant par Montpellier.

Un immense merci à **Xavier**, enfin **Dr Loyer** (comme il aime si bien le rappeler !), fraîchement intégré à l'INSERM, qui même de Paris a toujours cru en moi et que je considère comme « mon grand frère » au lab. D'excellents conseils, toujours de bonne humeur (l'avantage avec toi c'est qu'on sait tout de suite !) et une histoire d'amour contrariée avec un rat. Il a fallu que « kung-fu panda » te vienne en aide pour une fois ! J'avoue que ce rat n'avait pas un caractère facile. Tes blagues m'ont beaucoup manqué à Toulouse et aussi tes commérages (heureusement pour moi j'ai trouvé ta remplaçante avec l'accent d'ici !!!).

*Un grand merci à mes copines de promo **Adèle** et **Anne-Clémence**. Triste de vous avoir quitté. Un grand merci en plus à Adèle qui a dû se charger de mes démarches administratives et a su être pour moi une oreille attentive. Je te souhaite bonne chance au pays des kangourous.*

*Merci à **Estelle** pour avoir été la première à me former à l'expérimentation animale et opérer mes souris sur Paris.*

*Merci à **Dominique, Micheline** et **José**. Dominique pour m'avoir encadré à mes débuts et appris l'immunohistochimie, Micheline pour m'avoir permis d'approfondir ces connaissances et José pour tes conseils.*

*Merci à **Alice, Mickaël, Jean-Marie, Stéphane, Jin, Padma, Philippe, Tristan** dont j'ai apprécié la compagnie au sein du deuxième étage du PARCC.*

Enfin merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du PARCC et qui ont fait de ma première année de thèse une année inoubliable

Maintenant direction Sud-Ouest !

*Merci à **Yannis** pour tes précieux conseils et ton expertise en physiologie. En ta compagnie, j'ai redécouvert le statut d'étudiante durant nos 15 jours de formation d'expérimentation animale de niveau I. Je n'oublie pas non plus que tu m'as très gentiment accueilli avec ma maman dans ta famille pour que je puisse trouver ma maison toulousaine.*

*Merci à **Maxime** tes opés, tes échos et tes cathés au son de « Rire et Chansons ». Tu m'as bien aidé à faire les « petits ronds ». Grâce à toi un soir j'ai visité le centre commercial de Blagnac fallait voir ça (ou pas !) avant que je quitte la région. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse et pleins de choses pour ta petite famille.*

*Je remercie **Caro, Cécile et Aurélie** pour toutes les opé sur mes petites souris. Avec Aurélie une petite pensée pour nos IPGTT d'enfer !*

*Merci à **Vincent et Céline** pour les PCRq.*

*Un énorme merci à ma **Florence**, ma Flo, ma sœur jumelle. A nous les fibroses et les jolies images de cœur entier. Au départ, tout n'était pas gagné pour que l'on s'entende comme larrons en foire mais maintenant on n'imagine pas le contraire. Tu resteras une de mes plus belles rencontres à Toulouse car tu es quelqu'un d'entier et de vrai ! Je te souhaite un très beau futur avec ta belle famille.*

*Un grand merci à **Malik**, mon petit Malikou, compère de thèse et comme je te le dis souvent si tu n'étais pas là il faudrait t'inventer. Toujours là pour voler à mon secours !*

*Merci à **Annélie, Caroline, Loubina et Marion** ainsi que toutes les nombreuses personnes qui ont fait partie de la fameuse équipe 13 de l'I2MC.*

Enfin, je ne peux parler des personnes de Toulouse sans oublier **Paolo**, sans lui pas de petites souris !!!! Et **Emilie** qui s'en était occupée à Paris et qui n'oublie jamais de passer faire un petit coucou quand elle le peut !

Un petit passage à Montpellier

Un grand merci de nouveau au **Dr Sylvain Richard** pour m'avoir accueilli dans son équipe 1 à l'U1046 de Montpellier durant quelques semaines pour étudier les sparks de mes petites « tria ».

Merci au **Dr Jérôme Thireau** pour m'avoir appris la technique et ses conseils.

Un très grand merci au **Dr Franck Aimond** qui en plus de maîtriser le patch m'a aidé dans mes expériences pour les finir. Merci pour ton aide et ta disponibilité pour m'expliquer les mystères du patch-clamp !

Merci à toutes les personnes de l'U1046 pour leur accueil et gentillesse.

Je tiens à remercier tous mes amis qui m'ont soutenu et même parfois sont descendus me voir. Alors un merci très spécial à mes amis visiteurs qui ont cassé mon petit train-train: ma meilleure amie **Patou** et son petit **Léo** (avec vous deux j'ai découvert ce que c'était la parenté pendant quelques jours), **Christelle, Stéphanie, Marie, Delphine et Mazhou** (je t'y inclus parce que même si ton voyage ici ne s'est jamais fait ce n'est pas l'envie qui t'a manqué !). Merci à **Annabelle et Sylvain** et leur petit **Noah** les amis devenus locaux.

J'ai découvert mon sport ici : l'escrime. Alors même si mon corps n'aime parfois pas trop sa pratique (les bleus !!!), elle a été profitable à mon mental et à mon esprit de compétition (et oui j'ai fait un peu de compet !). J'y ai rencontré des gens super, particulièrement mon maître d'armes **Jean-Mi** et mes compagnons d'armes **Anne et Xavier** (qui m'a gentiment dépanné un samedi matin !).

Je ne serai pas arrivée ici sans le soutien de **mes parents et mes grands-parents**. **Ma petite maman** qui est venue chaque année me voir et avec qui chaque année je vais visiter une capitale européenne (il nous manque cette année !), **mon petit papa** qui m'a aidé dans mon déménagement, **ma petite mamie** qui je le sais attendait avec impatience que je devienne docteur et mes autres grands – parents qui m'ont accompagnée dans mes pensées. J'ai fait vivre à la petite 106 de **mon pépé** une vie de sudiste après le froid de la Lorraine. Une pensée également à la **famille Roland** maintenant à Dax qui a été comme une seconde famille depuis mon enfance. Merci à **Christophe, Bénédicte, Raphaël** pour leur précieuse aide.

Merci à **mon little brother Juju** pour me coacher parfois et parfois le contraire. Merci de m'avoir fait découvrir ta vie belge et de m'avoir ramené durant tes années belges de la bière et autres bonnes spécialités.

Merci à ma chère cousine **Emilie** pour être venue me voir, à mes cousins **Aurélien et Martin**, les jeunes mariés, pour m'avoir accueillie lors de mes manips à Montpellier et avoir pris soin de moi. Merci à **mon Tonton JP** pour sa venue et tous mes autres oncles, tantes et cousins qui m'accueillent si chaleureusement lorsqu'ils ont envie de voir la « familia ».

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé

AAV : Adeno-Associated Virus

AC : Adénylate Cyclase

ACE : Angiotensin Converting Enzyme

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGT : Angiotensinogène

AKAP79 : A Kinase Anchoring Protein 79

Akt : Protéine Kinase B

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ANF- ANP : Atrial Natriuretic Factor-Peptide

AngII : Angiotensine II

AP-1 : Activating Protein-1

AR : Adrenergic Receptor

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

ASPH : protéine aspartate β -hydrolase ou gène codant pour la junctine, la junctate et la protéine aspartate β -hydrolase

AT1 : Angiotensin II type 1 receptor

ATF-1 : Activating Transcription Factor 1

ATP : Adenosine triphosphate

ATPase : ATP monophosphatase

BNP : Brain Natriuretic Peptide

C2C12 : lignée cellulaire de myoblastes de muscles squelettiques de rat

Ca²⁺ : ion Calcium

Cabin1 : Calcineurin-binding protein cabin-1

Cain : Calcineurin Inhibitor

CaM : Calmoduline

CaMKII : Calmoduline Kinase de type II

CaM-PK : Calmoduline Protein Kinase
CaN : Calcineurine
Cav1.2 : Canaux Calciques voltage-dépendant de type L
Cav 3 : Cavéoline 3
CEC : Couplage Excitation-Contraction
c-fos, c-jun, c-myc : facteurs de transcriptions proto-oncogènes
CICR : Calcium-Induced Calcium Release
CKI/CKII : Casein kinase I/II
Cos-7 : lignée cellulaire de fibroblastes de rein
CnA : Calcineurine de type A
CnB : Calcineurine de type B
CNP : C-type Natriuretic Peptide
CPVT : Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia
CRC : Canal de Relâchement du Calcium
CREB : cAMP Response Element Binding
CRM-1 : Chromosome Region Maintenance-1
CsA : Cyclosporine A
CSQ2 : Calséquestrine isoforme cardiaque
CT1 : Cardiac Triadin isoform 1
Cx : Connexine
DAD : Delayed early Afterdepolarization ou Post-dépolarisations Retardées
DAG : Diacylglycérol
DHPR : Récepteurs aux Dihydropyridines
DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne
DVDA : Dysplasie Ventriculaire Droite Arythmogène
EAD : Early Afterdepolarization ou Post-dépolarisations précoces
ECG : Electrocardiogramme
EDL : Extensor Digitorum Longus
eIF2 : Eucaryote Initiating Factor 2
ER : Estrogen Receptor
ERK : Extracellular Response Kinase
ET-1 : Endothéline-1

Fak : Focal adhesion kinase

FDAR : accélération fréquence-dépendante de la relaxation myocardique

FKBP12.6 : Calstabile 2 isoforme cardiaque

FK506 : FK506 binding protein ou FKBP

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GATA4 : GATA Binding Protein 4

GCA : guanylate cyclase

GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique

GRK : G protein Receptor Kinase

GSK3 β : Glycogène Synthase Kinase de type 3 β

HDAC : Histone Déacétylase

HRC : Histidine Rich-binding protein

HVG : Hypertrophie du Ventricule Gauche

IC : Insuffisance Cardiaque

IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1

IGF1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

IM : Infarctus du Myocarde

InsP₃ : Inositol -1,4,5-triphosphate receptor channel

IP₃ : Inositol -1,4,5-triphosphate

JAK : Janus Kinase

JNC : Junctine

JNK : Jun Kinase

L6.G8 : lignée cellulaire de myoblastes de muscle squelettique de rat

K⁺ : ion Potassium

KO : Knock-Out

KEKE : motif avec un acide aminé lysine (K) et un acide aminé glutamate (E)

L-NAME : L-NG-Nitroarginine Methyl Ester

L-NMMA : L-NG-Monomethyl Arginine Citrate

LTCC : Canal Calcique voltage-dépendant de Type L

mAKAP : muscle A Anchoring Protein

MAPK : Mitogen Activating Protein Kinase

MCIP-1 : Modulatory Calcineurin inhibitory Protein 1

MEC : Matrice extracellulaire
MEF-2 : Myocyte Enhancer Factor 2
Met : Méthionine
MHC ou MyHC: Myosin Heavy Chain
MLC2 : Myosin light chain 2
MMP : Matrix MetalloProteinase
MyBP-C : Myosin binding protein-C
Na⁺ : ion Sodium
NCX : Echangeur Sodique Calcique
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB : Nuclear Factor κ B
NO : Monoxyde d'Azote
NOS : NO Synthase
NOS1 : NO Synthase de type 1
NOS 3 : NO Synthase de type 3
NOS 3^{-/-} : Invalidation du gène de la NOS3
p38 : protein 38
PA : Potentiel d'Action
PE : Phényléphrine
PI3K : Phosphatidylinositide ou Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP₂ : Phosphatidyl Inositol 4,5 biphosphate
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
PKGI : Protéine Kinase G de type I
PLB : Phospholamban
PLC : phospholipase C
PMCA : Pompe plasmique Membranaire Ca²⁺-ATPase
PN : Peptide Natriurétique
P_o : Probabilité d'ouverture
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A : Protéine Phosphatase 2A
PR : Période Réfractaire

Rédox : Oxydo-Réducteur
RFF : relation force-fréquence
ROS : Reactive Oxygen Species
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
RS : Réticulum Sarcoplasmique
RSj : Réticulum Sarcoplasmique jonctionnel
RyR1 : Récepteur de la Ryanodine de type 1 (isoforme squelettique)
RyR2 : Récepteur de la Ryanodine de type 2 (isoforme cardiaque)
SAC : Stretch-Activated ion Channel
SERCA2a : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase de type 2a (isoforme cardiaque)
shARN : petits ARN en épingle à cheveux
siRNA : silencing Ribonucleic Acid
 α -SKA : Alpha-Skeletal-Actin
SNA : Système Nerveux Adrénergique
SNC : Système Nerveux Cholinergique
SNP : Système Nerveux Parasympathique
SNS : Système Nerveux Sympathique
SOC : Store Operated Channel
SOICR : Store Overload Induced Calcium Release
SRAA : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
SRF : Serum Response Factor
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
TAC : Transverse Aortic Constriction
T-cap : Téléthonine
TGF β 1 : Transforming Growth Factor β 1
TnC : Troponine C
TnT : Troponine T
TnI : Troponine I
Trd : Triadine
TRDN : gène codant pour la triadine
Trisk : Triadin skeletal
TRPC : Transient Receptor Potential Channel

TV : Tachycardie Ventriculaire

TVPC : Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique

Tubules-T : Tubules Transverses

WT : Wild Type

AVANT-PROPOS

Le cœur est un organe s'adaptant à différentes conditions de travail. Son adaptation fonctionnelle repose sur un processus d'hypertrophie visant à maintenir sa fonction pompe normale. L'élément déterminant de l'hypertrophie cardiaque est un procédé complexe, dynamique et évolutif : le remodelage tissulaire. Il implique de nombreux types cellulaires (cardiomyocytes, fibroblastes, cellules endothéliales) et représente un élément-clé de l'adaptation du myocarde pour restaurer un métabolisme du myocarde normal. A ce nouvel état s'ajoutent un certain nombre de changements phénotypiques délétères qui au final vont conduire le cœur vers un statut non adapté, on parle alors d'Insuffisance Cardiaque (IC) (Lakatta (1993); K. R. Chien (1999); Swynghedauw (1999)).

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème majeur de santé publique car elle reste la première cause de mortalité et d'hospitalisation dans les pays développés. Ce syndrome complexe est la voie finale de nombreuses maladies cardiaques (sténose aortique, HTA,...). On estime que la majorité de la mortalité dans l'IC est engendrée par une mort subite, causée par des arythmies. Ces troubles du rythme cardiaque surviennent lorsque le tissu myocardique est atteint (hypertrophie, fibrose, remodelage ionique, CEC...). Si ces modifications au départ permettent d'assurer la fonction cardiaque à un niveau homéostatique, sur le long terme elles deviennent des altérations pro-arythmogéniques. Il est donc important d'identifier les protéines pouvant retarder l'IC et ses arythmies. Cela constitue un enjeu majeur pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques curatives (Jessup and Brozena (2003)).

Les protéines du complexe de relâchement calcique (CRC), plus particulièrement le récepteur de la ryanodine cardiaque (RyR2) et ses protéines associées, sont le plus souvent liées à une pathologie particulière, la Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique (TVPC, Catecholaminergic Polymorphism Ventricular Tachycardia (CPVT)). C'est une maladie rare génétique héréditaire touchant au rythme cardiaque (Liu et al (2008)). Si ces protéines sont reliées à des arythmies, elles participent également au développement de l'hypertrophie cardiaque (Y. Zou et al (2011) ; Sato Y. et al. (1998)) avec d'autres protéines du réticulum sarcoplasmique (RS) comme l'*Histidine Rich-binding protein* (HRC)(C. S. Park et al. (2013)). Leur expression se trouve régulièrement altérée dans l'IC humaine comme animale (Gergs et al (2007) ; Gupta et al (2009)). La triadine n'a jamais à ce jour été étudiée dans un contexte de pathologie cardiaque.

La triadine (Trd ou CT1) est une des protéines du CRC. Elle permet à la fois l'ancrage de la calséquestrine (CSQ2) et la liaison de cette dernière avec RyR2, sur la face jonctionnelle du réticulum sarcoplasmique (RSj). Dans un panel de 97 patients souffrants de TVPC, sans mutations sur les gènes de RyR2 et CSQ2, trois mutations ont été identifiées sur le gène de la triadine (TRDN). Elles ont pour conséquence pour ces patients d'en faire des cas humains naturels de triadine knock-out (Roux-Buisson et al (2012)). La triadine serait alors liée à la survenue d'arythmies et par son appartenance au CRC pourrait participer au développement de l'hypertrophie cardiaque.

L'IC étant associée à l'hypertrophie cardiaque et/ou d'arythmies, nous avons alors émis l'hypothèse d'un rôle et/ou d'une implication du niveau d'expression de la triadine au cours de l'hypertrophie cardiaque et de l'IC.

Dans ce contexte, le but de ces recherches a été de déterminer lors du développement de l'hypertrophie cardiaque et de l'IC :

- 1- le niveau d'expression de la triadine,
- 2- les mécanismes mis en jeu,
- 3- le rôle de la triadine.

Les résultats présentés valident le concept d'un rôle spécifique de la triadine dans le cœur et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche et thérapeutique des maladies cardiovasculaires.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
AVANT-PROPOS	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS	20
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	21
<i>I.STRUCTURE ET FONCTION CARDIAQUE.....</i>	<i>22</i>
I.1. STRUCTURE DU MYOCARDE.....	22
(A) LE MYOCARDE.....	22
(B) LE CARDIOMYOCYTE	29
(C) LA MYOFIBRILLE.....	31
(D) LE SARCOMERE	31
I.2.LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (CEC)	33
(A) DE L'EXCITATION AU RELACHEMENT DU Ca^{2+}	34
(B) LA CONTRACTION (FIGURES 9 ET 13)	40
(C) LA RELAXATION (FIGURES 13)	41
(D) SA REGULATION	44
<i>II.L'INSUFFISANCE CARDIAQUE (IC).....</i>	<i>51</i>
II.1. L'HYPERTROPHIE DU VENTRICULE GAUCHE (HVG)	51
(A) UNE ADAPTATION	51
(B) REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE, DU SYSTEME CIRCULATOIRE (POUR REVUE : HOU AND KANG (2012)) ET DU METABOLISME	54
(C) LES STIMULI PRO-TROPHIQUES	56
(D) LES VOIES PRO-TROPHIQUES Ca^{2+} INDEPENDANTES : LES MAPK	60
(E) LES REPONSES ANTI-TROPHIQUES	60
II.2. L'IC	63
(A) LE REMODELAGE DU VG ET DE SON ULTRASTRUCTURE	63
(B) L'ACTIVATION SRAA	65
(C) L'ALTERATION DE LA SIGNALISATION BETA-ADRENERGIQUE (POUR REVUE : LYMPERPOULOS, RENGO, AND KOCH (2013))	66
<i>III.LE Ca^{2+} ET SON ROLE DE L'HVG A L'IC.....</i>	<i>68</i>
III.1.LES VOIES DE SIGNALISATION PRO-TROPHIQUES Ca^{2+}-DEPENDANTES.....	68
III.2.REMODELAGE DES MOUVEMENTS CALCIFIQUES DE L'HVG VERS L'IC.....	77
(A) REMODELAGE ELECTROPHYSIOLOGIQUE	77

(B) ALTERATIONS DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (POUR REVUE M. LUO AND ANDERSON (2013)).....	80
III.3. ARYTHMIES.....	87
(A) ORIGINE	89
(B) LES POST-DEPOLARISATIONS PRECOSES OU <i>EARLY AFTERDEPOLARIZATIONS</i> (EADs)	89
(C) LES POST-DÉPOLARISATIONS RETARDÉES OU <i>DELAYED EARLY AFTERDEPOLARIZATIONS</i> (DADs)	91
(D) LES <i>SPARKS</i> CALCIQUES (POUR REVUE : BERS (2014))	92
(E) LES TROUBLES DE CONDUCTION.....	93
III.4. ARYTHMIES ET PROTEINES DU CYCLE CALCIQUE	96
(A) RYR2.....	97
(B) CSQ2	99
(C) HRC (POUR REVUE : ARVANITIS, VAFIADAKI, SANOUDOU, AND KRANIAS (2011)).....	100
(D) JNC.....	101
(E) TRIADINE	102
<u>CONTEXTE EXPERIMENTAL.....</u>	<u>111</u>
II.I.1. PROBLEMATIQUE	112
II.I.2. OBJECTIFS	112
<u>METHODES EXPERIMENTALES.....</u>	<u>113</u>
III.I. MODELES ANIMAUX ET CELLULAIRES	114
III.I.1. SOURIS KNOCK-OUT (KO) POUR LE GENE DE LA TRIADINE (TRDN).....	114
III.I.2. LA STENOSE DE L'AORTE ASCENDANTE (TAC) CHEZ LA SOURIS	115
III.I.3. L'INFARCTUS DU MYOCARDE CHEZ LA SOURIS.....	116
VII.I.4. DIFFUSION DE CATECHOLAMINES EN SOUS-CUTANEE PAR MINI-POMPE OSMOTIQUE.....	116
III.I.5. LA PRODUCTION DU VIRUS AAV9 RECOMBINANT POUR LA TRIADINE ET SA TRANSDUCTION <i>IN VIVO</i>	117
III.I.6. CARDIOMYOCYTES ISOLES DE SOURIS ADULTES	118
III.I.7. BIOPSIES HUMAINES DE VENTRICULE GAUCHE	118
III.II. TECHNIQUES D'ANALYSES ANATOMO-PHYSIOLOGIQUES.....	119
III.III.1. ECHOCARDIOGRAPHIE	119
III.III.2. CATHETERISME GAUCHE	120
III.III.3. MESURES ANATOMIQUES.....	121
III.III.6. ETUDE DES COURANTS IONIQUES : PATCH-CLAMP.....	122
III.III. TECHNIQUES DE DETECTION, D'INDUCTION D'ARYTHMIES	123
III.III.1. ELECTROCARDIOGRAMME (ECG).....	123
III.III.2. ETUDE DES FUITES CALCIQUES	125
III.IV. TECHNIQUES MOLECULAIRES ET BIOCHIMIQUES	126
III.V.1. MESURE DE L'HYPERTROPHIE : IMMUNOMARQUAGE SUR COUPE.....	126
III.V.2. MESURE DE LA FIBROSE PAR COLORATION : TRICHROME DE MASSON	126
III.V.3. ILLUSTRATION DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE SUR COUPE DE CŒUR ENTIER AVEC COLORATION A L'EOSINE-HEMALUN (HE)	127
III.V.4. QUANTIFICATION DES ARNM / PROTEINES : PCR QUANTITATIVE / WESTERN-BLOT.	127
III.V. ANALYSE STATISTIQUE	129
<u>RESULTATS.....</u>	<u>131</u>
PARTIE 1 : ROLE DE LA TRIADINE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	132

1.	LA TRIADINE EST NECESSAIRE AFIN DE PREVENIR LE REMODELAGE CARDIAQUE DELETERE SUITE A UNE PATHOLOGIE CARDIAQUE.	132
2.	ROLE DE LA TRIADINE SUR LA DYSFONCTION CONTRACTILE CARDIAQUE CONSECUTIVE A LA TAC.....	142
3.	MECANISMES CELLULAIRES ET VOIES DE SIGNALISATION POTENTIELLES A L'ORIGINE DES EFFETS OBSERVES SUITE AU KNOCK-OUT DE LA TRIADINE	144
4.	LA TRIADINE, UNE PROTEINE A POTENTIEL THERAPEUTIQUE DANS L'IC	149
PARTIE 2 : ROLE DE LA TRIADINE DANS L'ISCHEMIE CARDIAQUE - FOCUS SUR LA GENESE DES ARYTHMIES		
VENTRICULAIRES.....		154
1.	LA TRIADINE ET LA FONCTION CARDIAQUE POST-IM	154
2.	LA TRIADINE, UNE PROTEINE QUI PREVIENT LA SURVENUE D'ARYTHMIES AU COURS DE L'ISCHEMIE CARDIAQUE	155
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>		<u>165</u>
<u>PERSPECTIVES</u>		<u>177</u>
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>		<u>179</u>
<u>ANNEXE.....</u>		<u>219</u>

Table des illustrations

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CŒUR.....	22
FIGURE 2 : SCHEMA DU RESEAU DE CONDUCTION DANS LE CŒUR.....	24
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PA DANS UN CARDIOMYOCYTE VENTRICULAIRE.	25
FIGURE 4 : SCHEMA DES CANAUX SODIQUES ET CALCIQUES A SIX SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES.	27
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN TRACE D'ECG.	28
FIGURE 6 : ULTRASTRUCTURE DU CARDIOMYOCYTE :	30
FIGURE 7 : SCHEMA DE MYOFIBRILLE.	31
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN SARCOMERE	32
FIGURE 9 : SCHEMA DU MECANISME DE CONTRACTION.	33
FIGURE 10 : SCHÉMA D'UNE DYADE..	34
FIGURE 11 : SCHEMA DETAILLE DU LTCC.	35
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU COMPLEXE DE RELACHEMENT DU Ca^{2+} FORME PAR LE RECEPTEUR DE LA RYANODINE ET SES PROTEINES ASSOCIEES.	37
FIGURE 13 : SCHEMA DU CEC CARDIAQUE EN DIASTOLE ET SYSTOLE.....	41
FIGURE 14 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LA RELATION FORCE-FREQUENCE DU MYOCARDE DANS DIFFERENTES ESPECES. MODIFIEE D'APRES JANSSEN AND PERIASAMY (2007).	45
FIGURE 15 : EFFET DE L'ACTIVATION DE LA PKA SUR LE MYOFILAMENT.....	48
FIGURE 16 : SCHEMA DES PHOSPHORYLATIONS DES PROTEINES DU CEC PAR LA PKA ET LA CAMKII.....	50
FIGURE 17 : SCHEMA DU MYOCARDE ET LES DIFFERENTS TYPES D'HYPERTROPHIE QU'IL PEUT DEVELOPPER...	53
FIGURE 18 : SCHEMA DES CAVEOLINES 3 LOCALISEES DANS LES TUBULES-T.....	65
FIGURE 19 : LA VOIE CAN/NFAT.	70
FIGURE 20 : LA VOIE CAMKII. MODIFIEE	73
FIGURE 21 : GSK-3B DANS LE CARDIOMYOCYTE.	76
FIGURE 22 : SCHEMATISATION DES MODIFICATIONS ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE LORS DE L'IC.	78
FIGURE 23 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES PRINCIPALES CAUSES DE MORTALITE AUX ETATS-UNIS POUR LES PERSONNES DE PLUS DE 40 ANS.	88
FIGURE 24 : SCHÉMA D'EAD.....	91
FIGURE 25 : SCHÉMA D'UNE DAD.	92
FIGURE 26 : SCHEMA DU PHENOMENE DE REENTREE. MODELE DE REENTREE	94
FIGURE 27 : SCHEMA DES EFFETS DES MUTATIONS RYR2 ET CSQ2 DANS LE CARDIOMYOCYTE.....	97
FIGURE 28 : STRUCTURE DES ISOFORMES DE LA TRIADINE.....	104
FIGURE 29 : CARACTERISATION DU MODELE MURIN DE KNOCK-OUT TOTAL DE LA TRIADINE.	114
FIGURE 30 : SCHEMA D'UNE STENOSE DE L'AORTE ASCENDANTE (TAC). D'APRES VAN ROOIJ AND OLSON (2007)	115
FIGURE 31 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU TAUX DE SURVIE DES SOURIS WT ET KO TRD APRES UNE TAC.	115
FIGURE 32 : SCHEMA DE LA LIGATURE DE LA CORONAIRE GAUCHE DU MYOCARDE OU IM.	116
FIGURE 33 : SCHEMA DE LA TRANSDUCTION AAV9 –CT1 <i>IN VIVO</i> ET DES EXPERIENCES EN FONCTION DU TEMPS. S : SEMAINE.	117
FIGURE 34 : EXEMPLE D'UN TRACE OBTENU PAR LE CATHETER DE PRESSION A L'INTERIEUR DU VG D'UNE SOURIS WT.....	121
FIGURE 35 : SCHEMA GENERAL DU DISPOSITIF DE PATCH-CLAMP.....	122
FIGURE 36 : DETERMINATION DES INTERVALLES CARACTERISTIQUES DE L'ECG DE SOURIS.	124
FIGURE 37 : ILLUSTRATION DE L'ACQUISITION DE SPARKS CALCIQUES SUR UN CARDIOMYOCYTE CHARGE AU FLUO-4AM.	125
 TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS DONT SONT ISSUS LES BIOPSIES DE VG.	119
TABLEAU 2 : LISTE DES PRIMERS UTILISES EN PCRQ.	128
TABLEAU 3 : LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN WESTERN-BLOT ET EN IMMUNOMARQUAGE.	129

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. STRUCTURE ET FONCTION CARDIAQUE

I.1. STRUCTURE DU MYOCARDE

(a) LE MYOCARDE

(i) ANATOMIE

Le myocarde est le tissu musculaire du cœur. C'est un muscle strié formé de quatre cavités : les chambres auriculaire et ventriculaire droites sont séparées par les valves tricuspides, comme les chambres auriculaire et ventriculaire gauches le sont par les valves mitrales (Figure 1).

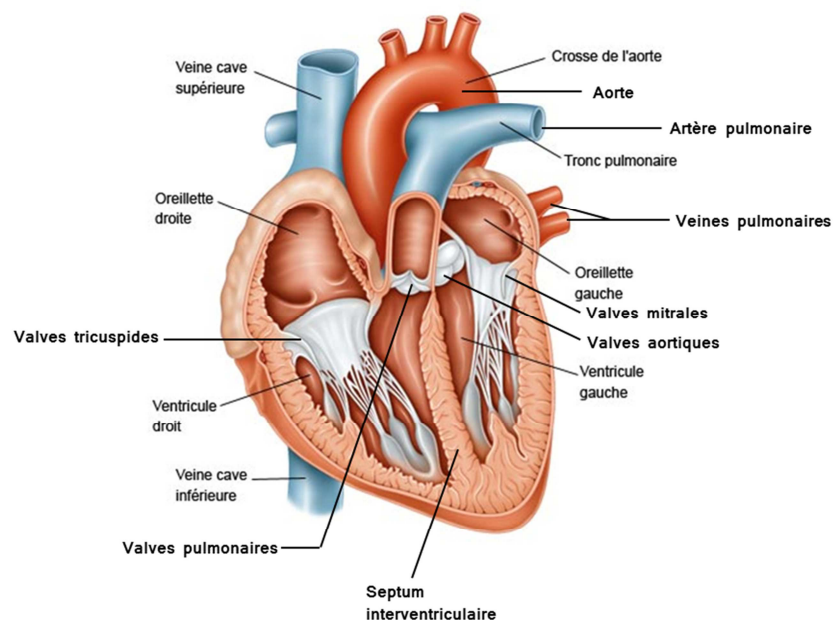


Figure 1 : Représentation schématique du cœur. Modifiée d'après <http://www.eurekasante.fr>.

(ii) CYCLE CARDIAQUE

La contraction (systole) et la relaxation (diastole) synchronisées des oreillettes puis des ventricules assurent la circulation sanguine pour tout l'organisme. Au cours de la diastole, le sang provenant des veines pulmonaires, des veines caves supérieures et inférieures remplit respectivement les cavités auriculaires gauche et droite. La pression ainsi développée dans les cavités auriculaires permet d'ouvrir les valves cardiaques et le remplissage des ventricules. Pendant la systole, la contraction synchronisée des oreillettes puis des ventricules, vide dans un premier temps les chambres auriculaires puis éjecte le sang contenu dans les chambres ventriculaires droite et gauche dans l'artère pulmonaire et l'aorte respectivement (Figure 1).

Les capacités de contraction et de relaxation du myocarde sont reliées aux propriétés d'automatisme, d'excitabilité, de contraction et de relaxation des cellules qui le composent. L'automatisme et l'excitabilité des cardiomyocytes reposent sur le potentiel d'action (PA). C'est un phénomène électrique qui naît à la suite d'une stimulation électrique de la cellule.

(iii) L'AUTOMATISME CARDIAQUE ET SON RESEAU DE CONDUCTION

Pour conduire le PA dans l'ensemble du muscle cardiaque et permettre sa contraction, le myocarde est muni d'un réseau de conduction particulier. Tout part du nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite. Il est constitué de cellules myocardiques particulières, les cellules nodales, possédant la capacité de dépolarisation autonome. Elles ont un phénotype embryonnaire avec des composants myofibrillaires peu évolués. L'activité sinusale est régulée par des ganglions nerveux, situés dans une panicule adipeuse à son contact.

Le nœud sinusal est l'initiateur d'impulsions. L'onde d'excitation va d'abord traverser les deux oreillettes grâce au tissu nodal ou cardionecteur et se dirige vers le nœud auriculo-ventriculaire. Par la suite les voies de conduction seront le faisceau et les branches de His,

pour finir dans le réseau de Purkinje et ses fibres. Cette dernière étape, à partir du faisceau de His, permet la propagation de l'onde d'excitation vers les deux ventricules (Figure 2).

La dépolarisation intercellulaire au sein du myocarde s'effectue par la transmission des courants locaux intracellulaires grâce aux jonctions communicantes (*gap junctions* en anglais), formées par les connexines (Cx) (Figure 6.A). Elles permettent la synchronisation de l'activation cardiaque. Elles sont également exprimées par toutes les cellules présentes dans le myocarde (cardiomyocytes, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, ...) (Nielsen et al. (2012)). La Cx43 est la plus exprimée dans les ventricules et son réarrangement représente le premier élément perturbateur de la conduction (Burstein et al. (2009)).

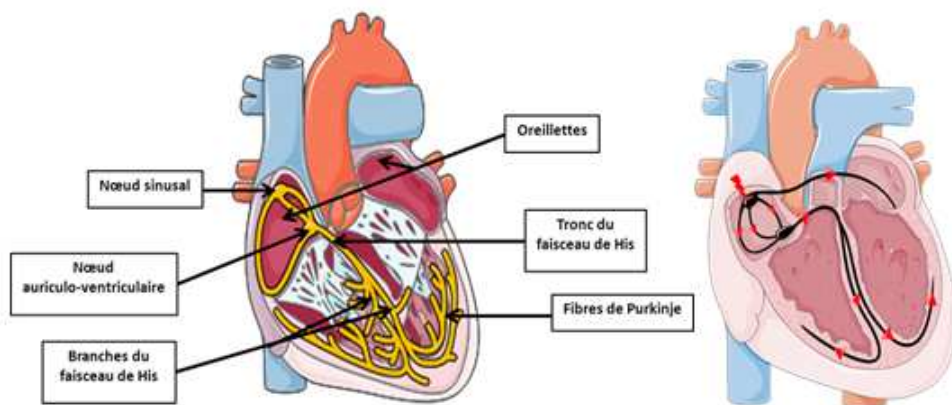


Figure 2 : Schéma du réseau de conduction dans le cœur.

(iv) L'ACTIVITE ELECTRIQUE DU CŒUR

i. LE POTENTIEL D'ACTION

Une cellule vivante est polarisée et possède un potentiel de membrane. Au repos, une cellule myocardique a un potentiel de membrane d'environ -80 mV. Lorsqu'elle se trouve excitée par un stimulus électrique, elle se dépolarise. Quand le potentiel de membrane atteint la valeur de 0mV et va au-delà, c'est la dépolarisation. Le potentiel initial se régénère

par la suite : c'est la repolarisation, qui est plus lente que la dépolarisation. La repolarisation est composée de deux phases : l'initiale est lente et la suivante est rapide. L'ensemble de ce processus est appelé potentiel d'action (PA).

La naissance du PA cardiaque a lieu dans le nœud sinusal (Figure 2). Les cellules nodales, qui composent ce dernier, assurent l'automatisme cardiaque de base. Elles génèrent une oscillation périodique spontanée de leur potentiel de membrane. L'activité électrique périodique du nœud sinusal résulte d'une dépolarisation spontanée et progressive du potentiel de membrane à la fin de la phase de repolarisation du PA durant laquelle les cellules atteignent leur potentiel le plus négatif. La dépolarisation spontanée au sein de nœud sinusal a lieu à un rythme précis, correspondant à la fréquence cardiaque : c'est l'activité pacemaker. Le courant I_f (f pour « funny ») a été particulièrement associé à la génération de cette activité « pacemaker ». Ce courant est ainsi dénommé car il possède la caractéristique atypique d'être activé par l'hyperpolarisation du potentiel de membrane. I_f s'active entre -50 et -80 mV à la fin de la repolarisation et au cours de la dépolarisation diastolique.

La forme du PA découle d'un équilibre entre les courants ioniques membranaires de dépolarisation et de repolarisation (Kushnir and Marks (2010)) (Figure 3).

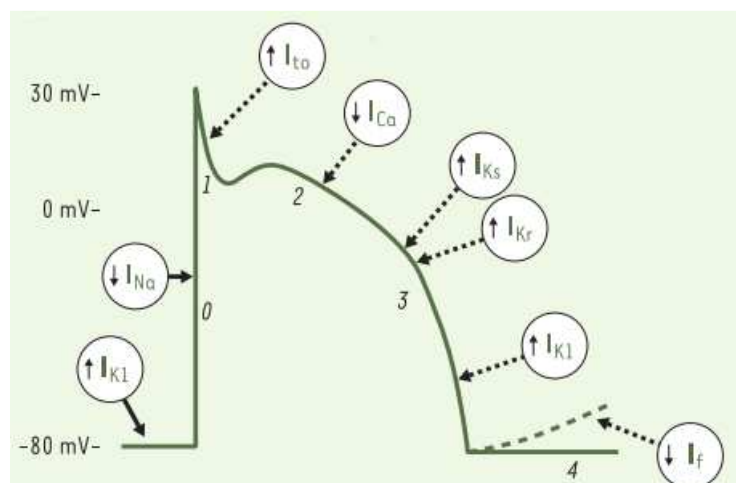


Figure 3 : Représentation schématique d'un PA dans un cardiomyocyte ventriculaire. D'après Pourrier and Nattel (2004)

La phase 0 du PA (dépolariation rapide de la membrane) d'une cellule ventriculaire commence lors de l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants ($\text{Na}_v1.5$) (Na pour sodique et v pour voltage) (Figure 4). L'ouverture des canaux Na^+ entraîne un courant sodique entrant court et d'amplitude élevée s'activant à partir -80 mV. La vitesse importante de dépolariation de la phase 0 s'acquiert par un mécanisme de rétrocontrôle positif, amplifiant l'entrée de Na^+ et la dépolariation. Ainsi l'entrée de Na^+ dépolariise la cellule et cette dépolariation accentue la probabilité d'ouverture des canaux sodiques ($\text{Na}_v1.5$). Avec l'évolution de cette phase de dépolariation, les canaux calciques de type L (*long lasting*) (I_{CaL}), impliquant les canaux calciques de type L (LTCC ou $\text{Ca}_v1.2$), sont activés à un potentiel de membrane autour de -40 mV (Figure 4).

Le courant I_{to} ($\text{to} = \text{transient outward}$), constitué de deux composantes distinctes - un canal K^+ et Cl^- respectivement I_{to1} et I_{to2} conduit une repolarisation précoce du ventricule lors de la phase 1. C'est un courant sensible à la fréquence de stimulation : avec l'augmentation de la fréquence, son intensité diminue. Il a donc une place importante dans l'adaptation de la durée du PA à la durée d'un cycle.

Durant la phase 2 du PA ou phase de plateau, le courant calcique I_{CaL} des LTCC et les courants potassiques sortants I_{K} , combinaison d'une composante rapide I_{Kr} (canal HERG) (Figure 3) et d'une composante lente I_{Ks} (canal KvLQT1) (Figure 3) assurent l'équilibre. L'entrée d'ions Ca^{2+} , durant cette phase, va déclencher la décharge du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et permettre la contraction. Ce phénomène est appelé *Calcium induced calcium release*, ou CICR.

Au cours de la phase 3 ou phase de repolarisation, le courant calcique I_{CaL} s'inactive progressivement tandis que les courants potassiques, toujours actifs, participent à la repolarisation cellulaire. La phase finale de repolarisation est assurée par la sortie d'ions potassiques. Le courant à rectification entrante I_{K1} la prend en charge avec le canal Kir2.1 (canaux potassiques à deux segments transmembranaires).

La phase 4 correspond à la phase de repos du PA. Le courant de fond entrant, responsable de la phase de repos du PA, est la résultante d'un flux entrant du courant $I_{\text{Na/Ca}}$ par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) et d'un flux sortant plus faible du courant $I_{\text{Na/K}}$. Parallèlement les canaux pacemaker I_{f} , canaux codés par les gènes HCN isoforme 4 dans le

nœud sinusal, sont activés en fin de repolarisation. L'ensemble de ces mécanismes ioniques, avec le courant calcique de type T (*transient*) sont responsables de la dépolarisation lente intervenant dans la genèse d'un nouveau PA dans les cellules du nœud sinusal. La phase 4 dans les myocytes auriculaires, ventriculaires et les cellules de Purkinje, ont une dépolarisation diastolique très lente (entre -90 et -80 mV) par le courant K^+ rectifiant entrant I_{K1} (canaux Kir 2.1 et Kir 2.2).

La période réfractaire (PR) se définit comme la période durant laquelle normalement un nouveau PA ne peut être déclenché. La PR est associée à l'inactivation des canaux sodiques. Les LTCC jouent un rôle central dans la détermination de la durée de cette période réfractaire, en assurant une activation électrique du myocarde au moment opportun (Antzelevitch et al. (2007)). La PR absolue est la période pendant laquelle il est difficile de déclencher un nouveau PA : tous les canaux sodiques sont inactivés (phase 2 du PA). La PR relative correspond à l'intervalle où un stimulus d'intensité importante peut déclencher un nouveau PA (sortie croissante de l'état inactivé des canaux sodiques en phase 3). La période réfractaire empêche la tétanisation du myocarde.

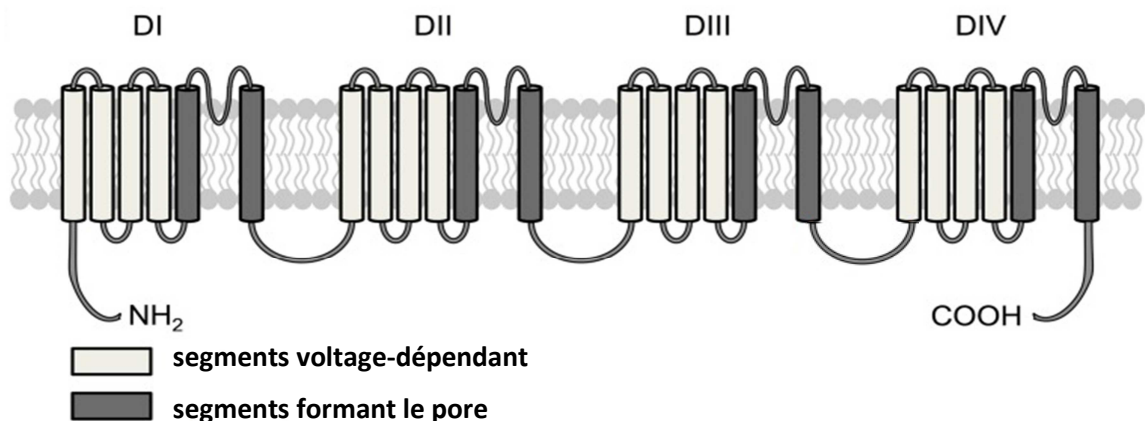


Figure 4 : Schéma des canaux sodiques et calciques à six segments transmembranaires. Modifiée d'après Moreau et al. (2013).

Le PA repose principalement sur des composantes de courants sodiques, potassiques ainsi que calciques. A l'échelle du cardiomyocyte, il est possible de le mesurer grâce à la technique du patch-clamp et à l'échelle du cœur par un électrocardiogramme.

ii. L'ELECTROCARDIOGRAMME (ECG)

L'électrocardiogramme (ECG) permet l'enregistrement de l'activité électrique de surface du cœur.

Chaque battement cardiaque peut se décomposer en trois périodes (figure 5) :

1. L'onde P correspond à la dépolarisation auriculaire.
2. Le complexe QRS représente la dépolarisation ventriculaire ainsi que sa durée. La repolarisation auriculaire a lieu au même moment.
3. L'onde T montre la repolarisation ventriculaire.

Les intervalles PR et QT renseignent sur des cinétiques. L'intervalle PR représente le temps de conduction de l'onde de dépolarisation des oreillettes aux ventricules. Tandis que l'intervalle QT informe sur le temps qui s'écoule entre la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire. Le segment PR décrit le temps qui s'écoule entre la fin de la systole auriculaire et le début de la systole électrique ventriculaire. Le segment ST décrit le début de la repolarisation des ventricules et correspond à la phase de repolarisation lente en « plateau » des myocytes ventriculaires.

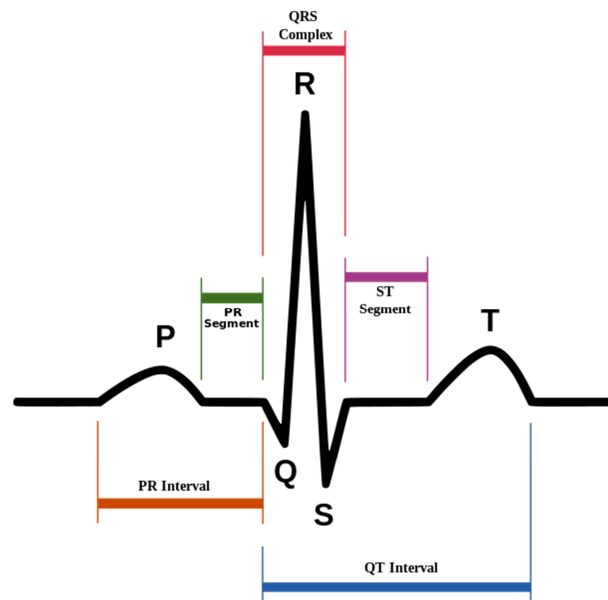


Figure 5 : Représentation schématique d'un tracé d'ECG.

L'ECG permet d'analyser le rythme cardiaque, pour repérer les arythmies ou examiner l'état du système nerveux autonome (Malik and Camm (1993)). En outre, il renseigne sur l'état du tissu cardiaque, particulièrement sur la présence d'une ischémie ventriculaire. L'interprétation de l'ECG consiste à déduire l'évolution de l'excitation et de la repolarisation dans le tissu myocardique.

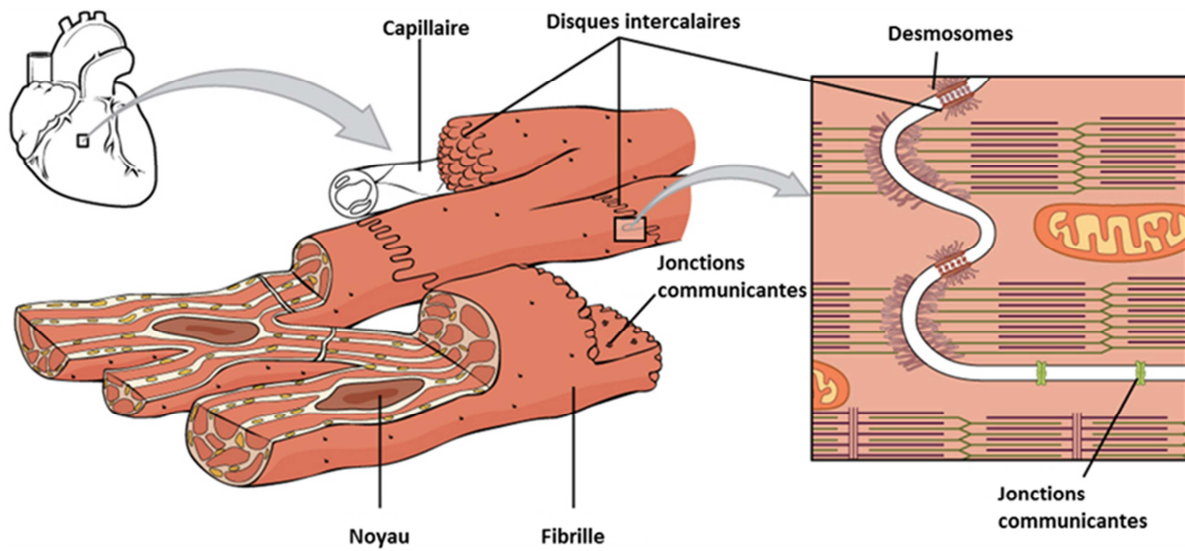
(b) LE CARDIOMYOCYTE

Le cœur contient 75% de cardiomyocytes en volume mais ceux-ci ne représentent qu'entre 30-40% du nombre total de cellules du cœur. Les fibroblastes et les cellules endothéliales y sont présents dans une proportion de 60-70%.

Les cardiomyocytes ont des caractéristiques communes aux cellules musculaires striées squelettiques. Une membrane, le sarcolemme, entoure les myofibrilles qui occupent 80% de leur cytoplasme. Le cardiomyocyte possède une forme spécialisée du réticulum endoplasmique lisse : le réticulum sarcoplasmique (RS). Cette structure particulière forme un réseau de canalicules longitudinaux entourant chaque myofibrille et permet le stockage du Ca^{2+} indispensable à la contraction musculaire. Le cardiomyocyte contient également un système de tubules transverse (tubules-T) : des invaginations canaliculaires du sarcolemme dans le cytoplasme, espacées régulièrement et en contact avec le RS. Les tubules-T permettent la propagation du PA à l'intérieur de la cellule musculaire (Figure 6.B.).

Les cardiomyocytes ont également leurs propres caractéristiques. Ils possèdent un plus grand pool énergétique avec une plus grande quantité de mitochondries et des grains de glycogène abondants. Les cardiomyocytes sont connectés entre eux pour former un réseau tridimensionnel. Entre l'ensemble des cellules myocardiques, la cohésion mécanique et le couplage électrique sont assurés par un dispositif de jonction spécifique : les jonctions communicantes et les desmosomes. Elles permettent le couplage électrique des cardiomyocytes en laissant passer des électrolytes, des petites molécules de moins d'un kDa de masse moléculaire et des seconds messagers (Ca^{2+} , AMPc, ions) (Figure 6.A.).

A.



B.

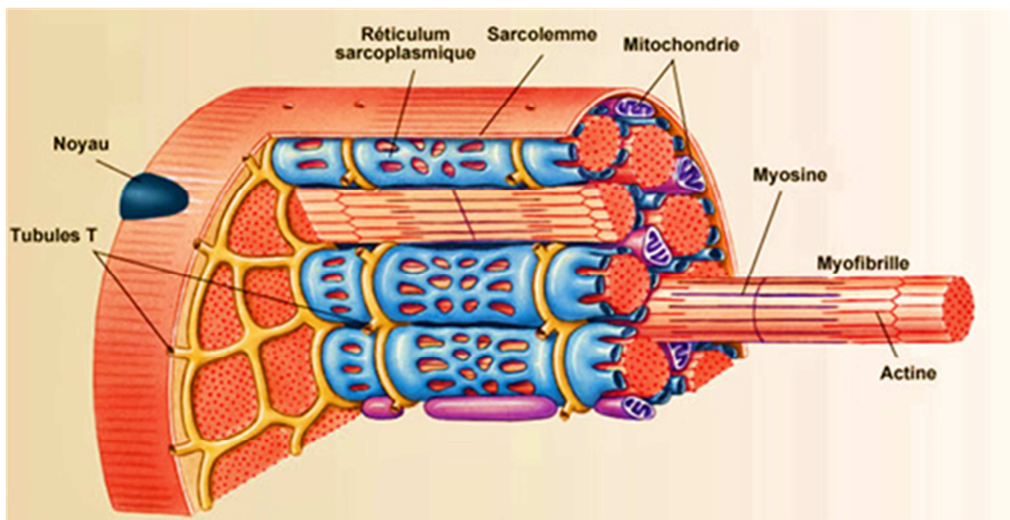


Figure 6 : Ultrastructure du cardiomyocyte : A. Représentation schématique des cardiomyocytes et de leurs sarcolemmes contenant les jonctions communicantes et desmosomes. **B.** Ultrastructure d'un myocyte.

(c) LA MYOFIBRILLE

La myofibrille est l'unité contractile du myocyte. Elle est reliée à la membrane plasmique par des filaments intermédiaires qui permettent à la cellule musculaire d'avoir une certaine élasticité : elle se contracte et se décontracte sans se rompre. Les myofibrilles des cardiomyocytes forment une large masse cylindrique, allongée dans le sens de la cellule et incomplètement divisée par des zones cytoplasmiques et nucléaires. Cette masse cylindrique est composée de petits cylindres mis bout à bout : les sarcomères (Figure 7).

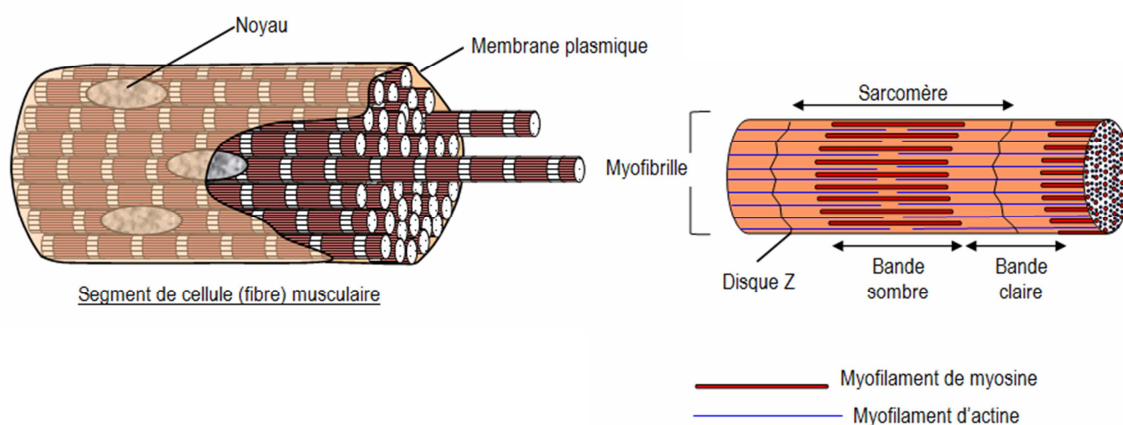


Figure 7 : Schéma de myofibrille.

(d) LE SARCOMERE

Le sarcomère est la structure centrale responsable de l'activité contractile du cœur. Il est compris entre deux stries Z. Il est composé principalement par des filaments de myosine, actine et titine (Figure 8). Des interactions cycliques ont lieu entre les filaments épais de myosine et fins d'actine qui forment alors un pont. Les forces générées lors de ces interactions cycliques constituent la base moléculaire de la pression cardiaque, le

mouvement produit par ces ponts d'actomyosine est à la base de l'éjection du sang hors du cœur.

Le cycle de la contraction est basé sur un mécanisme moléculaire particulier expliqué par la théorie des filaments glissants. Le glissement des filaments d'actine sur ceux de la myosine dépend de la formation des ponts d'actomyosines (interaction entre les têtes globulaires de myosine et actine). Cette interaction active l'ATPase de la myosine. L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP se retrouve convertie en énergie mécanique. Ceci provoque le pivotement de la tête de myosine capable de tracter les filaments fins d'actine. La force développée par le muscle est directement proportionnelle aux zones de recouvrement entre les filaments épais (myosine) et fins (actine) et les ponts d'actomyosines formés (Figure 9).

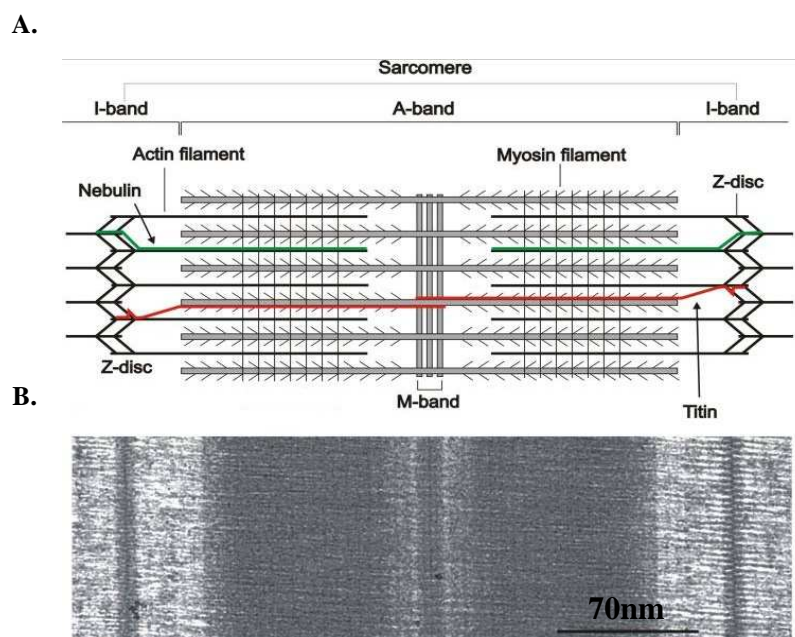


Figure 8 : Représentation schématique d'un sarcomère (A) et son illustration en microscopie électronique en transmission (MET) (B). D'après Luther (2009).

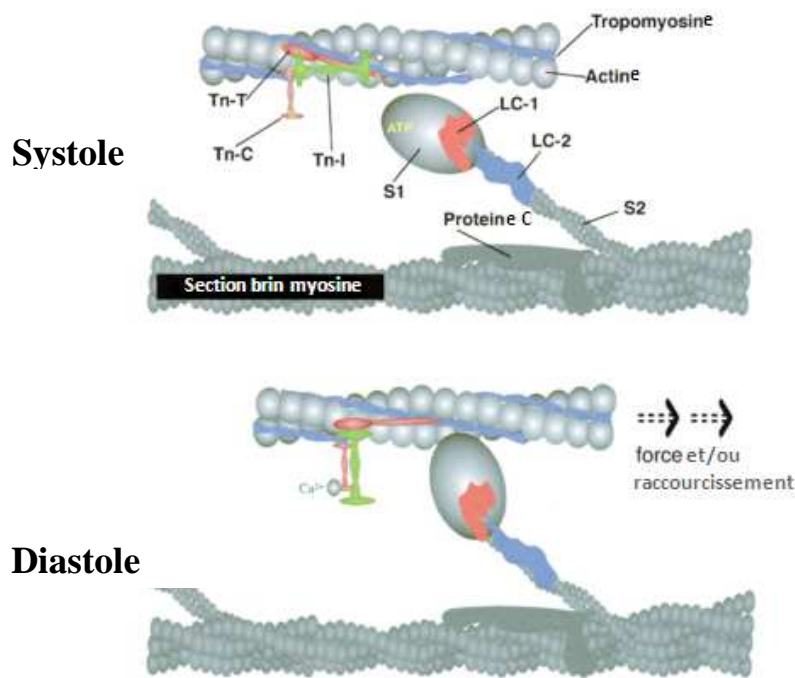


Figure 9 : Schéma du mécanisme de contraction. Modifiée d'après de Tombe (2003).
 Abréviations (de gauche à droite) : Troponine-T (Tn-T), Troponine-C (Tn-C), Troponine-I (Tn-I), ATP (Adénosine triphosphate), Portion de tête globulaire de la myosine (S1), *Light Chain* 1 et 2 (LC1 et LC2) et Région de tige de la myosine qui s'articule (S2).

1.2. LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (CEC)

Le couplage excitation-contraction (CEC) rassemble les mécanismes amenant la cellule cardiaque de l'excitation électrique à la contraction de l'ensemble de l'organe (Bers (2002a)). Il commence dans une organisation subcellulaire spécifique : la dyade pour le cœur et la triade pour le muscle squelettique.

La formation d'une dyade s'effectue par le resserrement de deux structures membranaires particulières, les tubules transverses (ou tubules-T) et le réticulum sarcoplasmique jonctionnel (ou RSj) (figure10) :

_les tubules-T sont des invaginations membranaires transversales de la membrane cellulaire des cardiomyocytes, ou sarcolemme. Cette structure conduit la dépolarisation membranaire

au cœur de la cellule par les courants calciques de type L, portés par les canaux calciques voltage-dépendant de type L, *long lasting* (LTCC), L-type Ca^{2+} channels, appelés aussi récepteurs des dihydropyridines, DHPR.

_le réticulum sarcoplasmique (ou RS) est un organe intracellulaire destiné au stockage et à la libération de Ca^{2+} indispensable à la contraction des myofilaments. Il est déterminant pour l'homéostasie calcique intracellulaire et le CEC. Il s'organise en deux compartiments : le RS longitudinal, se structurant le long des sarcomères et le RSj, citerne terminale du RS, disposé en face des tubules-T, au niveau des dyades. Le récepteur de la ryanodine de type 2 (RyR2), l'isoforme cardiaque du canal RyR, se trouve dans ce dernier compartiment en face du LTCC.

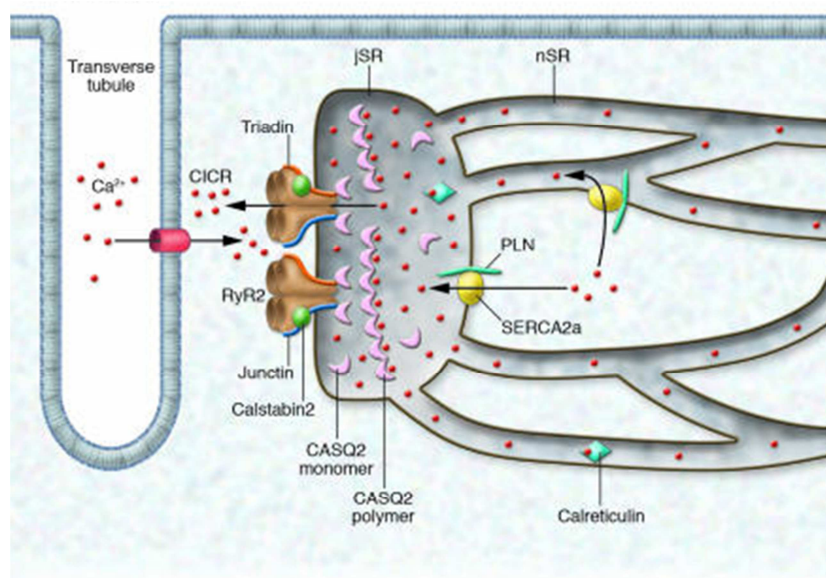


Figure 10 : Schéma d'une dyade. D'après S. Gyorke, Hagen, Terentyev, and Lederer (2007).

(a) DE L'EXCITATION AU RELACHEMENT DU Ca^{2+}

Le CEC, dans le cœur, repose en premier lieu sur les deux canaux calciques responsables du relâchement calcique cardiaque (ou complexe de relâchement calcique cardiaque, CRC) : les canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCC) et le récepteur de la ryanodine de type 2 (RyR2).

- (i) LES CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DEPENDANTS DE TYPE L (LTCC) (POUR REVUE : HARVEY AND HELL (2013))(FIGURE 11)

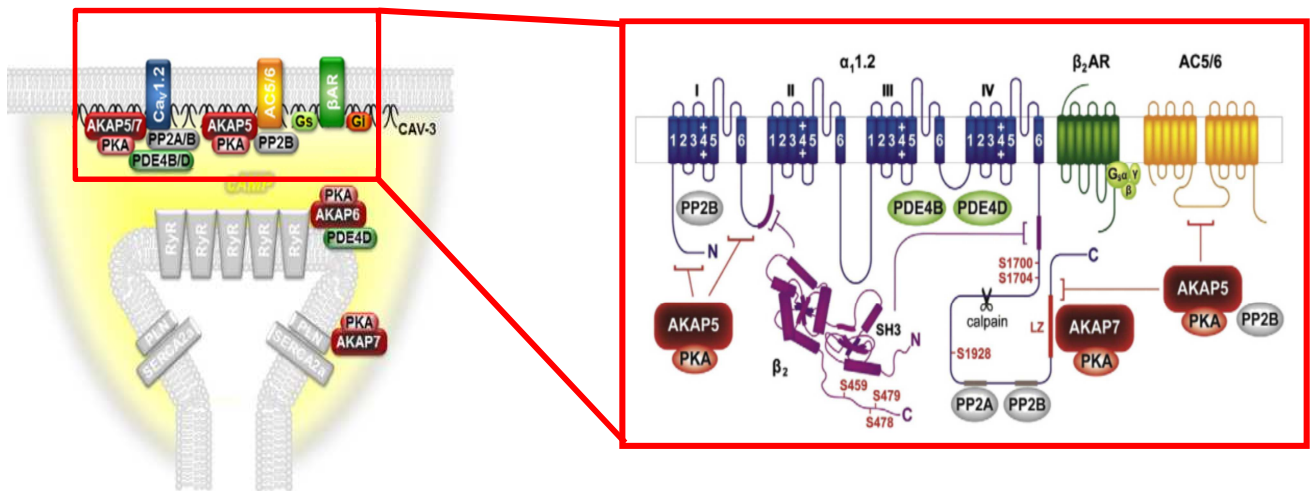


Figure 11 : Schéma détaillé du LTCC. Modifiée d'après revue : Harvey and Hell (2013).

Il existe deux types de canaux calciques dans les cardiomyocytes : les type L (*long lasting*, LTCC) et les type T (*transient*, TTCC) (Rougier, Vassort, Garnier, Gargouil, and Coraboeuf (1969) ; Nilius, Hess, Lansman, and Tsien (1985)). Les premiers, les plus nombreux, sont les acteurs majeurs du couplage excitation-contraction (CEC). L'expression des canaux calciques de type L est focalisée au fond des tubules-T. Il existe quatre isoformes de LTCC : Ca_v 1.1 à Ca_v 1.4. Chacune est un complexe protéique multimérique formé d'une des sous-unités α_1 lui correspondant (α_1 1.2 pour Ca_v 1.2) associée à des sous-unités auxiliaires β , $\alpha_2\delta$ et γ (Catterall (2000)).

La sous-unité α_1 forme le pore de conduction des ions et définit l'isoforme de ce canal calcique. Elle est composée de quatre domaines homologues (I-IV) contenant chacun six segments transmembranaires (S1-S6) et le pore est formé par les boucles P situées entre les segments S5-S6. Ca_v 1.2 est le LTCC majoritaire dans les ventricules (Bers and Perez-Reyes (1999)). L'activation de l'activité intrinsèque du canal est possible dans cette sous-unité grâce au segment S4. Le déplacement des charges par la dépolarisation membranaire conduit à un changement de conformation indispensable à l'ouverture. Le courant I_{CaL} qui en résulte est donc un courant voltage-dépendant entrant qui s'active rapidement à partir d'un potentiel de l'ordre de -40 mV. Son pic maximal se trouve entre 0 et +10 mV, potentiels

rappelant le plateau du PA et décline au fur et à mesure que le potentiel se rapproche du potentiel d'équilibre du Ca^{2+} , entre 60 et 70 mV.

La sous-unité β existe sous quatre isoformes et permet l'ancrage du canal à la membrane, tout comme la sous-unité $\alpha_2\delta$ qui régule aussi l'ouverture du canal (Dolphin (2013)). Elle est située sur la face cytosolique du canal (β_2 pour $\text{Ca}_v1.2$) et permet l'activation et l'inactivation voltage-dépendante du canal (Singer et al. (1991) ; Kamp, Perez-Garcia, and Marban (1996) ; A. J. Chien et al. (1995)). La sous-unité γ participe comme la sous-unité β_2 à l'activation et l'inactivation du canal.

L'activité d'un canal unitaire LTCC change suivant les différents modes d'ouverture : le Mode 0 correspond à une très faible probabilité d'ouverture (P_o), le Mode 1 (ou Mode de base) a des ouvertures de courte durée et une P_o plus importante et le Mode 2 se caractérise par une P_o élevée et des ouvertures de longue durée. Le passage du Mode de base au Mode 2, dit facilitation, est entretenu par différentes conditions : l'augmentation de la fréquence de stimulation ou de la fréquence cardiaque (FC), la phosphorylation du canal par des protéines kinases (la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et la Ca^{2+} /Calmoduline protéine kinase de type II (CaMKII), des agonistes, les sous-unités du canal et/ou lors d'une dépolarisation importante. La facilitation permet d'augmenter l'amplitude et le temps d'inactivation du courant. Ce mode soutient également la relation de force-fréquence (RFF) des cardiomyocytes (Hess et al. (1984) ; Benitah et al. (2010) ; Harvey and Hell (2013)).

L'activation comme l'inactivation du canal LTCC dans le temps dépend de deux paramètres : le voltage et le Ca^{2+} lui-même. L'inactivation du courant I_{CaL} s'effectue en deux temps : rapidement, en 3 à 7 ms, dépendamment du Ca^{2+} et lentement, de 30 à 80 ms, dépendamment du voltage. La régulation des cinétiques d'inactivation influence la quantité de Ca^{2+} entrant dans la cellule à chaque cycle mais également la durée du PA et le CEC qui en découle. Réciproquement, l'inactivation étant en partie dépendante du Ca^{2+} , toute modification du cycle calcique et/ou de l'homéostasie calcique intracellulaire peut avoir une incidence sur le courant I_{CaL} (Benitah et al. (2010) ; Harvey and Hell (2013)).

(ii) LE RECEPTEUR DE LA RYANODINE DE TYPE 2 (RYR2)

Ancré dans la membrane du RS cardiaque, le RyR2 est responsable de la libération du Ca^{2+} du RS lors du CEC, par l'augmentation locale de la concentration cytosolique de Ca^{2+} via le courant I_{CaL} des canaux LTCC : en anglais *Calcium induced calcium release* (CICR) ou libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} . Le RyR2 a été identifié et isolé grâce à un alcaloïde végétal neutre : la ryanodine. Cette dernière est un agoniste pour le canal à des concentrations de l'ordre du nM et devient un antagoniste à de plus fortes concentrations (μM). A ce jour, il est le plus grand canal ionique découvert (>2MDa) et existe sous trois isoformes chez les mammifères. RyR2 est l'isoforme prédominante dans le cœur (Nakai et al. (1990) ; Otsu et al. (1990)). RyR2 est un homotétramère (565 kDa par sous-unité). La région cytoplasmique du récepteur (90% du canal) contient des sites de régulation par différentes protéines : la calstabile 2 (FKBP12.6), la calmoduline (CaM), la sorcine, la CaMKII, les phosphatases de type 1 (PP1) et 2A (PP2A) par leurs protéines d'ancrage respectives la spinophiline et la PR130, la PKA et la phosphodiesterase PDE4D3 par leur protéine d'ancrage mAKAP. Ses partie transmembranaire et lumenale (10% du canal) participent à la formation du pore pour le passage des ions Ca^{2+} à travers la membrane du réticulum (Figure 12).

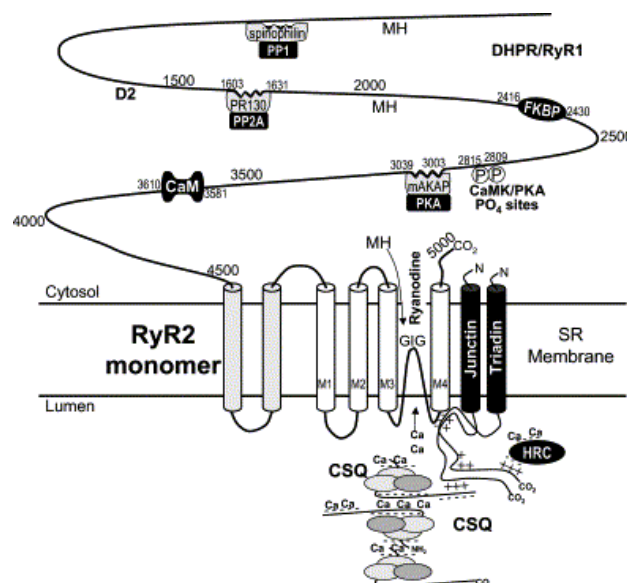


Figure 12 : Représentation schématique du complexe de relâchement du Ca^{2+} formé par le récepteur de la ryanodine et ses protéines associées. D'après Bers (2004).

L'ion Ca^{2+} est le facteur le plus important pour RyR2 car il régule son ouverture et sa fermeture (S. R. Chen, Zhang, and MacLennan (1994)). Le Ca^{2+} peut se fixer sur deux sites de la face cytosolique du canal. Le premier, de haute affinité, permet l'ouverture et la fermeture du canal pendant le CICR. Le deuxième, de faible affinité, est responsable de l'inactivation du canal à la fin du CICR (Bezprozvanny, Watras, and Ehrlich (1991) ; Smith, Coronado, and Meissner (1986) ; Zimanyi and Pessah (1991)). Lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cytosolique}}$ est faible (100 à 200 nM), le canal reste en position fermée (Copello, Barg, Onoue, and Fleischer (1997)). L'élévation de cette même concentration permet la fixation d'ions Ca^{2+} sur les sites de haute affinité du canal et entraîne son ouverture (augmentation de sa probabilité d'ouverture, P_0). L'activité maximale du canal est atteinte lorsque la concentration cytosolique est de 10 μM . Au-delà de cette concentration P_0 diminue.

Le canal est aussi sensibilisé au Ca^{2+} présent sur sa face luminale dans le RS. En effet, dans un modèle *in vitro* où le canal se trouve dans une bicouche lipidique, P_0 augmente avec la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intraluminal}}$. La constante de dissociation du Ca^{2+} intraluminal qui détermine l'activation de RyR2 approche 1 mM et correspond à la valeur de Ca^{2+} intraluminal en diastole. Dans la cellule, le Ca^{2+} intraluminal interviendrait dans l'inactivation du canal pour terminer le CICR quand il atteint une valeur seuil basse et également maintiendrait le canal fermé le temps que le RS refasse son stock calcique, déterminé par une valeur seuil haute. Au-delà, il y aura une libération de Ca^{2+} par une surcharge de Ca^{2+} dans le RS ou *Store operated induced Ca^{2+} release* (SOICR). Le mécanisme du canal pour le sensibiliser au Ca^{2+} intraluminal reste à déterminer. Il est certain que l'interaction avec la calséquestrine seule (pas encore prouvée) et la calséquestrine via ses protéines d'ancrage, la triadine (Trd) et la junctine (JNC), permet de l'y sensibiliser (description dans les paragraphes suivants). Le maintien de ce complexe est essentiel à l'homéostasie calcique du cardiomyocyte, au CEC. Il intervient également dans des pathologies cardiaques avec une altération de sa fonction par ces protéines régulatrices. Récemment il a été découvert qu'une boucle de la structure de RyR2, composant l'intérieur du pore du canal, participe à la sensibilisation de RyR2 au Ca^{2+} luminal du RS. Elle limite également les vagues et les arythmies dépendantes de RyR2 (Y. Zhang et al. (2011) ; W. Chen et al. (2014)).

i. FKBP12.6 (ISOFORME CARDIAQUE) OU LA CALSTABINE 2

FKBP12.6 ou calstabine 2 est une protéine de 12,6 kDa, partenaire de RyR2 du côté cytoplasmique. Un FKBP12.6 se lie à un monomère de RyR2. Les sites de liaison entre ces deux protéines sont sujets à controverse car de nombreux sites ont été trouvés (Masumiya, Wang, Zhang, Xiao, and Chen (2003) ; Y. Zhang, Matthews, Lei, and Huang (2013) ; Zissimopoulos and Lai (2005) ; Meng et al. (2007)). Des mesures électrophysiologiques de l'activité de RyR2 indiquent que l'interaction entre la calstabine 2 et RyR2 stabilise RyR2 à l'état fermé : la dissociation augmente la P_0 du canal et conduit à des états de sous conductance (Lacampagne, Fauconnier, and Richard (2008)).

ii. LA CALSEQUESTRINE 2 (ISOFORME CARDIAQUE) (CSQ2)

La CSQ2 (65kD) est la protéine majoritaire du RS cardiaque capable de lier le Ca^{2+} . Contenant de nombreux acides aminés acides (glutamate et aspartate), elle possède une forte capacité de stockage de Ca^{2+} (40 à 50 moles de Ca^{2+} par mole de CSQ2) mais avec une faible affinité de liaison (Mitchell, Simmerman, and Jones (1988)). La liaison du Ca^{2+} à la CSQ2 change sa conformation : elle se polymérise. Sa capacité de liaison au Ca^{2+} est coopérative plus il y a de Ca^{2+} plus elle se polymérise et plus elle en lie encore plus (S. Wang et al. (1998) ; H. Park et al. (2004)). Elle est susceptible de lier une concentration totale de Ca^{2+} dans le RS de 20 mM en laissant uniquement une concentration de Ca^{2+} libre de 1 mM. Ce procédé prévient la précipitation de Ca^{2+} dans le RS et la régulation de SERCA2a et RyR2 par la $[Ca^{2+}]_{intra\text{luminale}}$. La CSQ2 est donc une protéine du RS qui par sa capacité de stockage, sa libération rapide de Ca^{2+} , par son ancrage au niveau du RSj à proximité de RyR2, et sa conformation évolutive s'adapte au cycle calcique du CEC au sein du RS.

La CSQ2 forme avec le RyR2, la triadine (CT1, l'isoforme cardiaque) et la junctine (JNC) un complexe quaternaire. Le site d'interaction de la CSQ2 à ces deux protéines se restreint à la région riche en aspartate (Shin, Ma, and Kim (2000)). Il est à noter qu'à ce jour aucune étude n'a formellement mis en évidence une interaction directe entre la CSQ2 et RyR2. Cette conformation décroît selon toute vraisemblance avec l'activation de RyR2. En effet, Gyorke

et al. suggèrent que la probabilité d'ouverture (P_o) de RyR2, en présence de la Trd et la JNC est freinée par la CSQ2 à des $[Ca^{2+}]_{intra-RS}$ faibles, lorsque le Ca^{2+} lié et libre est en faible quantité dans le RS, juste après le CICR. Cette inhibition est levée à des $[Ca^{2+}]_{intra-RS}$ élevées (Ca^{2+} lié et libre), lorsque la CSQ2 est fortement liée au Ca^{2+} et dissociée du complexe (cf paragraphe sur RyR2 ci-dessus). Cela permet à la Trd et la JNC de donner le signal à RyR2 de s'ouvrir pour le CEC. La CSQ2 tient alors le rôle de senseur luminal de Ca^{2+} pour RyR2 via la CT1 et la JNC (I. Gyorke, Hester, Jones, and Gyorke (2004)).

(b) LA CONTRACTION (FIGURES 9 ET 13)

Par la libération du Ca^{2+} du RS par RyR2, la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} va être multipliée par 10, passant de 100 nM en diastole à 1 μ M en systole. L'initiation de la contraction repose sur la fixation du Ca^{2+} sur le complexe troponines (C, T, I)-tropomyosine, situé sur les filaments d'actine. Le filament fin est composé d'actine, tropomyosine, et d'un hétérotrimère de troponines (constitué de troponines (T, C, I) : Tn-T, Tn-C, and Tn-I). Le filament épais est composé de myosine, un dimère asymétrique avec une portion de tête globulaire (S1), une région de tige qui s'articule (S2) et pour finir le brin. La portion S1 de la myosine contient le domaine d'hydrolyse de l'ATP ainsi que le domaine de liaison à l'actine. La portion S1 est aussi associée à 2 hétérodimères, les chaînes légères 1 and 2 (LC-1; LC-2 ou MLC1/2). La tige de la myosine renferme également la protéine C liant la myosine (*Myosin binding protéine C* ou MyBP-C). Le Ca^{2+} en se liant à la Tn-C induit un réarrangement conformationnel de la Tn-C, renforçant la liaison entre les Tn-C/Tn-I tout en fragilisant celle entre les Tn-I/Tn-T : le complexe d'actomyosine va pivoter sur les filaments d'actine. Le mouvement de la tropomyosine expose le site de liaison de la myosine pour permettre à l'actine de s'y fixer et de former un pont d'actomyosine. Le mécanisme permettra le développement de la force et/ou le raccourcissement du sarcomère. La fixation de Ca^{2+} sur la Tn C obéit à un principe de coopération : plus il y a de ponts formés, plus la TnC fixe de Ca^{2+} (Fuchs and Martyn (2005)).

(c) LA RELAXATION (FIGURES 13)

La relaxation a lieu lorsque la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ retourne à son niveau basal par le recaptage de Ca^{2+} par le RS via SERCA2a (mécanisme principal chez les mammifères), par son extrusion de la cellule via l'échangeur Na^{2+}/Ca^{2+} (NCX1 dans le cœur), l'uniport mitochondrial et la pompe plasmatique membranaire Ca^{2+} -ATPase (PMCA) (Figure 13). Elle correspond à la fin de la disponibilité du Ca^{2+} intracellulaire. Par conséquent, les ponts d'actomyosine se détachent et la titine restitue la force de compression emmagasinée lors de la contraction (Helmes, Trombitas, and Granzier (1996)). Le sarcomère va alors retrouver sa longueur initiale.

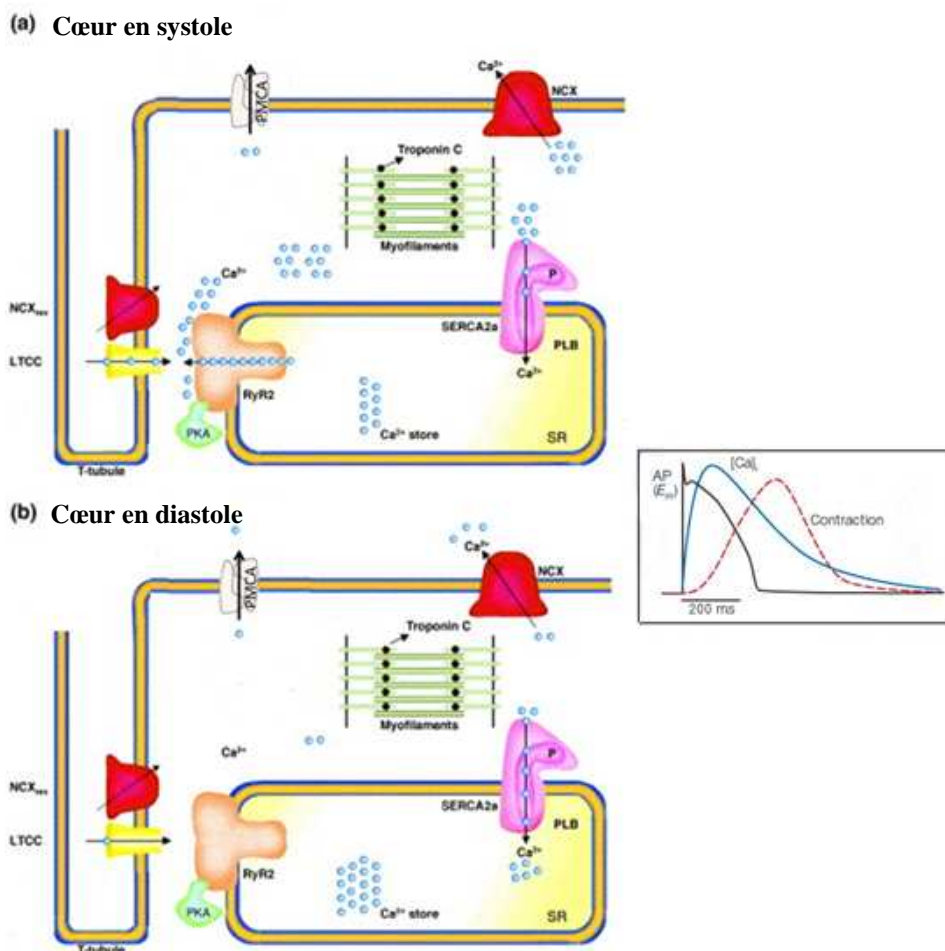


Figure 13 : Schéma du CEC cardiaque en diastole et systole. Modifiée d'après Wehrens and Marks (2003); Bers (2002a) ; Kho, Lee, Jeong, and Hajjar (2010).

(iii) L'ATPASE CALCIQUE DU RS (SERCA2A POUR L'ISOFORME CARDIAQUE)

Pendant la relaxation, plus de 80% du Ca^{2+} intracellulaire retourne au RS. Les 20% restants sont extrudés de la cellule majoritairement par NCX1 (Kranias and Hajjar (2012)).

Le recaptage du Ca^{2+} dans le RS s'effectue par les pompes SERCA. Les SERCA transportent activement deux molécules de Ca^{2+} dans le lumen du RS pour une molécule d'ATP hydrolysée. Les SERCA sont des protéines d'un poids moléculaire d'environ 100 kDa, possédant dix hélices α dans leur domaine transmembranaire. La région cytoplasmique est composée d'un domaine catalytique et un domaine de fixation à l'ATP. Douze isoformes de SERCA sont codés par trois gènes (SERCA 1, 2 et 3). Le gène SERCA2, exprimé dans le cœur, code pour trois isoformes : 2a, 2b et 2c. L'isoforme principalement exprimée dans les cardiomyocytes sains est SERCA2a. Cette pompe amplifie la relaxation cardiaque en diminuant la concentration cytosolique de Ca^{2+} et module la contraction en contrôlant la charge calcique du RS (Kranias and Hajjar (2012)).

SERCA2a interagit avec des protéines présentes dans le lumen du RS comme la HRC (*Histidine-rich Ca^{2+} binding protein*). L'interaction entre la HRC et SERCA2a est dépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$. Elle est maximale lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ est faible. L'hypothèse avancée est qu'une faible $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS luminal}}$ promeut la liaison entre l'HRC et SERCA2a pour stimuler le recaptage de Ca^{2+} alors que l'augmentation de cette même concentration favorise leur dissociation (Gregory et al. (2006)). Sur sa face cytosolique et/ ou transmembranaire, l'activité de SERCA2a est modulée par le phospholamban (PLB) qui, à l'état déphosphorylé, inhibe son affinité pour le Ca^{2+} .

(iv) LE PHOSPHOLAMBAN (PLB)

Le PLB est un homopentamère de 52 AA. La phosphorylation du PLB enlève son inhibition sur SERCA2a : l'activité de SERCA2a va croître et ainsi la vitesse de recaptage augmente. Il existe trois sites distincts de phosphorylation sur le PLB : la Ser16 par la PKA et

la PKG (protéine kinase GMPc-dépendante), la Thr17 par la CaMKII et la Ser10 par la PKC. La stimulation β -adrénergique (β -AR) peut mener à deux phosphorylations en parallèle sur la Ser16 et la Thr17. Elle aboutit à une élévation du taux de recaptage du Ca^{2+} par le RS par l'augmentation de l'activité de SERCA2a. La phosphorylation du PLB est également régulée par l'activité des phosphatases : la PP1 et la calcineurine (Zalvidea et al. (2012)). Le PLB en se liant sous sa forme monomérique à SERCA2a l'inhiberait. Par sa phosphorylation, l'inhibition se relève et le PLB se pentamérise (T. Kim, Lee, and Im (2009) ; Kranias and Hajjar (2012)).

(v) L'ÉCHANGEUR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Après la pompe SERCA2a, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) assure l'élimination du Ca^{2+} du cytosol comme le maintien de l'homéostasie calcique. Dans le ventricule du chien, du lapin et de l'Homme, le Ca^{2+} cytosolique est éliminé à 70% par SERCA, 28% par NCX et 2 % par l'uniport mitochondrial et la PMCA. Chez les rongeurs (souris et rat), 92% du Ca^{2+} du cytoplasme est éliminé par SERCA, 7% par NCX et le restant par l'uniport mitochondrial et la PMCA. NCX participe à la régulation du gain du CEC en contrôlant le contenu calcique du RS. En diastole, il entre en compétition avec la pompe SERCA pendant la diminution du transitoire calcique. Ainsi il influe sur la relaxation des myofilaments. Indépendamment de son action sur la charge calcique du RS, NCX peut réguler la quantité de Ca^{2+} au sein de la dyade, agir sur la sensibilité de Ryr2 et l'amplitude du transitoire calcique.

L'isoforme cardiaque de l'échangeur est NCX1. C'est une protéine membranaire comportant dix domaines transmembranaires (Ren and Philipson (2013)). Sa large boucle cytoplasmique hydrophile située entre sa 5^{ème} et 6^{ème} hélice présente des sites de régulation. Sur cette même boucle, il y a un site de fixation avec une forte affinité pour le Ca^{2+} . Lorsque le Ca^{2+} se fixe sur ce site, il y a un changement de conformation de la protéine primordiale à l'entrée ou la sortie du Ca^{2+} . NCX1 est activé par le Ca^{2+} intracellulaire mais inhibé par le Na^+ intracellulaire. Il est capable d'échanger 3 molécules de Na^+ contre 1 de Ca^{2+} . NCX1 est ainsi électrogénique. Il conduit un courant entrant de Na^+ (dépolarisant, le Ca^{2+} est extrudé) en mode *forward* et un courant sortant (repolarisant, le Ca^{2+} rentre) en mode *reverse*. La durée

du PA comme la FC agissent sur le mode d'action de NCX1. La prolongation du premier entretient le mode *reverse* de NCX1 à la fin de la phase du plateau et NCX1 va alors participer à la modification du potentiel durant le CEC. L'augmentation de la FC étend l'activation de l'échangeur en mode *forward* pendant la diastole. Il existe d'autres régulateurs de NCX1 : la PKC, la PKA, la PP1, la PP2B, la mAKAP, l'ATP, le pH et la température.

(d) SA REGULATION

Le cœur possède un automatisme qui lui permet d'assurer sa fonction de pompe de l'organisme pour subvenir aux besoins de l'organisme. Pour s'adapter à des situations de stress, l'organisme est doté de systèmes de régulation. Au niveau ventriculaire, la force développée est contrôlée principalement par trois paramètres :

- Le niveau de remplissage des cavités myocardiques avec une relation positive entre la pression (la force) et le volume de remplissage : c'est la loi de Frank-Starling. Les myofilaments contractiles du cœur sont capables de fournir une force de contraction d'autant plus importante qu'ils augmentent leur relâchement en diastole (accélération fréquence-dépendante de la relaxation myocardique (FDAR)),
- La fréquence des cycles cardiaques : c'est la relation force-fréquence (RFF),
- La facilitation par l'activation des récepteurs β -adrénergiques.

Ces deux derniers points vont être approfondis dans cette partie.

(i) LA RELATION FORCE-FREQUENCE (RFF)

La RFF est généralement positive dans le cœur des mammifères. La force de contraction augmente avec la fréquence de stimulation (Figure 14). La RFF est un régulateur intrinsèque notable pour la contractilité cardiaque.

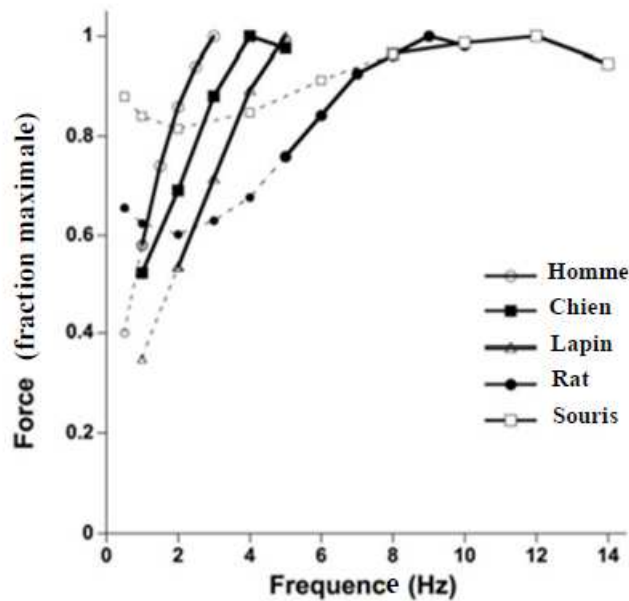


Figure 14 : Graphique représentant la relation force-fréquence du myocarde dans différentes espèces. Modifiée d'après Janssen and Periasamy (2007).

La fréquence cardiaque (FC) de base comme la gamme de fréquences atteintes *in vivo* sont variables suivant les espèces. L'accélération de la FC est manifeste chez les grands mammifères et moindre chez les petits animaux. Chez l'Homme adulte, en moyenne, le passage de l'état repos à l'exercice, fait passer la FC d'environ 1 Hz (60 bpm) à 3 Hz (180 bpm). L'augmentation est de 200% entre les deux états. Chez le lapin, elle est d'environ 2,5 Hz au repos et passe à 5 Hz avec l'exercice. La FC n'augmente que de 100%. Chez la souris, l'augmentation est encore plus faible (passage de 10 jusqu'à 14 Hz) elle n'atteint que 40% au maximum. Par conséquent, le gain en force de contraction répondant à une augmentation de la FC est plus important chez les grands mammifères (Figure 14). De même, le débit cardiaque (DC), dépendant du volume sanguin diastolique et de la FC, peut augmenter de 6 à 10 fois à la suite d'un exercice physique intense chez l'Homme. Tandis que chez la souris, sa hausse reste modérée : elle double à peine (Janssen and Periasamy (2007)).

La relation entre la FC et la force de contraction myocardique est essentiellement contrôlée par les mouvements calciques au sein des cardiomyocytes (Endoh (2004)). La balance dynamique intégrée de l'homéostasie calcique intracellulaire est le régulateur majeur de la RFF. Elle est conditionnée par la charge du RS en Ca^{2+} , l'entrée de Ca^{2+} par les LTCC et l'échangeur NCX1. Avec l'augmentation de la FC, l'amplitude des transitoires calciques augmente comme la charge du RS. L'accroissement du nombre de battements pendant un certain temps entraîne l'élévation du flux calcique à travers les LTCC. Cette augmentation de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule va accélérer l'activité de la pompe SERCA et entraîner le transport de plus de Ca^{2+} dans le RS et donc amplifier sa charge. Ceci conduit à une élévation du Ca^{2+} libéré par le RS lors des battements suivants. Cela se traduit par l'augmentation de l'amplitude des transitoires calciques. En outre, plus du Ca^{2+} entre dans la cellule, plus l'activité de l'échangeur NCX1 augmente pour extruder une plus grande quantité de Ca^{2+} et maintenir un nouvel état d'équilibre. Ce dernier dépend des différents transporteurs calciques membranaires : LTCC, RyR2, SERCA2a et NCX1. Au cours de l'insuffisance cardiaque (IC), l'expression et la fonction de ces protéines vont se trouver altérées pouvant même aller jusqu'à l'inversion de la RFF (cf partie III.2.b).

Les différences de RFF entre les différentes espèces de mammifères auraient pour origine la concentration de Na^+ et la fonction de NCX1 dans le CEC du cardiomyocyte. Dans le myocarde de petits mammifères (*e.g.* souris), contrairement à l'Homme, le chien et le lapin, le PA est de courte durée. L'expression de NCX est faible et la concentration en Na^+ est élevée (Schillinger, Fiolet, Schlotthauer, and Hasenfuss (2003)). Cette dernière observation dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris et de rat fait que l'échangeur NCX1 est moins important dans l'entrée de Na^+ pendant la dépolarisation et également sur l'extrusion du Ca^{2+} en diastole (Frampton, Harrison, Boyett, and Orchard (1991)). Il en résultera un plus grand remplissage en Ca^{2+} du RS en diastole. Pour les grands animaux, l'activité de NCX est plus marquée et ainsi déplete le RS en diastole. Quand la FC augmente chez ces animaux, l'augmentation de l'activité de SERCA2a a un rôle plus important pour augmenter la charge du RS en diastole comparativement aux petits mammifères. Il y aura en aval une augmentation de la force de contraction.

La RFF est indispensable au maintien d'un débit suffisant pour répondre à une augmentation de la FC. Elle représente un mécanisme de survie naturel.

(ii) L'ACTIVATION BETA-ADRENERGIQUE

Le système nerveux autonome n'est pas à l'origine de la genèse de l'activité électrique mais il permet de réguler l'activité cardiaque pour s'adapter à un état physiologique normal ou non. La modulation du rythme cardiaque par le système nerveux autonome a pour origine le nœud sino-auriculaire. Cette région très innervée, possède une densité élevée des récepteurs β_1 -et β_2 -adrénergiques et des récepteurs M2-muscariniques (Godecke et al. (2001) ; Warriar et al. (2005)).

L'intervention du système nerveux autonome s'effectue grâce à des neurotransmetteurs libérés au niveau des terminaisons nerveuses. Par la suite, l'activité de paramètres électrophysiologiques, comme les canaux ioniques de la membrane des cardiomyocytes sera modulée. Le tonus sympathique s'exerce par l'intermédiaire de catécholamines, comme l'adrénaline et la noradrénaline, libérées soit par les terminaisons nerveuses, soit par la glande médullosurrénale. Quant aux nerfs parasympathiques, ils agissent par la sécrétion d'acétylcholine via leurs terminaisons. La transduction du signal n'est possible que par la liaison d'un agoniste (norépinéphrine, épinéphrine) sur le récepteur adrénergique. L'ensemble des récepteurs adrénergiques sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Cette dernière, suivant sa sous-unité, détermine les effecteurs responsables de la conduite du signal et la nature du signal intracellulaire.

L'activation du système nerveux sympathique, via les récepteurs α/β -adrénergiques (Figure 15), a des effets inotropes et chronotropes positifs, tandis que le système parasympathique ou vagal, via les récepteurs M2-muscariniques, a des effets inverses. La stimulation adrénergique entraîne l'augmentation du rythme sinusal, en élevant le courant calcique de type L (I_{CaL}). La phase ascendante des potentiels d'action sera accrue (Hagiwara, Irisawa, and Kameyama (1988)). La repolarisation sera également plus rapide avec un courant potassique retardé augmenté (I_{Ks}). L'activation du système adrénergique répond à une augmentation de l'activité métabolique de l'organisme, comme par exemple l'exercice physique.

Les récepteurs β , par leur forte présence dans le myocarde, sont les acteurs principaux de la régulation de la fonction contractile cardiaque. Dans le myocarde humain, les expressions des sous-types β_1 et β_2 ont été quantifiées : il y a une proportion de 70-80% β_1 pour seulement 30-20% de β_2 (Brodde (1991)). Les récepteurs β_1 et β_2 sont couplés tous deux à la protéine G_{α_s} , via la voie AC (AC5 et AC6 dans le cœur)/PKA (Dessauer (2009); Defer, Best-Belpomme, and Hanoune (2000)).

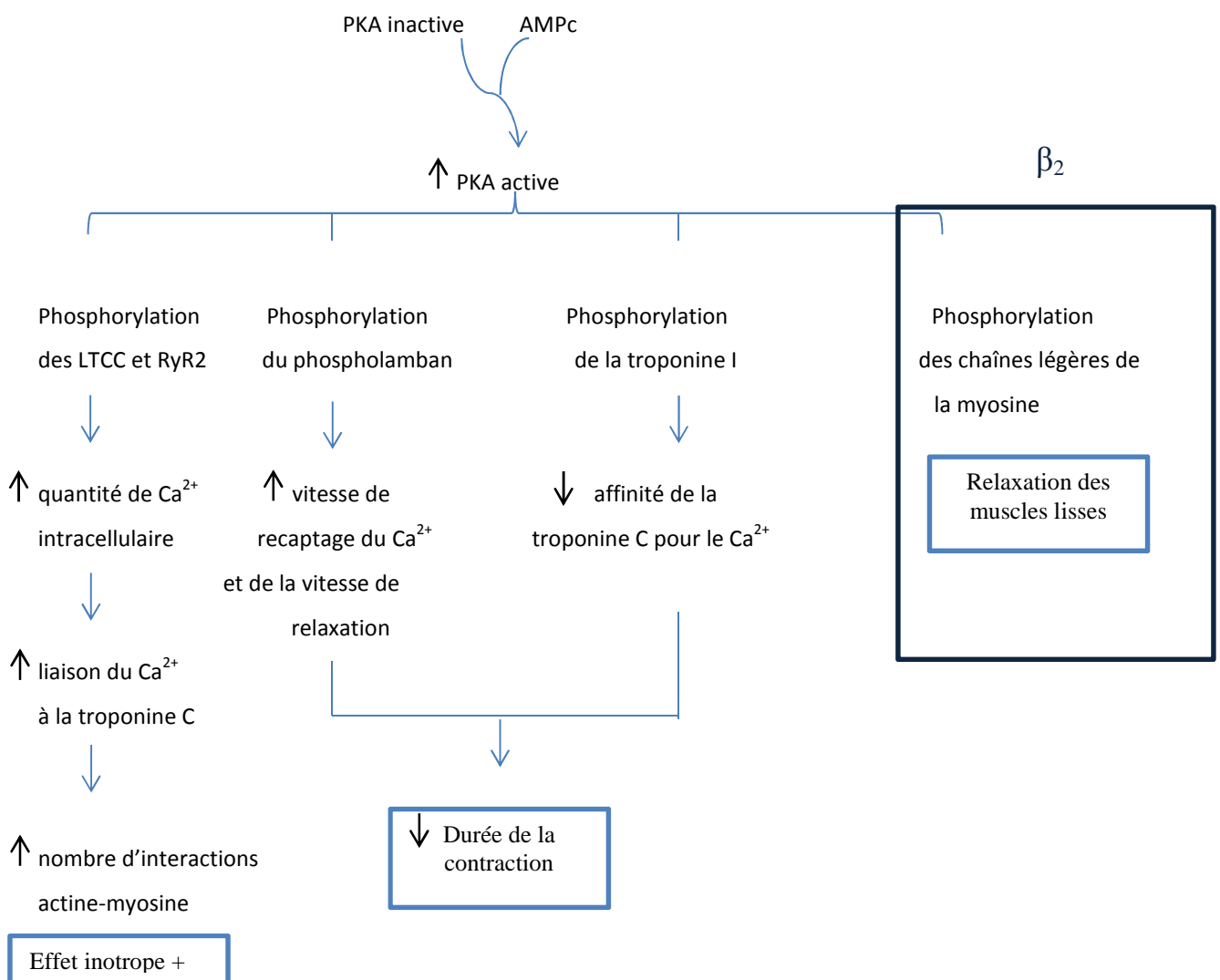


Figure 15 : Effet de l'activation de la PKA sur le myofilament. D'après livre Pharmacologie auteurs Yves Landry Jean-Pierre Gies Editions Dunod.

La voie β -AR/AMPC/PKA stimulée permet par la phosphorylation de la PKA (Figure 15 et 16) d'agir :

sur les LTCC, par l'augmentation de l'intensité du courant I{CaL} en favorisant la facilitation et un déplacement de ses courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.

_sur RyR2, par l'augmentation de l'amplitude des transitoires calciques en augmentant la probabilité d'ouverture P_o du canal. Cette phosphorylation servirait à synchroniser l'ouverture des canaux RyR2 pour s'adapter à l'augmentation de la fréquence cardiaque dans les cellules du nœud sinusal (Lakatta, Vinogradova, and Bogdanov (2002)).

_sur le PLB, par l'augmentation de la vitesse de recaptage par SERCA2a qui conduit à une plus grande charge du RS : inotropisme et lusitropisme positifs.

_sur les protéines contractiles (TnC, TnI, MyBP-C (*Myosin binding protein-C*), titine ...), par l'augmentation de leur sensibilité au Ca^{2+} et de l'inotropisme des cardiomyocytes.

La CaMKII étant sensible au Ca^{2+} , la stimulation adrénergique active indirectement la kinase en augmentant le Ca^{2+} intracellulaire en amont. Cette même stimulation inhibe l'activité de la protéine phosphatase 1 (PP1) qui contrôle l'autophosphorylation de la CaMKII.

La phosphorylation de la CaMKII (Figure 16) permet d'agir :

sur les LTCC, par l'augmentation de l'intensité du courant I{CaL} en favorisant la facilitation (Grueter et al. (2006)).

_sur RyR2, par l'augmentation de l'amplitude des transitoires calciques en augmentant la probabilité d'ouverture P_o du canal.

_sur le PLB, par l'augmentation de la vitesse de recaptage par SERCA2a qui conduit à une plus grande charge du RS : inotropisme et lusitropisme positifs (Mattiuzzi and Kranias (2014)).

_ sur les protéines contractiles (TnT, TnI, Tm, MyBP-C), par l'augmentation de la relation force-fréquence (RFF) et augmente l'accélération fréquence-dépendante de la relaxation myocardique (FDAR) (Wu et al. (2012)).

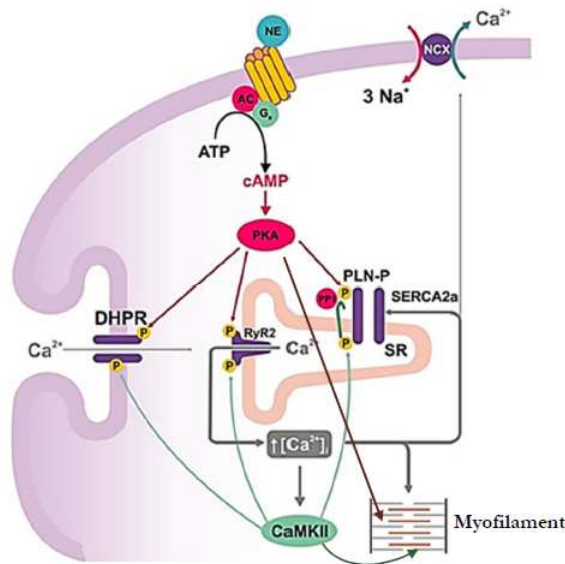


Figure 16 : Schéma des phosphorylations des protéines du CEC par la PKA et la CaMKII. Modifiée d'après Mattiazzi and Kranias (2014).

Le système cardiaque est vital pour un individu : il assure l'afflux sanguin nécessaire aux besoins énergétiques de l'organisme. Son activité repose sur ses propriétés d'automatisme électrique, un tissu de conduction pour le propager et le CEC pour assurer la contraction du myocarde. Le cycle cardiaque est basé sur des mouvements calciques finement régulés par une cohorte de protéines impliquées dans le CEC. La singularité majeure du cœur est sa capacité d'adapter sa fonction à son environnement quotidien : différentes régulations intrinsèques et hormonales sont mises en place pour ce faire. Cette adaptation est bénéfique si elle reste dans un contexte physiologique. L'est-elle toujours quand vient ou durant une pathologie ? Le CEC, porté par le Ca²⁺, est-il capable de mettre en place des compensations pour affronter les perturbations chroniques endommageant la fonction cardiaque ?

II. L'INSUFFISANCE CARDIAQUE (IC)

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique se développant suite à de nombreuses étiologies (infarctus du myocarde, hypertension, coarctation de l'aorte, ...) lésant le myocarde. Le cœur est incapable de maintenir sa fonction pour répondre aux besoins de l'organisme au repos et à l'effort (Swynghedauw (1999)). Le patient est fatigué et souffre de dyspnée avec ou sans activité.

II.1. L'HYPERTROPHIE DU VENTRICULE GAUCHE (HVG)

(a) UNE ADAPTATION

L'adaptation fonctionnelle du cœur face à une surcharge de travail repose sur l'augmentation de sa masse. Elle s'appuie essentiellement sur l'hypertrophie de ses cardiomyocytes. Ces cellules différenciées du cœur perdent peu de temps après la naissance leur capacité de prolifération (Swynghedauw (1999)). Au niveau cellulaire, la majeure partie des cardiomyocytes adultes sont des cellules au stade terminal de différenciation et ainsi ne peuvent proliférer. Face à un stress, leur seule réponse sera de croître, rétrécir ou mourir. L'augmentation de la taille cellulaire s'accompagne (i) d'une modification de l'organisation des sarcomères : l'ajout de nouveaux sarcomères (respectivement en série ou en parallèle pour des surcharges de débit et de pression), (ii) d'une modulation de son cycle calcique comme d'un accroissement de la synthèse protéique. L'activation de la synthèse protéique est rapide et présente dès les premières minutes de la mise en place d'une contrainte de surcharge de pression. Elle est différée dans les surcharges de volume *in vivo* comme dans un cœur isolé.

L'élément primordial de cette adaptation repose également sur un remodelage qui récapitule le « programme des gènes fœtaux » pour rétablir un métabolisme du myocarde

normal : l'actine squelettique, l'*α-Skeletal Actin* (α -SKA), la chaîne lourde de la myosine, la *β-Myosin Heavy Chain* (β -MHC) et l'*Atrial Natriuretic Factor* (ANF) (pour revue : Swynghedauw (1999)). L'ensemble de l'expression de ces gènes imite le stade embryonnaire du cardiomyocyte.

L'hypertrophie dite « physiologique » se caractérise par une augmentation temporaire de la taille du cœur avec la pratique d'un exercice physique régulier, lors d'une grossesse ou de la croissance post-natale (Figure 17). Cette hypertrophie transitionnelle n'a aucun effet apparent sur la fonction cardiaque car hormis l'augmentation de la taille des myocytes aucun remodelage délétère n'accompagne cet état. Elle permet une économie d'énergie en normalisant le stress pariétal (Lorell and Carabello (2000)). On parle aussi d'hypertrophie compensée ou adaptée. Le remodelage du myocarde qui lui est généralement associé est concentrique. La paroi du cœur augmente mais sans augmentation de la masse. L'hypertrophie concentrique se reconnaît à l'augmentation de sa paroi ventriculaire et de sa masse avec un volume ventriculaire inchangé ou légèrement. Elle est le résultat d'une surcharge de pression (sténose aortique, hypertension artérielle systémique, sportifs de haut niveau) qui provoque une addition de sarcomères en position latérale et parallèle du cardiomyocyte. A ce stade, le rapport de l'épaisseur de la paroi sur le volume (inchangé) augmente (i.e. il n'y a pas de dilatation) entraînant une diminution du stress pariétal et le maintien de la fonction contractile. D'après la loi de Laplace, la charge en tout point du cœur correspond à la valeur suivante : $(\text{pression} \times \text{rayon}) / (2 \times \text{épaisseur de la paroi})$; l'augmentation de la pression est contrecarrée par l'épaississement de la paroi. Cette normalisation du « stress » assure le maintien de la fraction d'éjection.

Cette adaptation présente des limites. En effet, l'apparition d'un déséquilibre entre les mécanismes d'adaptation et de nouvelles contraintes amène le myocarde à une incapacité de réponse aux besoins de l'organisme. On parle alors d'hypertrophie non adaptée, décompensée ou pathologique. L'hypertrophie dite « pathologique » s'accompagne d'un remodelage délétère avec l'apparition de fibrose et une dysfonction possible de ces cardiomyocytes en complément de leur hypertrophie (Figure 17). Cette hypertrophie est principalement excentrique. La masse cardiaque augmente ainsi que le volume de ses chambres. La paroi peut être identique, diminuée ou augmentée par rapport à la normale. L'addition de sarcomères se fait en séries et en longitudinale pour l'allongement du

cardiomyocyte (Dorn, Robbins, and Sugden (2003)) et/ou un glissement des cardiomyocytes les uns sur les autres par la dégradation de la matrice extracellulaire (Spinale (2002a, 2002b)). Ce modèle d'hypertrophie se retrouve dans des conditions particulières comme après un infarctus du myocarde, une surcharge de volume (reflux tant aortiques que mitraux) mais également lors d'une anémie. Elle se retrouve au stade ultime de la transition de l'hypertrophie compensée à décompensée, couramment observée dans les modèles murins après une surcharge de pression (sténose ou TAC).

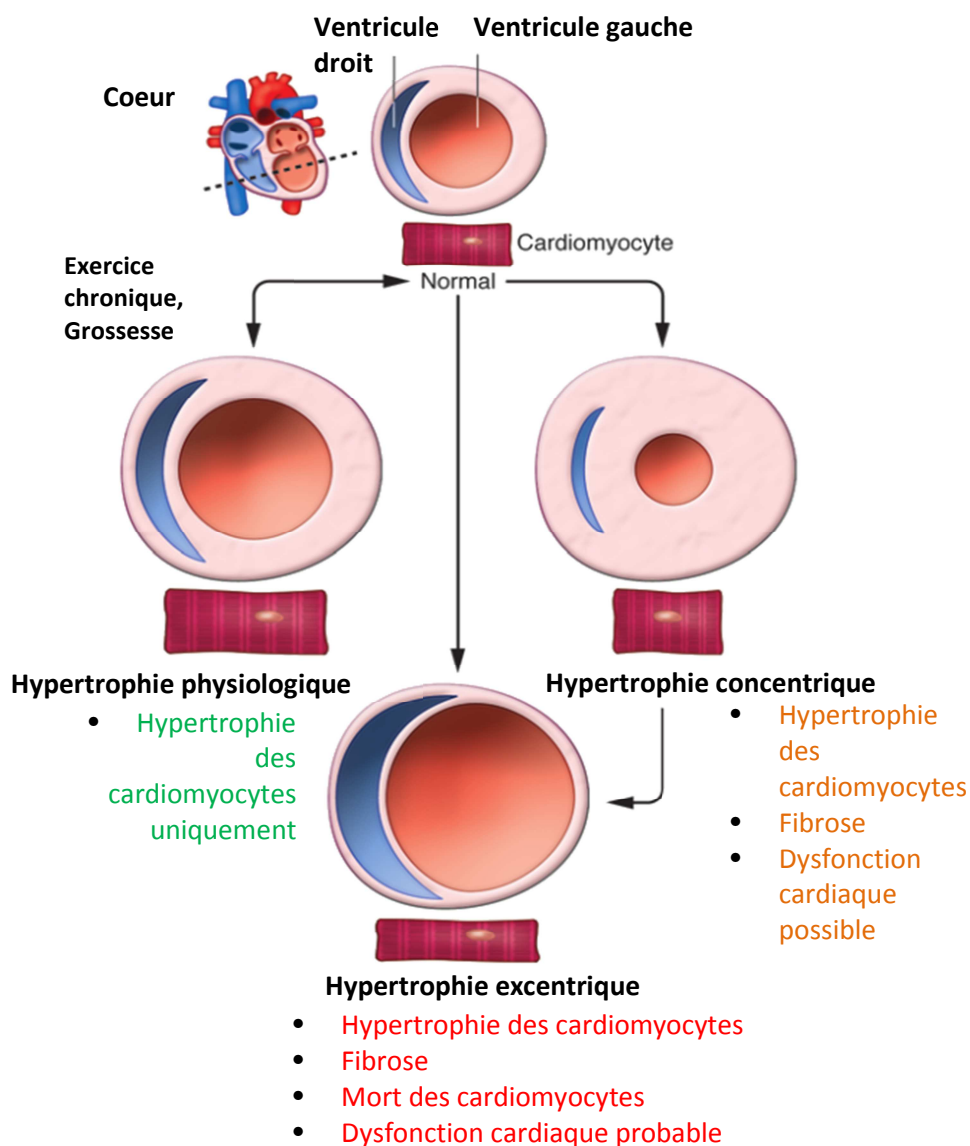


Figure 17 : Schéma du myocarde et les différents types d'hypertrophie qu'il peut développer. Modifiée d'après Heineke and Molkentin (2006) et van Berlo, Maillet, and Molkentin (2013).

En addition de nouveaux sarcomères en série ou en parallèle, des changements phénotypiques des protéines du sarcomère ont lieu dans les cardiomyocytes au cours de l'hypertrophie. Les chaînes lourdes α de la myosine (α -MHC) sont remplacées par l'isoforme β -MHC (Lompre et al. (1979); Mercadier et al. (1981)). L'isoforme atriale des chaînes légères (ALC) se retrouve exprimée dans les ventricules (Morano et al. (1997)). Lors du développement de l'hypertrophie, chez de nombreuses espèces animales mais aussi chez l'Homme, l'actine α du muscle squelettique (α -SKA) augmente son niveau d'expression (Schwartz et al. (1986); Winegrad, Wisnewsky, and Schwartz (1990) ; Suurmeijer et al. (2003)). Par l'augmentation du nombre de sarcomères durant le processus hypertrophique, l'expression de la troponine T augmente (Z. Chen et al. (1997)) tout comme l' α -SKA. Quant à la tropomyosine (Tm), des études récentes (Schulz et al. (2012); Schulz et al. (2013)) montre que son état de phosphorylation est un paramètre important dans l'établissement d'un phénotype hypertrophique. La réduction de sa phosphorylation permettrait l'instauration d'une hypertrophie compensée et de retarder le phénotype de cardiomyopathie hypertrophique.

Pour déterminer le stade hypertrophique d'un cœur, comme l'hypertrophie non adaptée, l'expression de l' α -SKA ainsi que la transition de l'isoforme α vers la β -MHC sont étudiées.

(b) REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE, DU SYSTEME CIRCULATOIRE (POUR REVUE : HOU AND KANG (2012)) ET DU METABOLISME

La matrice extracellulaire (MEC) se réorganise, de la fibrose se développe consécutivement à une accumulation de collagène lors du remodelage ventriculaire. Les membres du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) y participent activement (Weber (1997) ; Spinale (2002a)). Les collagènes de type I et III sont les protéines principales de structure qui composent la MEC cardiaque. Les fibroblastes, myofibroblastes et les cellules vasculaires les produisent. Leur dégradation, cruciale pour la croissance et le remodelage de la MEC, est possible grâce à l'activation des métalloprotéinases (MMPs). Leur activité est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques, les TIMPs. Durant le remodelage

cardiaque, l'équilibre de la balance MMP/TIMPs est indispensable. Lors de la phase précoce de remodelage, on observe une activation des MMPs tandis qu'à plus long terme les TIMPs sont augmentés. Ainsi la fibrose composée de collagènes s'accumule aux niveaux interstitiel et périvasculaire du cœur.

Cet événement est considéré comme une étape délétère du remodelage cardiaque associée à l'hypertrophie (T. G. Parker and Schneider (1991); Schellings, Pinto, and Heymans (2004)).

L'hypertrophie cardiaque s'accompagne d'un changement dans l'angiogenèse coronarienne. L'hypertrophie cardiaque physiologique est associée à une densité normale ou accrue de ses capillaires (Hudlicka, Brown, and Egginton (1992)). Par contre, lors d'une hypertrophie cardiaque pathologique, il y a deux stades dans la densité capillaire par l'angiogenèse coronarienne : elle est augmentée aux premiers stades de l'hypertrophie (Huo, Linares, and Kassab (2007) ; Kassab (2000); Kassab et al. (1993)) tandis qu'elle décroît aux derniers stades de l'hypertrophie cardiaque pathologique (Anversa, Ricci, and Olivetti (1986); Flanagan, Fujii, Colan, Flanagan, and Lock (1991); Hamasaki et al., 2000 ; Hudlicka et al. (1992) ; Karch et al. (2005); Shimamatsu and Toshima (1987)). Une coordination entre l'angiogenèse et la croissance du cœur est cruciale et représente l'élément principal de l'hypertrophie physiologique. La perturbation de cet équilibre conduit à une hypertrophie cardiaque pathologique et à une transition vers l'insuffisance cardiaque. Ce défaut vasculaire va favoriser, via l'hypoxie qu'il entraîne, des altérations structurelles (fibrose) et contractiles (Shiojima et al. (2005)).

Le remodelage cardiaque conduit à un changement de métabolisme vers un métabolisme glycolytique. Sa composition change avec l'apparition de myofibroblastes et les cardiomyocytes qui font face à une désorganisation de leurs sarcomères. Il a également des incidences sur la fonction cardiaque avec des altérations dans la prise en charge du Ca^{2+} et des dysfonctions diastoliques ou systoliques dues à un remodelage électrique.

Les voies de signalisation conduisant au développement d'une hypertrophie sont nombreuses. Elles interagissent entre elles et subissent des contrôles. Elles sont composées

d'une cohorte d'enzymes à activité kinases et phosphatases. La modification de l'équilibre de ces activités enzymatiques entraîne une modification de l'expression et de la phosphorylation de facteurs de transcription aboutissant à l'observation d'un nouveau phénotype. Cette partie décrit succinctement les principaux éléments responsables de ce procédé d'adaptation.

(c) LES STIMULI PRO-TROPHIQUES

Les stimuli aboutissant à une hypertrophie cardiaque sont divers. Qu'ils soient mécaniques ou neuronaux, ils sont produits au niveau du sarcolemme puis transmis au noyau par différentes voies de signalisation. Voici une description de ces différents stimuli.

(i) L'ÉTIREMENT DE LA CELLULE

Le stress mécanique induit des changements comme une augmentation de la synthèse protéique. S'il perdure, il conduit à la transition des protéines sarcomériques à leurs isoformes fœtales : l' α -actinine cardiaque devient l' α -actinine squelettique (α -SKA), l' α -myosine chaîne lourde (α -MHC) se change en β -MHC chez les rongeurs (Ruwhof and van der Laarse (2000)).

Les fibroblastes jouent un rôle important dans la mécanotransduction cardiaque. Sous pression, les fibroblastes cardiaques activent les voies JNK et ERK, via l'intégrine β_1 (MacKenna, Dolfi, Vuori, and Ruoslahti (1998) ; Ross et al. (1998)). La réponse induite par l'étirement peut alors être transmise aux myocytes par un signal paracrine.

Le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) peut être interprété comme un signal paracrine affectant les cardiomyocytes. La libération des facteurs autocrines et paracrines (AngII, ET-1 et TGF- β 1) amplifie le signal originel déclenché par la stimulation mécanique des cardiomyocytes et mènent à l'hypertrophie. Ces différents facteurs de croissance agissent directement ou indirectement sur les membres des voies MAPK. En aval des MAPK, la voie

JAK/STAT, la protéine Phosphatidylinositide 3-kinases (PI3K) et la protéine kinase C (PKC) entraînent un changement de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ et l'activation de plusieurs facteurs de transcription nucléaires comme c-fos, c-jun et c-myc.

En premier lieu, site de génération de la contraction du muscle cardiaque, le sarcomère est également probablement un mécano-senseur cellulaire pour le cardiomyocyte. En effet, la protéine LIM, appartenant au complexe du disque Z du sarcomère, interagit avec la téléthonine (T-cap), une protéine liant la titine, pour former un senseur d'étirement cardiaque (Knoll, Hoshijima, and Chien (2002)). La calcineurine (CaN) se trouve également localisée à ce niveau et pourrait être mobilisée par la protéine LIM pour stimuler la voie hypertrophique CaN-NFAT (Heineke et al. (2005)). La délétion de LIM entraîne des altérations majeures dans le cœur en réponse à une surcharge de pression : une dysfonction contractile et un cœur dilaté. La protéine LIM joue un rôle dans la genèse et le processus hypertrophique cardiaque (Arber et al. (1997)).

(ii) LES FACTEURS NEUROHORMONAUX

L'activité neurohormonale participe au développement de l'hypertrophie cardiaque en stimulant la synthèse protéique et en changeant le phénotype du cardiomyocyte. Le stress mécanique permet la libération de nombreuses molécules en systémique ou paracrine. Leur fixation sur leurs récepteurs membranaires respectifs permet d'initier le processus hypertrophique au sein de la cellule. Les principaux facteurs engagés dans l'hypertrophie cardiaque sont : (i) les catécholamines, produites par le système nerveux sympathique et (ii) les molécules libérées par l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA).

i. LES CATECHOLAMINES

De nombreuses études ont montré *in vitro* (Milano et al. (1994) ; Clerk and Sugden (1999)) aussi bien qu'*in vivo* (Akhter et al. (1998) ; D'Angelo et al. (1997)) que le rôle principal

des voies couplées à la protéine G_q en incluant la voie α_1 -AR est de stimuler l'hypertrophie cardiaque. La taille des cellules, l'organisation sarcomérique ainsi que l'expression de gènes comme ceux des peptides natriurétiques ou l' α -actine squelettique augmentent (LaMorte et al. (1994) ; Zechner, Thuerauf, Hanford, McDonough, and Glembotski (1997)). L'agoniste de la voie α_1 -AR le plus fréquemment utilisé est la phényléphrine (PE).

En outre, l'infusion de norépinephrine participe à la croissance cellulaire *in vivo* et *in vitro*, via les voies adrénergiques α_1 et β_1 (Barth et al. (2000) ; Briest et al. (2001) ; Fisher and Absher (1995)).

L'isoprotérénol est un agoniste β -adrénergique non-sélectif. Il est capable d'établir sur des modèles *in vivo* une hypertrophie cardiaque et cardiomyocytaire (Teerlink, Pfeffer, and Pfeffer (1994); Kudej et al. (1997) ; Matkovich et al. (2006)). Cet état s'accompagne de nécrose, fibrose, apoptose, lésions oxydatives et inflammation (G. X. Zhang et al. (2007) ; Shizukuda et al. (1998) ; Nirdlinger and Bramante (1974) ; Rona, Chappel, Balazs, and Gaudry (1959)). La MEC des cardiomyocytes subit un remodelage délétère par une augmentation de l'activité des MMP2 et MMP9 (Errami et al. (2008)). L'infusion d'isoprotérénol modifie la composition de la membrane plasmique en baissant l'expression de la cavéoline 3 (N. Oka et al. (1997)), protéine composante majoritaire des cavéoles cardiaques, structures impliquées dans la voie $\beta/G_s\alpha/AC$ (Lisanti et al. (1994)). On assiste également à un remodelage vasculaire (Errami et al. (2008) ; Steinle, Cappocia, and Jiang (2008)).

ii. L'ANGII

Dès 1975, Schelling et al., montrent l'implication de l'AngII dans la croissance cellulaire sur une lignée cellulaire 3T3 (fibroblastes murins) (Schelling, Fischer, Hutchinson, and Ganten (1975)). L'AngII provoque une hypertrophie cardiaque via la voie PKC/Raf-1 kinase/MAPK (Yamazaki et al. (1995)).

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est activé lors d'une surcharge hémodynamique pour obtenir un modèle expérimental d'hypertrophie du ventricule gauche (Suzuki, Matsubara, Urakami, and Inada (1993) ; Schunkert et al. (1990) ; Baker, Booz, and

Dostal (1992)) ou simplement par un stress mécanique comme l'hypertension. L'aldostérone a également des effets trophiques indépendamment des stress mécaniques (Young, Head, and Funder (1995)).

Le SRAA agit de base en circulation systémique pour réguler la balance électrolytique et des fluides, contrôlant ainsi la pression artérielle. Mais dans des conditions de physiopathologie cardiaque, il agit localement : l'AngII est générée de novo. La concentration d'AngI et AngII interstitielle dans le cœur est 100 fois plus élevée que leur concentration plasmatique (Dell'Italia et al. (1997)). Cette synthèse est possible par l'interaction de l'AngII avec le récepteur de la même cellule (autocrine) ou ceux des cellules adjacentes (paracrine). Dans le cœur, tous les récepteurs des éléments du RAAS (rénine, AGT, ACE et AngII) sont présents. L'AngII est capable d'auto-amplifier sa propre boucle dans le cœur comme dans le rein en agissant sur sa transcription (Sadoshima and Izumo (1993)).

Les effets d'une stimulation cardiaque prolongée par l'AngII sont maintenant bien connus et les principaux incluent une hypertrophie cardiaque importante à laquelle s'ajoute une fibrose interstitielle. Le récepteur à l'AngII active la vasoconstriction, la sécrétion d'aldostérone ainsi que la libération de catécholamines. Tous ces éléments participent à la progression du remodelage ventriculaire (Matsubara (1998)). L'élément au centre de ces mécanismes est le récepteur AT1 (Clauser (1998)). En effet, l'ablation de son gène dans un modèle murin entraîne un sérieux retard dans le développement cardiaque ainsi qu'une mortalité accrue (Tsuchida et al. (1998)). Les souris surexprimant ce même récepteur présentent une hypertrophie cardiaque et une fibrose importantes (Hein et al. (1997)). Des études chez l'homme ont démontré que le récepteur AT1 (particulièrement AT1A) est majoritairement responsable de la plupart des effets pathologiques de l'AngII (Studer, Reinecke, Muller, et al. (1994)). Toutes ces études exposent l'importance des récepteurs AT1 dans la croissance cellulaire, l'hypertrophie et la fibrose durant le remodelage par l'AngII.

En aval, de ces stimuli pro-trophiques des voies de signalisation pro-trophiques sont stimulées.

(d) LES VOIES PRO-TROPHIQUES Ca^{2+} INDEPENDANTES : LES MAPK

Les Mitogen Activating Protein Kinases ou MAPK forment une super famille de kinases engagées dans la signalisation cellulaire. Cette super famille est divisée en trois branches distinctes : **1.** les p38Kinases (p38), **2.** les c-Jun-Kinases (JNK) et **3.** les « extracellular signal regulated kinases » (ERKs). De l'activation de ces MAPK découle une cascade d'activation de kinases distinctes selon les trois familles de MAPK. Les voies JNK et p38 sont décrites comme les voies répondant à des stimuli de stress alors que celle dépendante d'ERK est considérée comme la voie répondant aux facteurs de croissances et/ou mitogéniques (Garrington and Johnson (1999)). L'activation des différentes MAPK permet la phosphorylation de divers facteurs de transcription qui reprogramment le génome et conduisent à l'hypertrophie des cardiomyocytes (Heineke and Molkentin (2006)). L'activation d'ERK augmente en synergie l'activation du facteur NFAT (Sanna, Bueno, Dai, Wilkins, and Molkentin (2005)). Il est entendu que l'activation d'ERK conduit à une hypertrophie de type concentrique (Bueno et al. (2000)). Concernant p38 et JNK, protéines marqueurs de stress, leur activation conduit à un remodelage cardiaque menant à une hypertrophie délétère (Liao et al. (2001)).

D'autres voies pro-trophiques existent, elles sont notamment activées par le Ca^{2+} et seront décrites dans la partie III.

(e) LES REPONSES ANTI-TROPHIQUES

Pour contrebalancer les voies pro-trophiques et trouver un équilibre dans le développement de l'hypertrophie, il existe une réponse anti-trophique. Cette dernière peut aussi être prise en charge par des facteurs dits anti-trophiques, comme les peptides natriurétiques ou le monoxyde d'azote. Ils ont la capacité de nuancer la survenue de l'hypertrophie.

(i) LES FACTEURS ANTI-TROPHIQUES (PEPTIDES NATRIURETIQUES, $\cdot\text{NO}$)

De nombreuses hormones et facteurs ont des activités anti-trophiques mais les principaux facteurs sont les peptides natriurétiques (ANP, BNP) ainsi que le monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$).

i. LES PEPTIDES NATRIURETIQUES

Les **peptides natriurétiques** (ANP, BNP, CNP, NT-pro-BNP) sont synthétisés normalement au niveau de l'oreillette et la pathologie délocalise cette production au niveau du ventricule (pour revue : Macabasco-O'Connell and Miller (2006)). Ainsi ce sont des marqueurs caractéristiques de l'hypertrophie et de l'IC (Swynghedauw (1999)). *In vitro*, l'ANP a des effets anti-trophiques sur des cardiomyocytes de rat adulte (Corda et al. (1997)) comme nouveau-nés (Babiker et al. (2004) ; Horio et al. (2000)). *In vivo*, les souris dont le gène codant l'ANP est invalidé développent une hypertrophie cardiaque plus importante, indépendamment du stimulus employé (Franco et al. (2004) ; Mori et al. (2004)). Les voies de signalisation de l'ANP impliquent le récepteur membranaire A de la guanylate cyclase (GCA), qui par la libération de son second messager (GMPc), inhibe les canaux calciques de type L diminuant ainsi l'entrée de Ca^{2+} . Ce procédé jugulerait le processus hypertrophique (Kempf and Wollert (2004)). D'après Molkentin (2003), l'ANP fonctionne comme un facteur endogène d'auto-inhibition de l'hypertrophie dans des situations pathologiques. Hypothèse confirmée par Tokudome et al. en 2005 (Tokudome et al. (2005)) qui montre que les peptides natriurétiques (ANP et BNP) via la voie PNs/GCA/GMPc inhibent une voie hypertrophique importante, CaN/NFAT.

Il est à noter également que les peptides natriurétiques ont une activité anti-fibrotique en inhibant la voie TGF- β 1 (P. Li et al. (2008)).

ii. LE MONOXYDE D'AZOTE -[•]NO-

Le **monoxyde d'azote** -[•]NO-, impliqué dans la régulation de la fonction cardiovasculaire, est décrit comme ayant des propriétés anti-trophiques. En premier lieu, les effets ont été mis en évidence *in vitro* en présence de donneurs de [•]NO (Calderone, Thaik, Takahashi, Chang, and Colucci (1998)) ou lors du blocage du [•]NO endogène par des inhibiteurs des NOS comme le L-NAME ou le L-NMMA. Comme pour l'ANF, le second messenger du [•]NO, est le GMPc (Horio et al. (2000) ; A. C. Rosenkranz, Hood, Woods, Disting, and Ritchie (2002)). De ce fait, le [•]NO stimule la formation du GMPc par l'activation de la guanylate soluble dans les cardiomyocytes (Calderone et al. (1998)). En utilisant des analogues du GMPc, il est possible de mimer les effets anti-hypertrophiques du [•]NO (Calderone et al. (1998) ; Wollert et al. (2002)). Par rapport aux peptides natriurétiques, le [•]NO possède des effets GMPc indépendant via les radicaux libres.

L'effet anti-trophique via la formation de GMPc implique la voie de protéines kinase G de type I (PKGI), inhibant les canaux de type L ou les récepteurs IP3 (Wollert et al. (2002)). L'autre cible de PKGI est la voie CaN-NFAT (Fiedler et al. (2002)). De la même manière, *in vivo*, le [•]NO apparaît avoir des effets anti-hypertrophiques (Barouch et al. (2002)) : les animaux knock-out pour les gènes exprimant les différentes NOS constitutives développent spontanément avec l'âge une hypertrophie cardiaque. L'étude du rôle du [•]NO dans différents modèles d'hypertrophie cardiaque donne des résultats contradictoires suivant les laboratoires. Un exemple : dans un modèle de souris NOS 3 ^{-/-} subissant une surcharge de pression, un laboratoire (Ichinose et al. (2004)) observe une hypertrophie plus importante par rapport aux animaux sauvages alors que celui de Takimoto (Takimoto et al. (2005)) en observe moins. En outre, dans un modèle de surexpression de l'isoforme NOS1 au niveau cardiaque, on observe une hypertrophie cardiaque et myocytaire plus importante que les animaux contrôles en réponse à une surcharge de pression (Loyer et al. (2008)). Il demeure alors difficile de trancher sur le rôle trophique ou non du [•]NO *in vivo*.

D'autres réponses anti-trophiques existent, notamment les voies anti-trophiques ciblant les voies pro-trophiques activées par le Ca²⁺. Elles seront décrites dans la partie III.

II.2. L'IC

L'insuffisance cardiaque (IC) reste la cause majeure de mortalité dans le monde. En France, elle touche 600 000 personnes. Ce chiffre ne cesse de croître suite au vieillissement de la population, à l'émergence de maladies métaboliques et paradoxalement aux progrès de la médecine et aux traitements médicaux. Ainsi, 100 000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an.

L'IC évolue au cours du temps par la dégradation de la fonction du VG, la mise en place de mécanismes d'adaptation qui impactent sur la morbidité du patient.

(a) LE REMODELAGE DU VG ET DE SON ULTRASTRUCTURE

Pour conduire le potentiel d'action et ainsi assurer sa fonction contractile, le myocarde doit garder son intégrité tissulaire. Or, celle-ci se retrouve altérée lorsque le cœur progresse vers une IC, avec notamment l'apparition de fibrose.

La fibrose est multifactorielle et non adaptative. C'est une augmentation de la concentration de collagène de type I. La fibrose ventriculaire joue un rôle important dans la symptomatologie clinique et pour certains modèles, elle reste le seul marqueur biologique de l'IC (Boluyt et al. (1994)). Elle apparaît en réponse à une perte cellulaire associée à une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes. Elle est également réparatrice dans le tableau clinique des cardiomyopathies ischémiques. Elle se retrouve aussi suite à une surcharge de pression dans laquelle le SRAA est fortement stimulé, elle peut être induite soit par l'angiotensine II soit par l'aldostérone.

La fibrose ventriculaire influence les fonctions myocardiques. Comme le collagène de type I a la rigidité de l'acier, la compliance passive de la chambre ventriculaire est diminuée. Le tissu myocardique devient hétérogène, gêne la conduction de PA et la systole. Elle peut être responsable de la survenue d'arythmies de réentrée.

Le système tubulaire-transverse (tubules-T) est une invagination de la membrane plasmique du cardiomyocyte, le sarcolemme, distinct du RS mais associé à lui pour permettre le couplage excitation-contraction (CEC). Les tubules-T sont une extension de l'espace extracellulaire tout en s'étendant profondément à l'intérieur de tous les myocytes ventriculaires des mammifères (Brette and Orchard (2003) ; Song et al. (2005) ; Louch, Sejersted, and Swift (2010) ; Ibrahim, Gorelik, Yacoub, and Terracciano (2011) ; McNutt (1975)). Ils sont perpendiculaires à la surface cellulaire et donc au sarcolemme externe, et transversales aux myocytes dans leur axe longitudinal (Kostin et al. (1998)). Ils sont régulièrement alignés le long de la ligne Z des sarcomères, formant un réseau très organisé et élaboré de tubules. Il existe également des éléments tubulaires en longitudinal dans les myocytes ventriculaires d'un cœur sain. De nombreuses études sur des cœurs insuffisants d'animaux et humains, montrent surtout une désorganisation des tubules-T (Song et al. (2006) ; van Oort et al. (2011) ; Lenaerts et al. (2009)). Fréquemment chez l'Homme, sa morphologie change (Maron, Ferrans, and Roberts (1975)). Plus simplement, des équipes ont observé une perte de tubules-T (Schaper et al. (1991) ; Wei et al. (2010)) qui peut impacter sur son association avec le RS (van Oort et al. (2011) ; Swift et al. (2008)). Ainsi, le remodelage des tubules-T peut changer la distribution comme l'organisation des récepteurs β -AR, des canaux et transporteurs ioniques membranaires (particulièrement les LTCC). Ceci provoque un découplage entre les canaux LTCC et les canaux RyR2. L'échange ionique entre le milieu extracellulaire et le RS est alors altéré : l'homéostasie des mouvements calciques intracellulaires et sa régulation β -AR sera impactée. Cette évolution de l'ultrastructure membranaire peut entraîner une prolongation de la durée du PA et l'ensemble conduirait à un CEC défectueux et des arythmies (A. Guo, Zhang, Wei, Chen, and Song (2013)).

La cavéole est présente dans les petites invaginations (50-100 nm) de la membrane plasmique et se retrouve dans de nombreux types cellulaires dont les cardiomyocytes (Insel et al. (2005)). C'est un microdomaine dynamique composé d'un radeau lipidique (raft) associé à une protéine membranaire, la cavéoline. Il existe 3 isoformes de cavéoline. La Cavéoline 3 (Cav 3) est celle la plus répandue dans les cellules musculaires : les cardiomyocytes, les myocytes des muscles lisses et squelettiques. Elle est associée aux tubules-T. En effet, Balijepalli et al. ont démontré que la Cav 3, β_2 -AR, G_s , G_i , AC5/6, PKA et $Ca_v1.2$ co-immunoprécipitent ensemble (Balijepalli, Foell, Hall, Hell, and Kamp (2006)). La

Cav 3, et plus généralement la structure cavéolaire, participe à la formation du complexe $\beta_2\text{AR-Ca}_v1.2$ ou à sa colocalisation avec les autres composants de la signalisation β -adrénergique (Figure 18).

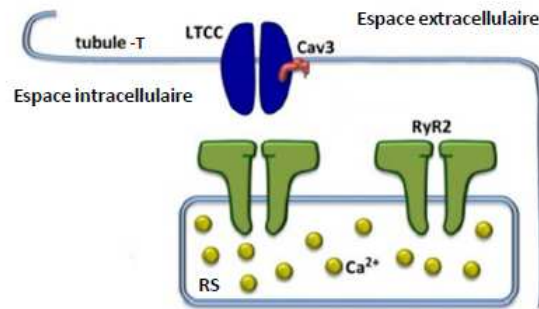


Figure 18 : Schéma des cavéolines 3 localisées dans les tubules-T. Modifiée d'après Landstrom, Beavers, and Wehrens (2014).

L'IC est associée à de profondes évolutions dans la structure myocardique mais d'autres systèmes interviennent comme le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ces changements font partie d'un ensemble de transformations impliquées dans la progression de l'IC et la dysfonction contractile qu'elle entraîne dans le tissu cardiaque.

(b) L'ACTIVATION SRAA

Il contribue de manière importante à la transition vers l'IC. Dès le stade hypertrophique, l'angiotensine II (Lijnen, Petrov, and Fagard (2001)) ou l'aldostérone (Silvestre et al. (1998)) ont des effets pro-fibrosants. La stimulation des fibroblastes par l'angiotensine II et le TGF- β 1 (libéré localement) (Eghbali, Tomek, Sukhatme, Woods, and Bhambi (1991) ; S. Rosenkranz (2004)) va accentuer le remodelage de la MEC en augmentant le dépôt de collagène et la fibrose. La dégradation de la MEC conduit à une dilatation de la cavité ventriculaire gauche par le glissement des cardiomyocytes des uns par rapport aux autres (Spinale, Gunasinghe, Sprunger, Baskin, and Bradham (2002) ; Spinale (2002b)). Ce

remodelage est impliqué dans la survenue de troubles du rythme, élément majeur du syndrome d'IC (Milliez et al. (2005)).

(c) L'ALTERATION DE LA SIGNALISATION BETA-ADRENERGIQUE (POUR REVUE : LYMPEROPOULOS, RENGU, AND KOCH (2013))

Dans le cadre d'études cliniques, il a été remarqué que l'activation du tonus sympathique précédait le développement de symptômes évidents d'IC (Francis et al. (1990)). Le niveau de norépinéphrine plasmatique élevé ainsi que la baisse de la densité des récepteurs β dans le myocarde sont de bons indicateurs quant aux conséquences sur le long terme de la survenue d'une maladie cardiovasculaire. Ces données laissent penser que la baisse de l'activation de la voie β -adrénergique peut se développer en réponse à une stimulation β -adrénergique accrue au stade initial de la maladie et ainsi conduire à la progression de l'insuffisance. En effet, il a été mis en évidence dans de nombreux modèles d'animaux souffrant d'hypertrophie compensée une voie de signalisation β -adrénergique inhibée (Bohm et al. (1988) ; Moalic et al. (1993) ; Patel et al. (1991) ; Osadchii, Woodiwiss, Alves, and Norton (2005)). Il en a été de même chez des patients ayant une cardiomyopathie avec une hypertrophie importante (obstructive) ou une sténose de l'aorte avec une fonction contractile préservée (Lefroy et al. (1993) ; Schotten et al. (2000) ; Schumacher et al. (1995)).

Ainsi l'altération de la voie de signalisation β -adrénergique n'est pas nécessairement une conséquence d'une insuffisance cardiaque systolique mais pourrait être à l'initiative du développement du stade compensé du cœur.

Dans le cas de la cardiomyopathie dilatée, il est observé une baisse consécutive de l'expression en ARNm ainsi qu'en protéine des récepteurs β_1 -adrénergiques avec une diminution de la réponse des cardiomyocytes à la stimulation β -adrénergique (Ungerer, Bohm, Elce, Erdmann, and Lohse (1993) ; Bristow et al. (1993)). On retrouve également une protéine G_i en plus grande quantité, avec une plus grande activité tandis que l'activité de la protéine G_s reste inchangée comme pour l'adénylate cyclase (Bohm (1995); Bohm et al.

(1990)). L'activité de la PKA n'est pas altérée mais celle de la *G Protein Receptor Kinase 2* (GRK2), une protéine régulatrice, est augmentée (Ungerer et al. (1993)).

L'activation chronique de la signalisation β_1 -adrénergique, étudiée ci-dessus, montre la contribution de cette voie à la progression de la dysfonction cardiaque et au développement de l'IC chez les modèles animaux et humains.

La sur-stimulation sympathique chronique lors de l'IC entraîne une désensibilisation et une diminution du nombre des récepteurs β_1 (*down-regulation*). La désensibilisation des récepteurs adrénergiques correspond à une diminution de la réponse de ces récepteurs malgré la poursuite de leur stimulation par la présence d'agonistes. C'est une manière pour ces récepteurs d'éteindre leurs signaux.

Le signal peut également être interrompu en aval du récepteur par un découplage du récepteur de sa protéine G. Deux processus ont été caractérisés : **1**-la désensibilisation hétérologue ou non-agoniste spécifique, **2**-la désensibilisation homologue ou agoniste spécifique propre aux récepteurs AR.

1-la désensibilisation hétérologue ou non-agoniste spécifique est un procédé rapide, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. Elle repose sur la phosphorylation du récepteur par les protéines kinases, PKA et PKC, activées respectivement par les seconds messagers du récepteur, AMPc et DAG.

2-la désensibilisation homologue ou agoniste spécifique est conduite par des membres de la famille des RCPG kinases (ou G Protein Receptor Kinase, GRK) et résulte de l'augmentation des catécholamines circulantes. Ces kinases, en phosphorylant les récepteurs adrénergiques occupés par des agonistes, augmentent l'affinité d'interaction du récepteur pour des protéines cytosoliques, les β -arrestines. En s'y liant, le récepteur empêche son couplage avec sa protéine G.

D'autres éléments participent au remodelage passant du processus adaptif à maladaptatif : les facteurs de risque (diabète, surpoids, âge, altération génétique), les étiologies (infarctus, hypertension artérielle, sténose aortique....) et le Ca^{2+} .

III. LE Ca^{2+} ET SON ROLE DE L'HVG A L'IC

Le Ca^{2+} , via l'activation de nombreuses kinases et phosphatases, agit dans des voies de transcription Ca^{2+} -dépendantes, dont certaines sont impliquées dans le processus hypertrophique. Elles interagissent entre elles et sont régulées. La balance entre ces activités enzymatiques va modifier l'expression et le niveau de phosphorylation de facteurs de transcription qui permettent l'expression d'un nouveau phénotype menant à l'hypertrophie.

III.1. LES VOIES DE SIGNALISATION PRO-TROPHIQUES Ca^{2+} -DEPENDANTES

- (i) Ca^{2+} /CALMODULINE (CAM) /CALCINEURINE (CAN)-NFAT (*NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS*)

Purifiée à la fin des années 70 à partir de tissu neuronal (Klee and Krinks (1978)), la calcineurine (CaN) appartient à la famille des protéines sérine/thréonine phosphatases. Elle est phylogénétiquement très conservée et existe sous la forme d'un hétérodimère, constitué des sous-unités A catalytique et B régulatrice (CnA : 57-61kDa ; CnB : 19kDa) (Rusnak and Mertz (2000)). Il y a trois isoformes de la CnA (α, β, γ) codées par trois gènes distincts. La CnB est codée par deux gènes distincts (CnB 1 et CnB 2). L'expression de certaines isoformes est spécifique de tissus (CnA γ et CnB 2 dans le cerveau et les testicules (Molkentin (2000))), mais autrement elle est ubiquitaire (CnA (α, β) et CnB1). L'activité phosphatase de la CaN est possible par sa liaison au complexe Ca^{2+} -CaM. Sous sa forme active, elle est vue comme un hétérotrimère constitué de ces sous-unités A et B et de la CaM. Elles sont assemblées entre elles par des liaisons EF, liaisons covalentes (Rusnak and Mertz (2000)). La partie N-terminale de la sous-unité CnA possède les domaines phosphatases, de liaison EF à la CnB et à la CaM. Sa partie C-terminale contient un site d'auto-inhibition. A concentration calcique faible, ce site subit un encombrement stérique et la CaM ne peut être liée. En réponse à une augmentation de la concentration calcique, la CaM se lie à la CnA et entraîne un changement de conformation activant l'activité phosphatase de la CnA. L'activité de la CaN est largement

contrôlée par le Ca^{2+} mais d'autres facteurs peuvent intervenir. En effet, l'état redox de la cellule comme les anions superoxydes est capable d'inactiver très rapidement la CaN (X. Wang, Culotta, and Klee (1996) ; Namgaladze, Hofer, and Ullrich (2002)). De nombreuses protéines contrôlent son activité comme Cabin1/Cain (Lai Lai, Burnett, Wolosker, Blackshaw, and Snyder (1998); Lai, Luo, Burnett, Hong, and Snyder (2000) ; L. Sun et al. (1998)), AKAP79 (Coghlan et al. (1995)) ainsi que MCIP-1 (Aramburu, Heitman, and Crabtree (2004); Roehrl, Wang, and Wagner (2004)).

Les travaux de Molkenin (Molkenin et al. (1998)) ont été les premiers à montrer l'implication de la CaN dans le développement de l'hypertrophie (Figure 19). La démonstration a été faite *in vitro*, *in vivo* à partir de modèles de souris transgéniques mais aussi avec des molécules inhibitrices de la CaN. Ces meilleurs antagonistes sont la cyclosporine A (CsA) ou le FK506 qui inhibent son activité phosphatase. *In vitro*, ces inhibiteurs bloquent la réponse trophique des cardiomyocytes à divers stimuli (AngII, PE, ET-1, ...) (Molkenin et al. (1998) ; Kato et al. (2000) ; Zhu et al. (2000) ; Roehrl et al. (2004)). Dans des modèles d'hypertrophie cardiaque *in vivo*, les effets inhibiteurs de la CsA et/ou du FK506 évoquent le rôle de la CaN dans la genèse de l'hypertrophie cardiaque (Meguro et al. (1999); Lim et al. (2000) ; Goldspink, McKinney, Kimball, Geenen, and Buttrick (2001)) mais cela reste controversé (Sussman et al. (1998) ; Hainsey, Csiszar, Sun, and Edwards (2002)).

De nombreuses voies de signalisation du développement des mammifères utilisent l'activité CaN. Ces effets biologiques ont pour effecteur le facteur de transcription NFATc. Leurs rôles respectifs ont été étudiés *in vitro* : par l'utilisation d'adénovirus codant un dominant négatif de NFATc qui inhibent le processus de l'hypertrophie de cardiomyocytes stimulé par l'endothéline-1 (van Rooij et al. (2002)), *in vivo* : le knock-out du gène de la CaN et/ou NFATc montre le rôle majeur de la voie CaN-NFATc dans le développement de l'hypertrophie (Bueno et al. (2002) ; Wilkins et al. (2002)).

Le facteur de transcription NFATc possède à ce jour 5 isoformes. Parmi elles, NFATc1 à c4 sont contrôlés par la CaN et la signalisation calcique intracellulaire (Hogan, Chen, Nardone, and Rao (2003)). NFATc1, NFATc3 and NFATc4 apparaissent comme les promoteurs de l'hypertrophie et de la prolifération des muscles lisses (Lipskaia and Lompre

(2004)), tandis que NFATc2 possède des propriétés suppressives de tumeurs (Lipskaia and Lompre (2004)).

A l'état basal, le facteur NFATc est hyperphosphorylé et localisé dans le cytosol. En réponse à une stimulation « ad hoc », l'activation de la CaN déphosphoryle NFAT. Ce dernier va alors vers le noyau avec l'aide d'autres facteurs de transcription GATA4, AP-1, MEF-2, il active ensuite la transcription de multiples gènes, comme MCIP-1 (Frey, McKinsey, and Olson (2000)). Il a un rôle aussi dans les cellules cancéreuses où il participe à leur angiogénèse, à leur survie et à leur migration invasive (Mancini and Toker (2009) ; Muller and Rao (2010)).

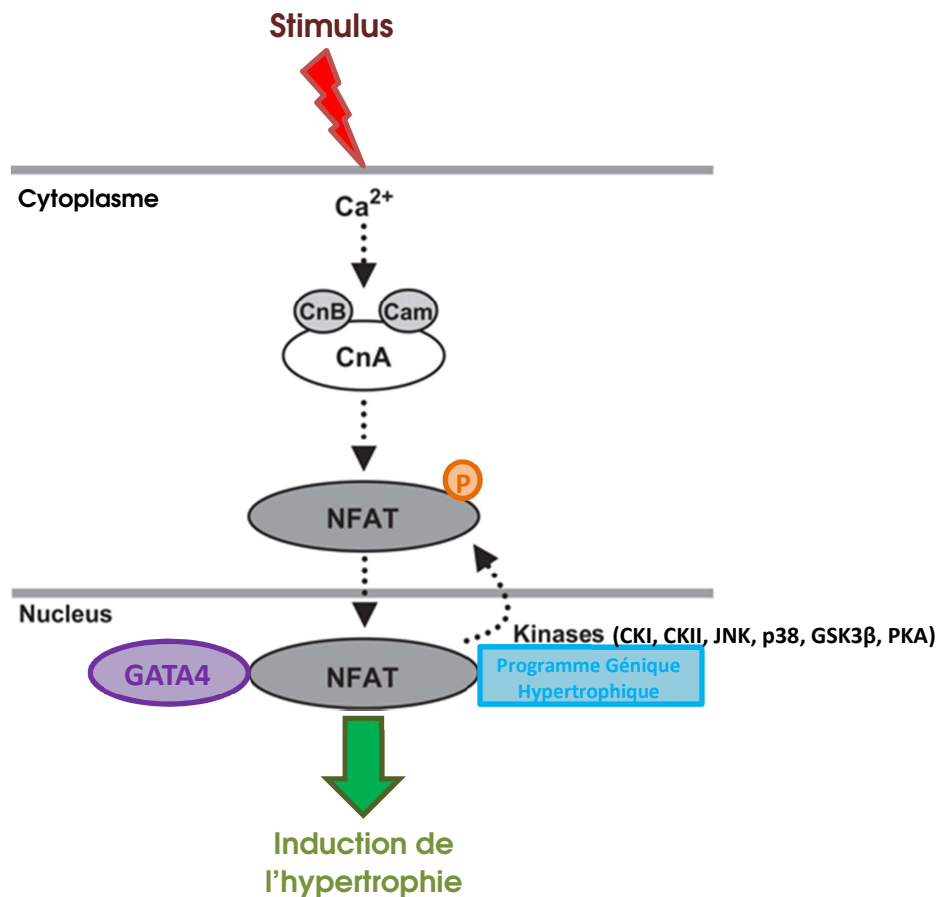


Figure 19 : La voie CaN/NFAT. Modifiée d'après Molkenin (2004). JNK, p38, GSK3β, caséine kinase I et II (CKI et CKII), protéine kinase A (PKA), et éventuellement ERK phosphorylent les membres de la famille NFAT et inhibent la translocation nucléaire.

(ii) Ca^{2+} /CALMODULINE KINASE II (CaMKII)

La CaMK est une kinase dépendante du Ca^{2+} /CaM et appartient à la famille des sérine/thréonine kinases. Cette famille est composée de nombreuses kinases, toutes contrôlées par le Ca^{2+} . Dans le cœur, les CaMK appartiennent à la sous famille des CaMKII et sont présentes sous plusieurs isoformes (Tobimatsu and Fujisawa (1989)).

Quatre isoformes de CaMKII (α , β , δ et γ), issues de quatre gènes distincts, ont été décrites. Chaque CaMK se caractérise par ses 3 domaines : un de catalyse, un de régulation et un d'association. Le domaine catalytique se trouve en N-terminale et possède le domaine kinase où se trouvent les sites de liaison à l'ATP et au substrat. Le domaine de régulation de la protéine se situe en son centre et comporte des sites d'auto-inhibition ainsi que ceux permettant la liaison au complexe Ca^{2+} /CaM. A la fin de la protéine se trouve le domaine d'association, siège des interactions entre les sous-unités elles-mêmes ou avec d'autres protéines (Hudmon and Schulman (2002a, 2002b)). Les isoformes de la CaMKII δ et γ sont spécifiques du myocarde, avec comme isoforme prédominante, la CaMKII δ (Baltas, Karczewski, and Krause (1995); Edman and Schulman (1994); Tobimatsu and Fujisawa (1989)). A l'heure actuelle, 13 variants de cette isoforme ont été décrits. Les variants δ (2 et 3) sont présents dans le cœur adulte (Baltas et al. (1995); Hagemann, Hoch, Krause, and Karczewski (1999)). L'isoforme $\delta 3$ a une séquence de 11 acides aminés permettant un adressage nucléaire que n'a pas l'isoforme $\delta 2$, faisant d'elle une protéine cytosolique (Edman and Schulman (1994); Srinivasan, Edman, and Schulman (1994)). Les isoformes de CaMKII varient selon le stade de développement : au stade embryonnaire on ne trouve que l'isoforme $\delta 4$ puis l'isoforme γ est présente dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Hagemann et al. (1999)) et disparaît à l'âge adulte (Colomer, Mao, Rockman, and Means (2003)).

Le rôle de la voie CaMKII dans le processus hypertrophique cardiaque est maintenant clairement établi grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. *In vitro*, l'inhibiteur W-7 de la CaMKII bloque l'expression de l'ANF par des cardiomyocytes stimulés par la PE (Ramirez, Zhao, Schulman, and Brown (1997); Sei et al. (1991)) alors que la surexpression de l'isoforme CaMKII $\delta 3$ par un adénovirus a un effet inverse (Ramirez et al. (1997)). *In vivo*,

l'expression ainsi que l'activité cardiaque de la CaMKII sont augmentées dans des modèles d'hypertrophie cardiaque (Boknik et al. (2001); Hagemann et al. (1999); Hempel, Hoch, Bartel, and Karczewski (2002); T. Zhang et al. (2003)). Il en est de même chez l'Homme (Hoch, Meyer, Hetzer, Krause, and Karczewski (1999); Kirchhefer, Schmitz, Scholz, and Neumann (1999)). Par ailleurs, l'utilisation de souris transgéniques a réaffirmé le rôle de la CaMKII dans le développement de l'hypertrophie cardiaque (Colomer and Means (2000)).

L'action de la CaMKII peut se situer à deux niveaux : **1-** en activant la transcription de gènes et **2-** en régulant l'homéostasie calcique.

1- L'activation de la transcription et de la régulation de gènes.

La CaMKII agit dans la régulation de l'expression de « gènes marqueurs de l'hypertrophie » comme l'ANF (Ramirez et al. (1997)), le BNP (Q. He and LaPointe (2000)), β -MHC (Zhu et al. (2000)) et l' α -SKA (Passier et al. (2000)). En outre, elle contrôlerait des facteurs de transcription comme CREB (Sheng, Thompson, and Greenberg (1991)), ATF-1 (P. Sun, Lou, and Maurer (1996)), AP-1 (Ho, Gullberg, and Chatila (1996)), SRF (Misra et al. (1994)) et MEF-2 (Passier et al. (2000)). MEF-2 a un rôle primordial dans la signalisation musculaire, en particulier cardiaque (Kolodziejczyk et al. (1999); Lu, McKinsey, Nicol, and Olson (2000) par ses interactions avec des Histones Déacétylases de classe II (HDACs). Les HDACs sont des molécules répressant la transcription (Miska et al. (1999)). De base, MEF-2 et HDAC sont associés et inhibent la transcription. L'augmentation du Ca^{2+} qui va se coupler à la CaM, déclenche la phosphorylation d'HDAC par la CaMKII et la levée de l'inhibition sur MEF-2 (McKinsey, Zhang, and Olson (2000)). Ensuite, HDAC s'associe à la protéine 14-3-3 pour être transloqué en dehors du noyau. De son côté, MEF-2 va se lier à la chromatine et déclencher la transcription de gènes (Davis, Gupta, Camoretti-Mercado, Schwartz, and Gupta (2003); Kao et al. (2001); McKinsey et al. (2000); Miska et al. (1999)) (Figure 20).

2- Contrôle de l'homéostasie calcique

La CaMKII est une protéine régulatrice de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique comme RyR2 (Le Peuch, Haiech, and Demaille (1979); Simmerman, Collins, Theibert, Wegener, and Jones (1986)), SERCA2a (Toyofuku, Curotto Kurzydowski, Narayanan, and MacLennan (1994)), le PLB mais également les LTCC (Dzhura, Wu, Colbran,

Balsler, and Anderson (2000)). Ces différentes régulations seront développées dans la partie III 2.b.

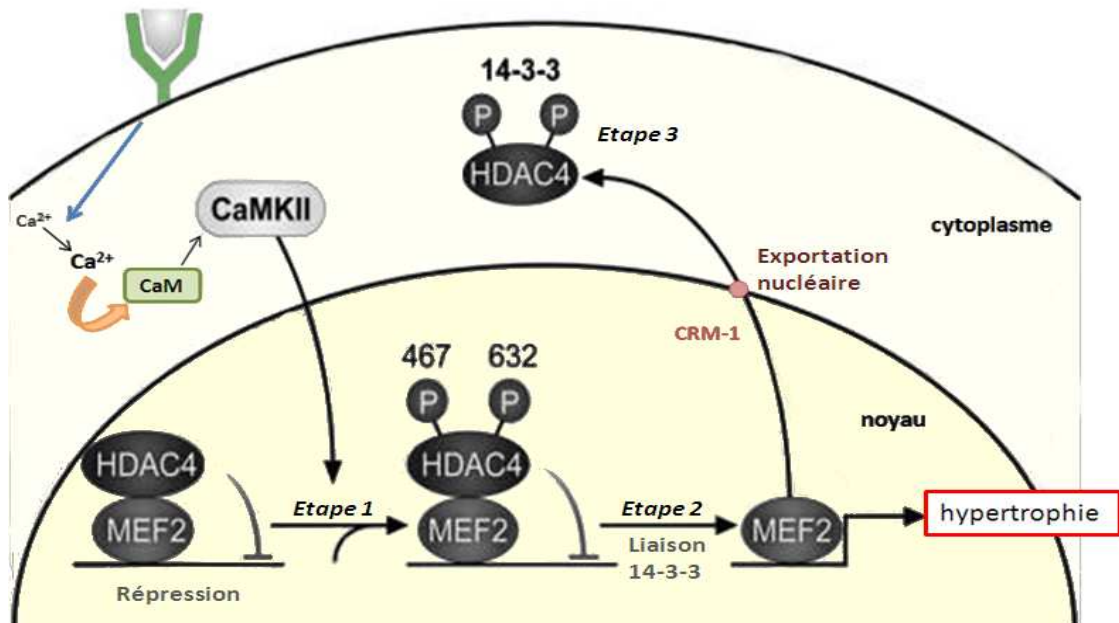


Figure 20 : La voie CaMKII. Modifiée d’après H. Li et al. (2010).

Seule la voie hypertrophique CaN-NFAT possède des protéines qui contrebalancent son activité pro-trophique. Ces protéines, MCIP-1 par son expression, la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) par son activité, peuvent conduire à une réponse anti-trophique.

(iii) LA REPONSE ANTI-TROPHIQUE

i. Gsk-3 β

Gsk-3 β est une sérine/thréonine kinase très conservée (Harwood (2001)) qui a deux isoformes α (51 kDa) et β (47 kDa) (Grimes and Jope (2001b)) très homologues (97%). Bien que les deux isoformes soient présentes dans le cœur (Henry and Killilea (1994)), la majorité des études se sont focalisées sur l’isoforme β .

Initialement impliquée dans l'inhibition de la synthèse du glycogène (P. J. Parker, Caudwell, and Cohen (1983)), il a été montré par la suite que Gsk-3 β participerait à de nombreuses fonctions cellulaires dans les régulations du métabolisme, de l'expression de gènes et de l'intégrité du cytosquelette (pour revue : (Grimes and Jope (2001a)). Gsk-3 β serait également impliquée dans la tumorigenèse et la maladie d'Alzheimer (Imahori and Uchida (1997)). Les inhibiteurs pharmacologiques de l'activité kinase de Gsk-3 β sont le chlorure de lithium (LiCl) ou le SB-415286. Gsk-3 β est principalement localisée dans le cytosol mais elle peut être également retrouvée au niveau nucléaire, selon le stimulus impliqué (Bijur and Jope (2001) ; Diehl, Cheng, Roussel, and Sherr (1998) ; Morisco et al. (2001)).

Une des caractéristiques de Gsk-3 β est la stimulation de son activité kinase à l'état basal. L'inactivation de Gsk-3 β est due à sa phosphorylation sur la sérine 9 par des protéines kinases telles que celles de la voie PI3K/Akt. Le degré d'activation de Gsk-3 β peut être évalué biochimiquement par son niveau de phosphorylation (rapport de Gsk-3 β phosphorylée sur Gsk-3 β non phosphorylée). Si la forme Gsk-3 β déphosphorylée prédomine, elle est active et est capable de phosphoryler NFAT agissant ainsi comme un inhibiteur de l'hypertrophie.

Il existe de nombreuses évidences, *in vitro* et *in vivo*, du rôle anti-trophique de Gsk-3 β . Morisco et al. (Morisco et al. (2001)) démontrent qu'une stimulation β -adrénergique active la voie Akt et inactive Gsk-3 β en favorisant son extrusion nucléaire, conduisant à l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ce travail souligne l'importance de la localisation subcellulaire de l'enzyme. La surexpression myocardique d'un mutant constitutivement actif de Gsk-3 β chez la souris inhibe le développement de l'hypertrophie en réponse à une surcharge de pression et/ou à une stimulation adrénergique validant ainsi le rôle inhibiteur de Gsk-3 β dans le processus hypertrophique (Antos et al. (2002) ; Badorff et al. (2002)). Gsk-3 β agit en contrôlant des facteurs de transcription cardiaque et/ou la synthèse protéique (Hardt and Sadoshima (2002)). Gsk-3 β phosphoryle de nombreux facteurs de transcription, parmi lesquels nous citerons : CREB (Fiol et al. (1994)), GATA4 (Morisco et al. (2001)), NFAT (Beals, Sheridan, Turck, Gardner, and Crabtree (1997) ; Graef et al. (1999)) et NF κ B (Bournat, Brown, and Soler (2000)). La phosphorylation de ces facteurs de transcription conduit à une diminution de la transcription via un défaut de liaison à l'ADN, une extrusion nucléaire ou

une ubiquitination (Hardt and Sadoshima (2002)). Gsk-3 β contrôle le développement de l'hypertrophie cardiaque en agissant principalement sur deux facteurs de transcription à savoir NFAT et GATA4 (Hardt and Sadoshima (2002)). En réponse à un stimulus, la CaN déphosphoryle NFAT lui permettant ainsi d'être transloqué au niveau nucléaire et de se lier à l'ADN (cf. partie III.1.i.). Gsk-3 β en phosphorylant NFAT s'oppose à ce mécanisme en agissant comme le contre-balancier direct de la voie CaN-NFAT (Antos et al. (2002)).

Il est également décrit que Gsk-3 β phosphoryle le facteur de transcription GATA4 et module la transcription via l'extrusion nucléaire médiée par CRM-1 (Morisco et al. (2001)). Les membres de la superfamille GATA sont décrits comme étant impliqués dans le développement et l'hypertrophie cardiaque. Un de ces membres, GATA4 règle l'expression de nombreux gènes cardiaques tels que l'ANF, le BNP, les chaînes lourdes α et β de la myosine, le récepteur de type IA de l'AngII, la troponine I ou bien encore l'échangeur NCX. La régulation de GATA4 par Gsk-3 β affecte de façon importante les changements phénotypiques des cardiomyocytes (Hardt and Sadoshima (2002)). Elle aurait également un rôle dans la restauration de la sensibilité des myofilaments au Ca²⁺ par sa réactivation après une thérapie de réactivation de la systole cardiaque par un pacemaker (Kirk, Zhang, Murphy, and Van Eyk (2013)).

L'autre mécanisme par lequel Gsk-3 β contrôle l'hypertrophie cardiaque concerne la synthèse protéique. La synthèse protéique est un processus complexe impliquant trois étapes clés : **1**-l'initiation, **2**-l'élongation et **3**-la traduction. Un des points critiques du processus est la liaison du facteur d'initiation de la traduction eIF2 à l'ARNt (met-tRNA), puis la fixation à la sous-unité 40S du ribosome (pour revue : (Rhoads (1999)). Gsk-3 β en phosphorylant eIF2, le rend inactif et bloque ainsi la synthèse protéique (Welsh, Miller, Loughlin, Price, and Proud (1998)).

Gsk-3 β a peut-être une activité anti-hypertrophique mais des études ont montré par ailleurs son implication pro-fibrotique et pro-apoptotique accompagnées d'une baisse de la fonction contractile (Michael et al. (2004) ; Hirotsu et al. (2007) ; Zhai et al. (2007) ; Menon, Johnson, Ross, Singh, and Singh (2007)) (Figure 21).

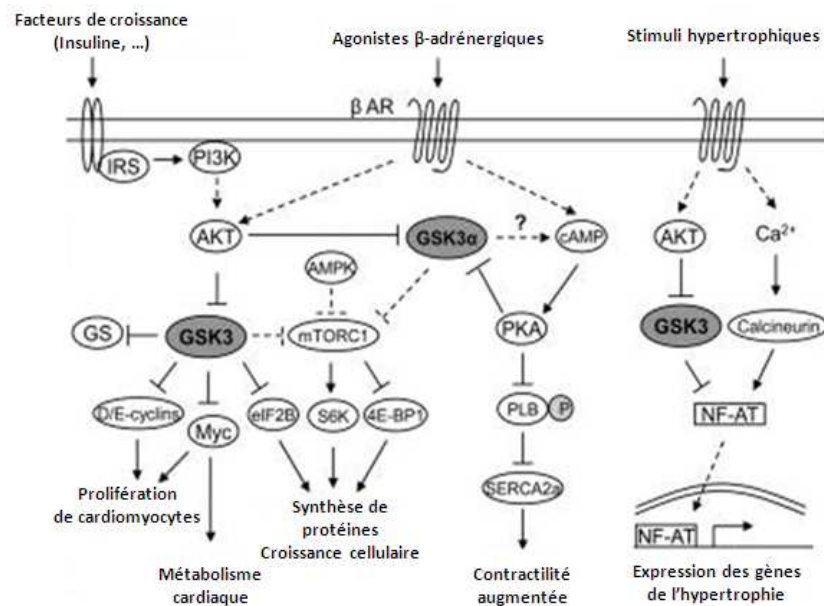


Figure 21 : Gsk-3β dans le cardiomyocyte. D'après Cheng et al. (2011).

ii. MCIP-1

La protéine **MCIP-1** (Modulatory Calcineurin inhibitory protein) peut lier la CaN et l'inhiber. Elle bloque ainsi la translocation nucléaire de NFAT. Initialement découverte dans le muscle squelettique, MCIP-1 est également présente au niveau cardiaque (B. Rothermel et al. (2000)). L'activation de la voie de CaN-NFAT permet l'expression rapide de MCIP-1, car elle représente un mode de rétrocontrôle négatif (B. Rothermel et al. (2000) ; J. Yang et al. (2000)). Le rôle anti-trophique de MCIP-1 a été montré *in vivo* dans un modèle d'infusion d'isoprotérenol sur une souris génétiquement modifiée sur-exprimant MCIP-1 au niveau cardiaque. Rôle confirmé en utilisant des souris issues du croisement de cette lignée avec des souris exprimant une forme constitutivement active de CaN qui ne développent pas d'hypertrophie cardiaque (B. A. Rothermel et al. (2001)). Pedram et al. (Pedram, Razandi, Aitkenhead, and Levin (2005)) ont rapporté que l'expression de MCIP-1 est liée aux œstrogènes par une voie impliquant PI3K. MCIP-1 avec les peptides atrio-natriurétiques participerait à l'effet préventif des œstrogènes sur le développement de l'hypertrophie cardiaque (Pedram et al. (2005)).

Le développement de l'hypertrophie cardiaque via des voies pro-trophiques Ca^{2+} -dépendantes, est le résultat mais également participe aux modifications de l'homéostasie calcique dans le cardiomyocyte hypertrophié et mène à l'insuffisance cardiaque.

III.2.REMODELAGE DES MOUVEMENTS CALCIFIQUES DE L'HVG VERS L'IC

(a) REMODELAGE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

La durée du potentiel d'action (PA) dans un cardiomyocyte hypertrophié est prolongée : l'allongement de la phase de repolarisation membranaire et du transitoire calcique en sont à l'origine (Coraboeuf and Nargeot (1993) ; Qin et al. (1996) ; Bers (2002b) ; Bers and Guo (2005)) et le restera jusqu'au stade de l'insuffisance (Figure 22).

De nombreuses études montrent que la densité du courant calcique de type L (I_{CaL}) est inversement corrélée à l'importance de l'hypertrophie ou la dysfonction ventriculaire. En effet, dans des modèles d'hypertrophies légères à modérées, I_{CaL} est souvent augmenté. Pour Schroder et al., la densité des LTCC est maintenue lors de l'hypertrophie cardiaque (Schroder et al. (1998)). Peut-être que cette observation est liée à la sévérité de l'hypertrophie : dans les cas d'hypertrophies sévères et d'IC, I_{CaL} a un niveau comparable aux contrôles et même parfois décroît (Armoundas, Wu, Juang, Marban, and Tomaselli (2001)). Inversement, de nombreuses observations ont suggéré que le cycle calcique est différent dans l'IC avec une augmentation du courant calcique entrant (I_{CaL}) (Armoundas et al. (2001) ; Mukherjee and Spinale (1998) ; Z. Wang, Nolan, Kutschke, and Hill (2001)). Si la quantité de Ca_v 1.2, sous-unités des LTCC, est inchangée lors de l'IC une partie de ces canaux restent à l'intérieur de la cellule et ne participent plus au CEC (T. T. Hong et al. (2012)).

Dans des myocytes ventriculaires de cœurs humains insuffisants, l'activité des LTCC est plus élevée malgré un niveau constant de leur transcrit et protéine, suggérant une possible régulation post-traductionnelle de ces complexes par phosphorylation (Handrock et al. (1998)). Les protéines kinases A et C (PKA et PKC) ainsi que la CaMKII en seraient les

principales responsables (Kamp and Hell (2000)). Cette modification post-traductionnelle régule de nombreuses caractéristiques dans la fonction de ce canal : son expression, son activation/inactivation voltage-dépendante ainsi que sa période d'inactivation. En effet, la CaMKII (Koval et al. (2010)) tout comme la PKA (Yue, Herzig, and Marban (1990)) augmentent la fréquence d'ouverture prolongée de $Ca_v1.2$ (L. Yang et al. (2005)) et favorisent le mode d'ouverture 2 de $Ca_v1.2$, le mode dit de facilitation. La facilitation de $Ca_v1.2$ par le maintien du courant I_{CaL} est pro-arythmique en favorisant les post-dépolarisations précoces (EADs ou early afterdepolarizations, cf partie III.3)(Koval et al. (2010) ; Wu, MacMillan, McNeill, Colbran, and Anderson (1999) ; Wu et al. (2002)). Les courants TTCC normalement absents des myocytes ventriculaires se retrouvent de nouveau exprimés dans des modèles d'IC et contribuent à la transition vers l'IC (Vassort, Talavera, and Alvarez (2006)).

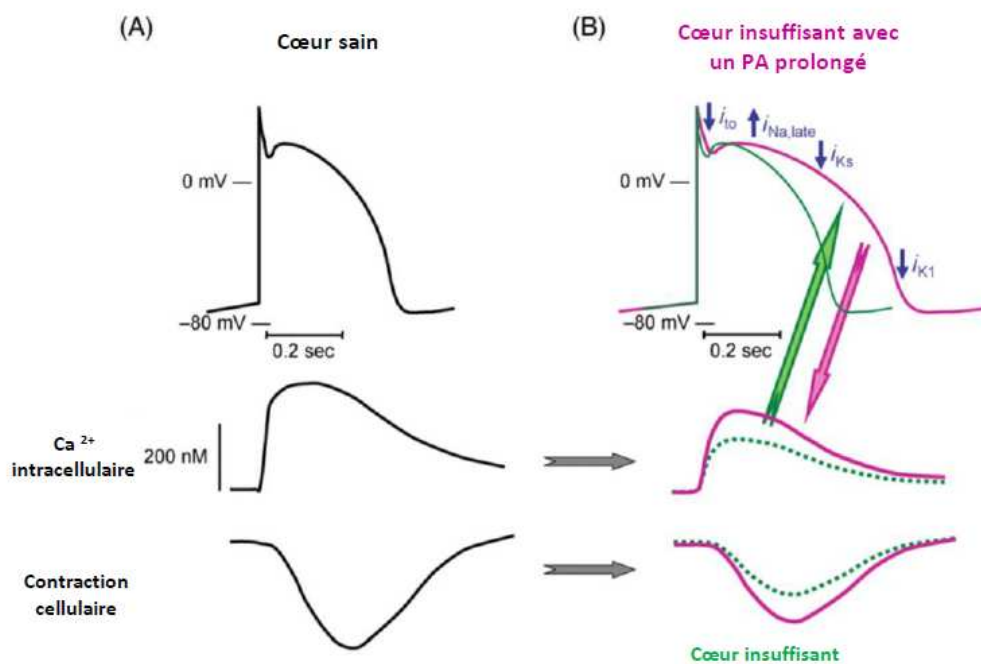


Figure 22 : Schématisation des modifications électrophysiologiques et de l'homéostasie calcique lors de l'IC. Modifiée d'après G. Michael, Xiao, Qi, Dobrev, and Nattel (2009). (A) Un PA cardiaque normal, en dessous le transitoire calcique associé reflétant l'évolution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. La dernière courbe représente la contraction cellulaire par la baisse de la longueur de la cellule. (B) La prolongation de la durée du PA dans le cœur insuffisant est modélisée en rose. Les concentrations en Ca^{2+} et la contraction cellulaire sont en vert. La diminution de la libération de Ca^{2+} en systole conduit à une diminution de la contractilité cellulaire et prolonge la durée du PA par le remodelage des courants ioniques (les changements sont indiqués par les flèches violettes indiquant l'augmentation ou la diminution des courants spécifiés).

Que ce soit dans un modèle d'hypertrophie compensée avec une dysfonction systolique ou une insuffisance cardiaque clinique, le niveau du transcrit et de la protéine de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cardiaque (NCX1) augmente à la même hauteur que celui rapporté dans une insuffisance cardiaque (Z. Wang et al. (2001)). Par contre, sa fonction, évaluée par le courant I_{NCX} , faiblit. Une situation similaire a été observée dans un modèle génétique d'hypertrophie modeste (Mitarai, Reed, and Yatani (2000)). L'explication pour cette diminution d'activité résiderait dans la dissociation de la protéine NCX comme la diminution de son niveau d'activité dans l'hypertrophie (Boateng et al. (2001)). La baisse du courant NCX dans l'hypertrophie favorise la séquestration de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS), ainsi la performance systolique augmente dans le cœur hypertrophié. Néanmoins, cette surcharge en Ca^{2+} joue un rôle important dans la phase ultime de progression vers l'IC. Il est très probable que l'activité de NCX est régulée différemment suivant les stades d'hypertrophie et d'insuffisance du cœur. Elle contribue à la transition patho-physiologique du cœur de l'hypertrophie à l'insuffisance.

D'autres canaux se trouvent altérés dans la transition de l'HVG à l'IC :

_ les canaux sodiques voltage-dépendants, $\text{Na}_v1.5$ qui s'ouvrent et se ferment rapidement pour initier la dépolarisation du potentiel d'action. La CaMKII est capable de s'associer et de phosphoryler la sous-unité α de $\text{Na}_v1.5$, initiant un courant I_{Na} durable « long-lasting » pouvant mener à la survenue de EADs et DADs (Ashpole et al. (2012) ; Hund et al. (2010)).

les canaux potassiques. Il est régulièrement observé que l'ensemble des courants potassiques (I{to} , I_{K1} , I_{KS} , I_{Kr}) sont diminués dans un cœur insuffisant. Même si suivant les modèles les changements sont variables, la constante de cette diminution de ces courants prolonge la durée du PA (Aiba and Tomaselli (2010)). Particulièrement dans un modèle canin, la tachycardie provoque une diminution de l'expression d' I_{to} avec des régulations par les voies $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}$ et CaN/NFAT . Ces voies, tout en étant des senseurs du Ca^{2+} , effectuent un rôle régulateur dans la traduction d' I_{to} qui est dépendante du rythme cardiaque (Xiao et al. (2008)). L'altération de ces courants contribue également à une augmentation de la susceptibilité à des arythmies comme les *delayed after-depolarizations* (DADs) par la baisse de la densité du courant I_{K1} dans l'IC (Rose et al. (2005) J. ; G. R. Li, Lau, Ducharme, Tardif, and Nattel (2002)).

En addition à des changements des courants responsables du PA dans le cardiomyocyte, la transition de l'HVG à l'IC entraîne de profondes modifications dans les mouvements calciques intracellulaires.

(b) ALTERATIONS DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (POUR REVUE M. LUO AND ANDERSON (2013))

Systematiquement, les cardiomyocytes issus d'un cœur insuffisant présentent un CEC altéré, caractérisé par une diminution du transitoire calcique, une augmentation des « fuites » calciques en diastole du RS et une baisse de l'emprisonnement du Ca^{2+} dans le RS. L'ensemble de ces éléments participe à l'altération de la contraction et de la relaxation de ces cardiomyocytes (Piacentino et al. (2003)). Des protéines clés de la prise en charge du Ca^{2+} sont à l'origine de ces dysfonctions.

(i) LA MODULATION DU CYCLE CALCIQUE

Le cycle calcique assure au sein du cardiomyocyte le couplage excitation-contraction (CEC) sur lequel s'appuie la fonction cardiaque.

Dans l'hypertrophie comme l'IC, de nombreuses observations ont suggéré que le cycle calcique soit différent avec une augmentation des transitoires calciques (Wickenden et al. (1998)) par l'augmentation du courant I_{CaL} (Armoundas et al. (2001) ; Mukherjee and Spinale (1998) ; Z. Wang et al. (2001)). Dans chaque cas, la prise en charge altérée du Ca^{2+} contribue à l'activation de plusieurs cascades de phosphatases et kinases incluant les « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPKs) et la CaN (pour revue : Vlahos, McDowell, and Clerk (2003)).

Ces défauts sont le résultat de changements d'expression génique : (I) de RyR2, (II) de SERCA2a et (III) de NCX1 entre autres.

(I) La densité de RyR2 est maintenue lors de l'hypertrophie cardiaque (Schroder et al. (1998)). Par contre, la distance entre RyR2 et les LTCC se retrouve accentuée dans l'hypertrophie cellulaire du myocyte, caractéristique de l'hypertrophie cardiaque, ce qui participe à l'altération du cycle calcique (Gomez et al. (1997)). La densité des RyR2 baisse lors de l'IC (Naudin, Oliviero, Rannou, Sainte Beuve, and Charlemagne (1991); Brillantes, Allen, Takahashi, Izumo, and Marks (1992) ; Rannou et al. (1995)). La phosphorylation par la PKA favorise l'ouverture de RyR2 pour améliorer la réponse à la $[Ca^{2+}]_i$, la réponse combat-fuite (ou « fight-or-flight »)(Shan et al. (2010)). Lorsque RyR2 est phosphorylé sur sa sérine 2809 par la PKA *in vivo*, on observe une dissociation transitoire de la liaison entre FKBP12.6 et RyR2 (pour revue : Marks (2002) ; Wehrens et al. (2004)). Chez l'Homme (Marx et al. (2000) ; Reiken et al. (2003)) comme chez les animaux (Shan et al. (2010) ; Ono et al. (2000) ; Yano et al. (2000) ; Lehnart, Wehrens, and Marks (2005)) souffrants d'IC, RyR2 est hyperphosphorylé par la PKA (sur la sérine 2808) et ainsi amène à sa dissociation de FKBP12.6. Sa probabilité d'ouverture est alors augmentée et provoque des fuites calciques du RS via RyR2 (Marx et al. (2000) ; Yano et al. (2000)). Kohno. et al. ont observé que l'affinité de liaison entre RyR2 et FKBP12.6 était renforcée par la molécule JTV519 (K201) (Kohno et al. (2003)). Elle permet alors de stabiliser RyR2 à l'état fermé et de prévenir les fuites calciques et donc les arythmies (Wehrens et al. (2004)). Par contre, elle reste inefficace lorsque la conformation de RyR2 est elle-même touchée, par une mauvaise interaction interdomaine par exemple (Yamamoto et al. (2008)). Ainsi, FKBP12.6 est un stabilisateur de RyR2 à l'état clos dans la limite de l'état conformationnel de RyR2 lui-même et cette liaison participe à la stabilité de la fonction diastolique.

Il serait simpliste de dire que toutes les fuites en diastole de RyR2 ont pour origine la dissociation de FKBP12.6 et RyR2, via la phosphorylation par la PKA, car d'autres modifications peuvent affecter les propriétés d'ouverture de RyR2 (Bers (2012)).

En effet, la protéine phosphatase 1 (PP1) et la protéine phosphatase 2A(PP2A) sont les deux phosphatases capables de déphosphoryler le RyR2. Leurs protéines d'ancrage respectives sont la spinophiline et la protéine PR130. La protéine PP1 est capable de déphosphoryler RyR2 sur ses sérines 2809 et 2814 lorsque la PP2a ne

déphosphoryle que la sérine 2814 (Huke and Bers (2008)). Lors d'une IC, le niveau d'expression cellulaire des phosphatases s'accroît mais on les trouve moins associées à RyR2. Cette situation contribue à la phosphorylation de RyR2 pendant l'IC et donc aux fuites diastoliques (Marx et al. (2000)).

En outre, les fuites calciques pouvant être à l'origine d'arythmies sont prévenues par l'inhibition de la CaMKII et non celle de la PKA (Ai, Curran, Shannon, Bers, and Pogwizd (2005)). La CaMKII peut phosphoryler RyR2 sur 2 sérines (2809 et 2814) (Wehrens et al. (2004) ; Ai et al. (2005)) avec une préférence pour la deuxième (Ai et al. (2005)). La disparition de ce site de phosphorylation dans un modèle murin entraîne une altération de la relation force-fréquence (Kushnir, Shan, Betzenhauser, Reiken, and Marks (2010)) tout en protégeant des arythmies et de l'IC après un infarctus du myocarde (Respress et al. (2012) ; Chelu et al. (2009)). Récemment, l'équipe de Fischer et al. a identifié que le passage de l'hypertrophie à l'insuffisance cardiaque chez l'homme passait par une augmentation de la phosphorylation de la CaMKII sur RyR2 (Fischer et al. (2013)). Sur cellules isolées, Guo et al. mettent en évidence que la phosphorylation par la CaMKII augmente la sensibilité de RyR2 au Ca^{2+} et conduit à la survenue de sparks (T. Guo et al. (2012)). Ces dernières découvertes renforcent l'idée que la phosphorylation par la CaMKII sur RyR2 est un facteur de risque potentiel d'arythmies chez des patients insuffisants. En effet, l'inhibition de cette phosphorylation protège du déclenchement de tachycardies ventriculaires des souris porteuses de la mutation responsable de la myopathie de Duchenne (Ather et al. (2013)). D'après Fischer et al. et Valdivia HH., la phosphorylation par la CaMKII serait même responsable de la transition vers l'IC car contrairement à la phosphorylation par la PKA elle augmente lors du passage de l'hypertrophie à l'IC (Fischer et al. (2013) ; Valdivia (2012)). Effectivement, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, il a été montré que l'activation de la CaMKII favorise l'ouverture et donc la libération de Ca^{2+} par RyR2 en le phosphorylant. Ce Ca^{2+} libéré peut activer des voies de signalisation Ca^{2+} -dépendantes telles que celle de la CaN ou déstabiliser le CEC conduisant à des arythmies, responsables de la transition vers l'insuffisance cardiaque (Hain, Onoue, Mayrleitner, Fleischer, and Schindler (1995) ; Lehnart, Wehrens, Kushnir, and Marks (2004) ; Witcher, Kovacs, Schulman, Cefali, and Jones (1991)).

Les ROS (*Reactive Oxygen Species*) peuvent également directement activer RyR2, en augmentant leur sensibilité au Ca^{2+} luminal (Terentyev et al. (2008)) et contribuer aux fuites calciques dans l'IC. En outre, l'état d'activation de la CaMKII peut s'élever à la fois par son autophosphorylation et la présence de ROS (Erickson, He, Grumbach, and Anderson (2011)), renforçant le phénotype des fuites calciques du RS présent dans l'insuffisance cardiaque.

- (II) La diminution de l'expression de SERCA2a provoque une défaillance dans le recaptage du Ca^{2+} dans le RS en diastole et ainsi des altérations de la relaxation (Arai, Matsui, and Periasamy (1994) ; DiPaola, Mattiello, Margulies, Jeevanandam, and Houser (1999)). Néanmoins ces résultats diffèrent selon les pathologies : l'expression de SERCA2a est stable dans une hypertrophie cardiaque modérée et n'est touchée que dans des situations complexes (Arai, Suzuki, and Nagai (1996)) ou lorsque le cœur devient insuffisant (Yano, Ikeda, and Matsuzaki (2005)). Dans l'IC humaine, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est augmentée par des défauts d'extraction du Ca^{2+} hors du cytosol. Il est admis que le recaptage du Ca^{2+} dans le RS est dégradé dans un cœur humain insuffisant (Limas et al. (1987) ; Hasenfuss et al. (1994)).

Cette altération de la prise du Ca^{2+} par le RS reposerait sur l'augmentation de l'activité inhibitrice du phospholamban (PLB) sur sa protéine cible SERCA2a (Nicolaou et al. (2009) ; Schwinger, Munch, et al. (1999)). De multiples études font état d'une réduction de la phosphorylation du PLB lors d'une IC, augmentant l'inhibition de SERCA2a (Schwinger, Munch, et al. (1999) ; Schmidt et al. (1999)). Cette décroissance de phosphorylation, sur la thréonine 17 par exemple, est possible par l'augmentation de la déphosphorylation par la protéine phosphatase 2B (ou CaN) malgré une activité accrue de la CaMKII dans un myocarde insuffisant (Munch, Bolck, Karczewski, and Schwinger (2002)). De même, la déphosphorylation de la sérine 16 est la résultante d'une augmentation de l'activité de la protéine phosphatase 1 dans l'IC humaine (Schwinger, Munch, et al. (1999)). Le knock-out murin pour le PLB, dans le cœur, montre une activité contractile améliorée avec une affinité accrue entre SERCA2a et le Ca^{2+} (W. Luo et al. (1994)). Des mutations humaines sur le gène codant pour le PLB, introduites dans des modèles murins, peuvent soit renforcer leur inhibition sur SERCA2a (Schmitt et al. (2003) ; Haghighi

et al. (2003)) soit développer une cardiomyopathie dilatée et une mort subite (Schmitt et al. (2003) ; Haghghi et al. (2003) ; W. Luo et al. (1994)). La synthèse de ces études, chez la souris et l'Homme, permet de comprendre que l'activité SERCA2a/PLB doit être maintenue dans une certaine mesure afin d'assurer la fonction physiologique du cœur et éviter la survenue de maladies cardiaques comme les cardiomyopathies ou l'IC.

- (III) Dans plusieurs modèles d'IC, l'expression et l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) est augmentée (Philipson and Nicoll (2000) ; Flesch et al. (1996)) ou stable (Schwinger, Wang, et al. (1999)). Cette modification au sein du cardiomyocyte est vue comme un mécanisme d'adaptation pour préserver le métabolisme calcique, touché par une baisse de son recaptage par SERCA2a (Hobai and O'Rourke (2001)). Comme la $[\text{Na}^+]_i$ subsarcolemmale est augmentée au sein des myocytes ventriculaires insuffisants, le courant I_{NCX} change d'orientation (les ions Na^+ sortent de la cellule) (Mattiello, Margulies, Jeevanandam, and Houser (1998)) et participe à l'allongement du transitoire calcique cytoplasmique, à la surcharge calcique qui engendre : des arythmies (Pieske et al. (2002) ; Mattiello et al. (1998) ; Gaughan et al. (1999)). D'un autre côté, cet arrangement pourrait contribuer à dépléter les milieux intracellulaires (cytosol et RS) en Ca^{2+} (Pieske et al. (2002)), et donc compromettre la systole du myocarde (Schillinger et al. (2000)) et engendrer des arythmies (EADs) en soutenant le courant I_{NCX} en mode entrant (Pogwizd, Qi, Yuan, Samarel, and Bers (1999) ; Sipido et al. (2000) ; Zygmunt, Goodrow, and Antzelevitch (2000)). De plus, de nombreuses études (Flesch et al. (1996) ; Hobai and O'Rourke (2000) ; Kent et al. (1993) ; Studer, Reinecke, Bilger, et al. (1994)), mais pas toutes (Hasenfuss et al. (1999) ; Yao et al. (1998)), trouvent que cette augmentation de l'activité de NCX1 est souvent accompagnée d'une baisse de l'expression de SERCA2a. Ceci résulterait de sa réexpression à son niveau protéique du programme foetal cardiaque.

L'augmentation de l'activité de NCX1 du courant I_{NCX} en concomitance de l'activité défectueuse de SERCA2a/PLB dans l'IC entraîne une plus grande élimination de Ca^{2+} dans les myocytes insuffisants, qui rencontrent alors une altération dans la relation

force-fréquence. Néanmoins, elle contribue à une surcharge intracellulaire en Na^+ et Ca^{2+} subsarcolemmale. Dans ces conditions, NCX1 participerait à la survenue d'arythmies comme des DADs ou post-dépolarisations retardées (cf partie suivante III.3) dans l'IC chez l'Homme (pour revue : Bers, Pogwizd, and Schlotthauer (2002)).

(ii) LA MODIFICATION DE LA CONTRACTION

Parmi tous les changements répertoriés dans un myocarde humain hypertrophié et en insuffisance, on assiste à une réduction de l'activité ATPase maximale des myofilaments (Pagani et al. (1988)) et de la force maximale développée à une $[\text{Ca}^{2+}]$ donnée (Noguchi et al. (2004) ; Wolff, Buck, Stoker, Greaser, and Mentzer (1996)). Il y existe également une baisse de la vitesse de contraction ainsi qu'une baisse du nombre de ponts d'actomyosine (Knott, Purcell, and Marston (2002)), contribuant à une économisation d'énergie lors de la contraction (Hasenfuss et al. (1991)).

Au niveau protéique, nous nous attarderons plus particulièrement sur la myosine, la troponine I et l'actine.

La myosine, protéine essentielle de la contraction, se trouve dans le myocarde sous trois isoformes : V1, V2, V3, d'activité ATPasique décroissante. Chez tous les mammifères, en incluant l'Homme, à l'état normal, la forme V1 à activité ATPase élevée prédomine. Dans les cas de surcharge mécanique cardiaque, le profil s'inverse aboutissant à une baisse de l'activité enzymatique, un ralentissement de la vitesse intrinsèque de raccourcissement du muscle pour une charge nulle et une amélioration thermodynamique de la contraction (Lompre et al. (1979)). Ce changement d'isoforme a également pour effet de prolonger la durée du développement de la force (Swynghedauw and Baillard (2000)). En plus d'être affecté sur son activité ATPase, la myosine subit des changements sur ses chaînes lourdes et légères (van der Velden, Papp, Boontje, et al. (2003)) : la transition de l'isoforme α vers la β -MHC, l'isoforme du stade fœtal, entraîne la baisse du ratio α -MHC/ β -MHC. C'est un mécanisme qui va toucher à la vitesse de contraction ($+dT/dt_{\text{max}}$) (Huang, Liu, and Li (2001)). En effet, ces isoformes n'ont pas les mêmes propriétés : leur sensibilité au Ca^{2+}

diffère et n'apporte pas le même développement de tension et de rigidité au cœur (Metzger, Wahr, Michele, Albayya, and Westfall (1999)). Ainsi une des protéines essentielle à la contraction au sein des myofilaments se retrouve dans une situation en désaccord avec les efforts demandés à la pompe cardiaque adulte.

La Tn I subit des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation. Dans des cœurs de rats insuffisants, on en retrouve sur la TnI (Lamberts et al. (2007)). En utilisant des souris transgéniques avec une TnI « pseudo-phosphorylée » sur ces sites PKA, l'équipe de Takimoto (Takimoto et al. (2004)) observe chez elles une amélioration de la FDAR par rapport aux WT. Cette étude suggère que la phosphorylation de la TnI sur ces sites PKA a un rôle-clé dans la régulation de la FDAR et de son maintien au sein du myocarde. D'autres études ont remarqué une baisse significative de la phosphorylation des sites PKA (Ser23/24) de la TnI dans l'IC humaine (van der Velden, Papp, Zaremba, et al. (2003) ; Zakhary, Moravec, Stewart, and Bond (1999) ; Bodor et al. (1997)) même si elle ne paraît pas être une constante (Knott et al. (2002) ; El-Armouche, Pamminger, Ditz, Zolk, and Eschenhagen (2004)). Ces changements dans la phosphorylation peuvent passer par une down-régulation de la voie β -adrénergique, par la baisse de la densité des récepteurs β -AR ou l'augmentation de l'expression de la protéine G_i (Zakhary et al. (1999) ; Bodor et al. (1997) ; Wolff et al. (1996)) et/ou l'augmentation de l'activité PP2A (El-Armouche et al. (2004) ; Neumann et al. (1997)), rencontrés dans l'IC. La réduction de la phosphorylation de la TnI via la PKA en basal entraîne une augmentation de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} et affecte la formation des ponts d'actomyosine (souvent observé dans l'IC). Ainsi la relaxation est altérée et la capacité d'éjection cardiaque réduite. Accroître la sensibilité basale par l'activation de la PKA, comme on peut le noter dans des cœurs insuffisants par rapport à des cœurs normaux entraîne un déclin de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} (van der Velden, Papp, Zaremba, et al. (2003) ; Hajjar et al. (2000) ; McConnell, Moravec, and Bond (1998)) et ne semble pas envisageable comme solution thérapeutique.

L' α -SKA se retrouve réactivée dans le cœur lors de l'IC par la réexpression du programme foetal. En effet, l'équipe de Copeland a découvert dans des cœurs insuffisants humains et murins, en stade final d'IC le doublement de son expression par rapport à son isoforme cardiaque et son niveau basal (Copeland et al. (2010)). Dans un modèle d'hypertrophie chez le rat sur une longue période avec une surcharge de pression, on

détecte le changement de proportion de l'isoforme α -SKA dès les premiers stades de dysfonction ventriculaire avant l'instauration du stade décompensé (Berni et al. (2009)). Ainsi, ce changement d'isoforme participe à un stade précoce de la transition de l'HVG à l'IC.

Les traitements pharmacologiques de l'IC visent :

_les symptômes des patients (e.g. les diurétiques et les digitaliques),

_les systèmes neurohormonaux (e.g. les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les bloqueurs des récepteurs de l'AngII, les antagonistes de l'aldostérone et les bloqueurs des récepteurs β -AR). Avec la progression de l'IC, ces inhibiteurs sont de moins en moins efficaces car le remodelage cardiaque s'affranchit du système hormonal et la dysfonction cardiaque devient intrinsèque,

_les anti-arythmiques : des bloqueurs de canaux ioniques. Au niveau ventriculaire, la ranolazine cible l'homéostasie des ions Ca^{2+} et Na^+ . Le dantrolène et le flécaïnide, des bloqueurs de RyR2, et les Rycal, des stabilisateurs des RyR2, réduisent la survenue de sparks, déclencheurs des DADs (description dans la partie ci-dessous). Ces différents types d'anti-arythmiques présentent un fort potentiel thérapeutique pour l'avenir.

III.3.ARYTHMIES

Une arythmie est un trouble du rythme cardiaque. Ce dernier ne relève pas d'un seul mécanisme. Il est le résultat d'anomalies de l'électrogénèse, d'un automatisme anormal, comme d'activités déclenchées et des anomalies de la propagation de l'influx : blocs de conduction et réentrées (Hoffman and Rosen (1981)). Ces perturbations électrophysiologiques surviennent lorsque le tissu myocardique est atteint (hypertrophie, fibrose, nécrose, remodelage ionique, etc...).

On estime que 50% de la mortalité des maladies cardiovasculaires est causée par une mort subite. En majorité, ces morts subites sont causées par des arythmies, des tachycardies ventriculaires, alimentées par des pathologies coronaires cardiaques, essentiellement les infarctus du myocarde (source : *European Cardiovascular Disease Statistics Edition 2012, © European Heart Network and European Society of Cardiology, September 2012*). Ces événements peuvent survenir chez des patients sans antécédents cardiovasculaires. Le paradoxe épidémiologique des arythmies réside dans l'absence de marqueurs spécifiques dans la population générale comme parmi les patients à risque potentiel pour prédire la survenue de ces arythmies. Aux Etats-Unis, la mort subite représente la première cause de mortalité chez les personnes âgées de plus de 40 ans avec un total de 325 000 morts par an (Figure 23). Chaque jour, 1000 personnes en meurent. Cela équivaut à une mort toutes les deux minutes. La combinaison de tous les autres facteurs de mortalité (cancer colorectal, accidents de la route,...) n'atteint même pas le niveau de mortalité causé par la mort subite (Shrivastav (2012)).

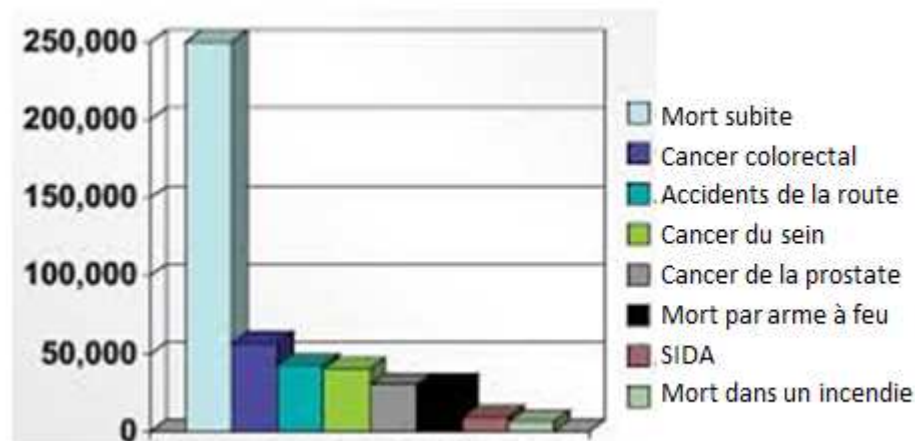


Figure 23 : Représentation graphique des principales causes de mortalité aux Etats-Unis pour les personnes de plus de 40 ans. Modifiée d'après Shrivastav (2012).

Il est donc important d'identifier les marqueurs augmentant les risques de survenue d'arythmies ventriculaires fatales dans la population générale car même si le risque relatif

est faible, le nombre de morts causées par ces arythmies est élevé (Huikuri, Castellanos, and Myerburg (2001)).

(a) ORIGINE

Il est possible de classer les mécanismes des arythmies cardiaques :

_Automatisme (anomalies de l'excitabilité) normal ou anormal.

-Activités déclenchées (anomalies de l'excitabilité) : post-dépolarisations précoces (EADs), post-dépolarisations retardées (DADs).

_Troubles de la conduction : réentrée, bloc unidirectionnel, ..

Nous développerons plus particulièrement les activités déclenchées ainsi que les troubles de la conduction.

Les activités déclenchées ont lieu à la suite d'un potentiel d'action préalable et sont des oscillations du potentiel de membrane à la suite de la dépolarisation initiale de la cellule (phase 0 du PA). Elles sont appelées des post-dépolarisations. Il en existe deux types : post-dépolarisations précoces (EADs), post-dépolarisations retardées (DADs). Ces arythmies sont des oscillations présentes pendant ou après le PA cardiaque. Leur amplitude est parfois suffisante pour faire atteindre à la membrane un potentiel capable d'initier un nouveau PA. La provocation de ces événements est une source majeure de survenue d'extrasystoles et de tachycardies. L'hypertrophie ventriculaire comme l'IC, à laquelle on associe des arythmies menant à une mort subite, sont connues pour être des foyers de DADs et EADs.

(b) LES POST-DEPOLARISATIONS PRECOCES OU *EARLY AFTERDEPOLARIZATIONS* (EADs)

Les oscillations du potentiel surviennent soit à la fin du plateau du potentiel (phase 2 du PA), soit au cours de la phase rapide de dépolarisation (phase 3 du PA) (Figure 24). Les EADs apparaissent à un potentiel positif de -30 mV lorsqu'elles se déclenchent dans la phase 2 du PA et à un potentiel plus négatif lors de la phase 3. Les mécanismes ioniques à l'origine

d'une EAD conventionnelle sont dépendants du type cellulaire, du voltage d'apparition. La réduction des courants potassiques (I_{Kr} et I_{Ks}) et l'augmentation du courant I_{CaL} ou du courant sodique tardif I_{NaLate} prolonge la durée du PA et prédispose au développement d'EADs. Elles apparaissent normalement sans l'intervention du Ca^{2+} intracellulaire. Cependant, l'augmentation de celui-ci avec des conditions prolongeant la durée du PA (stimulation des récepteurs β -AR comme une augmentation du rythme cardiaque) peut contribuer à leur apparition (Volders et al. (2000) ; Burashnikov and Antzelevitch (1998) ; Patterson, Scherlag, Szabo, and Lazzara (1997)). Il est à noter que cette induction d'EADs par la stimulation des récepteurs β -AR via l'isoprotérénol est possible sur des cardiomyocytes isolés (Volders et al. (2000)) mais pas dans une préparation multicellulaire (Burashnikov and Antzelevitch (2000)). A l'instar du Ca^{2+} intracellulaire, le Ca^{2+} libéré du RS est souvent responsable de la génération d'EADs dans les myocytes ventriculaires. Le courant de l'échangeur NCX1 contribue aux deux types d'EADs (Volders et al. (2000); Burashnikov and Antzelevitch (1998) ; Szabo, Sweidan, Rajagopalan, and Lazzara (1994)).

Le rôle des EADs dans l'arythmogénèse est une dégradation de la dispersion de la repolarisation, qui est locale et qui normalement ne se propage pas. La dispersion de cette repolarisation suppose le développement d'arythmies de réentrée. La repolarisation est en général prolongée et les EADs se manifestent souvent dans des périodes de pauses ou de bradycardie cardiaque (Wit and Rosen (1992) ; Volders et al. (2000)). Elles apparaissent parfois lorsque le rythme cardiaque s'accélère, allant du lent à un rythme normal (Burashnikov and Antzelevitch (1998)).

Toute situation favorisant l'allongement du PA va encourager l'émergence d'EADs. Il est fréquent d'en trouver chez des patients ayant un QT long de manière acquise ou congénital, lié à une dysfonction des canaux potassiques (LQT1, LQT2, LQT5, LQT6) ou sodiques (LQT3) (Grant (2001); Keating and Sanguinetti (2001)). Ces patients souffrent de tachycardies ventriculaires polymorphes comprenant les torsades de pointe.

La stimulation α -adrénergique est capable d'allonger le PA et est susceptible d'entretenir les EADs (Charpentier, Drouin, Gauthier, and Le Marec (1993)). La stimulation β -AR est impliquée dans la survenue des EADs comme des DADs (Charpentier et al. (1993) ; Burashnikov and Antzelevitch (2000)) (cf ci-après).

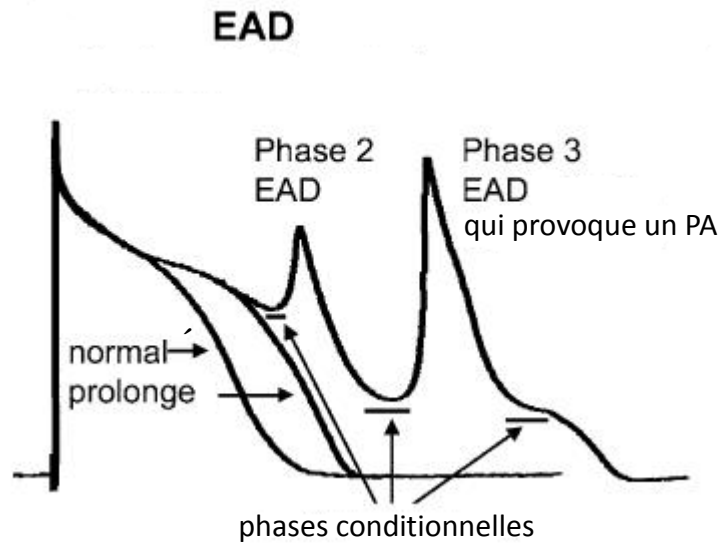


Figure 24 : Schéma d'EAD. D'après Burashnikov and Antzelevitch (2006).

(c) LES POST-DÉPOLARISATIONS RETARDÉES OU *DELAYED EARLY AFTERDEPOLARIZATIONS*
(DADs)

Les post-dépolarisations tardives surviennent après la repolarisation de la cellule (phase 4 du PA) (Figure 25). Elles sont parfois précédées d'une légère hyperpolarisation de la membrane. Si son amplitude est suffisante pour dépasser le seuil d'activation des courants sodiques et calciques, un PA pourra être déclenché. L'origine de cette activation serait le blocage de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (intoxication digitalique) ou une surcharge calcique intracellulaire. En effet, dans le deuxième cas, la stimulation catécholaminergique peut surcharger le RS, entraînant des fuites calciques du RS via RyR2, interprétées comme une libération de Ca^{2+} . Ce mécanisme peut générer un nouveau PA s'il est important par la sortie de Ca^{2+} et l'entrée de Na^+ via l'échangeur NCX.

Les conditions favorisant l'apparition de DADs sont celles qui conduisent à un potentiel de membrane au repos plus positif qu'à la normale (intoxication digitalique ; réduction du courant I_{K1} (Fauconnier et al. (2005)), ainsi que celles responsables d'une surcharge calcique

(stimulation β -adrénergique), ou d'une fuite du RS (insuffisance cardiaque). Ces conditions apparaissent fréquemment lorsque le rythme cardiaque est rapide (Wit AL. and Rosen MR. (1992)).

Les DADS comme les EADs dépendantes du $[Ca^{2+}]_i$ ont des caractéristiques communes (Volders et al. (2000)) : la fuite spontanée de Ca^{2+} du RS. Si elle survient pendant un PA, elle est à l'origine d'une EAD dépendante du $[Ca^{2+}]_i$ et si elle intervient après la repolarisation cellulaire, elle déclenche une DAD.

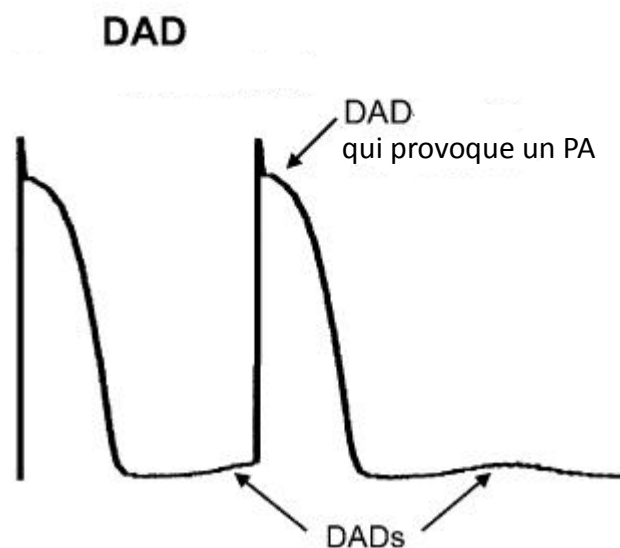


Figure 25 : Schéma d'une DAD. D'après Burashnikov and Antzelevitch (2006).

(d) LES SPARKS CALCIQUES (POUR REVUE : BERS (2014))

C'est en 1993 qu'a été identifié pour la première fois par mesure directe l'événement d'une fuite du RS : le *spark* calcique (H. Cheng, Lederer, and Cannell (1993)). C'est le plus remarquable et le plus connu des exemples de libération de Ca^{2+} du RS en diastole. La libération du Ca^{2+} du RS est localisée et spontanée, et l'on peut la voir à l'aide d'un microscope confocal (H. Cheng et al. (1993) ; H. Cheng and Lederer (2008)). Un « *spark* » calcique est une libération spontanée, localisée de Ca^{2+} du RS qui augmente la

$[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ au sein du cardiomyocyte (H. Cheng et al. (1993)). Le *spark* est une libération cohérente d'un cluster de RyR sans intervention du courant I_{CaL} .

La fréquence des *sparks* est directement liée à la probabilité d'ouverture (P_o) individuelle d'un RyR2 assujettie également à la $[Ca^{2+}]_i$ en diastole et également celle présente dans le RS ($[Ca^{2+}]_{libre\ et\ totale}$). La valeur de P_o pour un RyR2 donné en diastole est de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-4} , à tout moment il y a environ 100 RyR2 ouverts (sachant qu'un myocyte contient environ un million de RyR2). Pendant un *spark*, la quantité de Ca^{2+} libérée au niveau local est élevée car plusieurs canaux RyR2 à l'intérieur d'une jonction (6-20 RyRs) sont activés par CICR. Elle est comparable à celle impliquée dans le CEC et suit la même cinétique, excepté que les *sparks* sont par définition isolés dans le temps et confinés dans l'espace à une fente jonctionnelle ou couplon. Parfois la fuite n'est pas observée par le microscope confocal, il n'y a pas de *sparks*, mais cela ne veut pas dire qu'un RyR2 seul et plus isolé ne s'ouvre pas. Un *spark* dans une jonction peut activer un « *spark* calcique comme une libération » (Ca^{2+} *spark-like* release) dans les jonctions voisines (*macrosparks* ou mini-vagues) et ainsi créer une vague calcique dans toute la cellule à partir du CICR.

La fréquence des *sparks* est également associée à la charge calcique du RS : elle augmente lorsque la cellule est plus chargée en Ca^{2+} . A des $[Ca^{2+}]_{totale}$ du RS modérées, aucun *spark* n'est observé mais des événements de fuite du RS via RyR2 plus petits sont observés, des *quarks* calciques (Lipp and Niggli (1998) ; Brochet, Xie, Yang, Cheng, and Lederer (2011)) incapables de déclencher des *sparks*. Lorsque les $[Ca^{2+}]_{RS}$ et $[Ca^{2+}]_{RS\ totale}$ augmentent, la fréquence des *sparks* augmente de manière exponentielle.

Même si, par leur méthode de détection assez facile, les *sparks* calciques sont des indicateurs commodes et usuels pour la fuite calcique du RS, ils ne représentent qu'une partie de celle-ci.

(e) LES TROUBLES DE CONDUCTION

La conduction de l'influx cardiaque résulte de la propagation de l'activité électrique d'une cellule spécialisée à une autre et finalement aux cellules myocardiques elles-mêmes.

La principale anomalie de conduction de l'influx électrique est le phénomène de réentrée, ou excitation réentrante (Figure 26). A l'origine de la plupart des tachycardies, la réentrée ne peut se faire sans une zone de conduction lente : un bloc de conduction formé dans une direction par un ensemble de cellules myocardiques. L'onde de stimulation doit alors contourner lentement ce bloc, en période réfractaire absolue qui n'accepte donc pas de transmettre l'onde de stimulation. Il se produit alors une excitation anormale parce que rétrograde (en arrière). Elle revient ensuite par l'intermédiaire d'un parcours détourné, au point où elle avait été arrêtée. À partir de cet instant elle se propage dans un sens normal (antérograde) vers les fibres musculaires, non plus celles qui devaient se contracter au départ mais vers les fibres musculaires voisines qui elles sont sorties de la période réfractaire. On assiste alors au déclenchement d'une contraction, dite contraction prématurée, responsable du déclenchement d'extrasystoles pouvant mener à des tachycardies ou fibrillations.

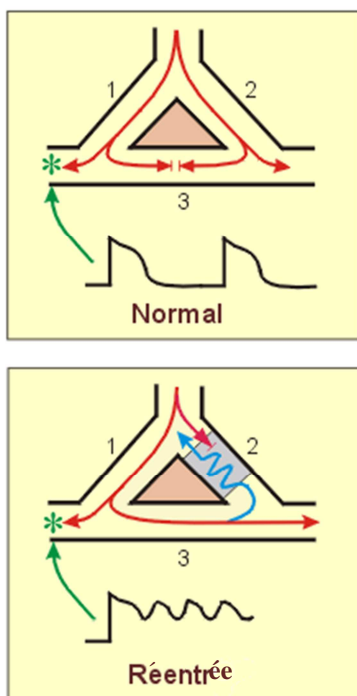


Figure 26 : Schéma du phénomène de réentrée. Modèle de réentrée

Dans un cœur normal (haut de la figure), si une fibre de Purkinje forme 2 branches (1 et 2), le PA va traverser chaque branche. Une électrode (*) positionnée à la fin de la branche 1 enregistre un PA normal conduit dans la branche 1 comme sa branche voisine. Si les branches 1 et 2 sont connectées par une branche commune (3), les PA traversant la branche 3 s'annuleraient. Si le phénomène de réentrée a lieu (bas de la figure), le bloc de conduction se trouve dans la branche 2. La conduction se fera par l'arrière dans le sens rétrograde (de la branche 3 vers la 2). Le PA passera donc de la branche 1 à la 3 pour atteindre dans le sens rétrograde la branche 2 (ligne bleue). Suivant la période où se trouvent les cellules du bloc le PA pourra rejoindre la branche 1 (cellules en période réfractaire relative) ou mourra (cellules toujours en période réfractaire absolue). Ainsi, le temps est un facteur critique pour permettre au PA de trouver des cellules excitables dans le bloc pour que le PA puisse se répandre. S'il y a ré-excitation du tissu, un cycle de stimulation à haute fréquence (tachyarythmie) se met en place et devient une source possible de PA qui peut se propager à une région du cœur (ventricule) ou au cœur entier (tachycardie).

Le bloc de conduction est multifactoriel et associé à de nombreuses combinaisons d'altérations : distribution et fonctions des canaux ioniques, dynamiques ioniques intracellulaires, innervation cardiaque, voies de signalisation et métaboliques aussi bien au niveau macroscopique que microscopique (pour revue : Cherry, Fenton, and Gilmour (2012)). Cette zone de conduction peut également avoir pour origine une altération morphologique, survenant le plus couramment lors du remodelage menant à un cœur insuffisant (cf partie I.4). La fibrose et la connexine 43 (Cx43) sont les deux facteurs le plus couramment cités. En effet, on observe fréquemment une modification de l'expression, de la phosphorylation ainsi que de la distribution de la Cx43 lors des modèles d'IC. Pour certaines études, ceci a des conséquences sur la propagation de l'onde d'excitation (Qu et al. (2009)) ou la survenue d'arythmies (O'Quinn, Palatinus, Harris, Hewett, and Gourdie (2011)) alors que pour d'autres malgré ce réarrangement de la Cx43 les plaques de fibrose présentes dans le cœur représentent le premier élément perturbateur de la conduction (Burstein et al. (2009)). Une équipe a récemment mis en évidence que la réduction de l'expression de la Cx43, dans un modèle murin, entraîne une augmentation de la fibrose par une activité accrue des fibroblastes (Jansen, van Veen, et al. (2012)). Ainsi la survenue de blocs de conduction est multifactorielle avec la possibilité que les facteurs interagissent les uns sur les autres. Ces troubles de la conduction peuvent être reliés à des modifications des canaux ioniques, comme le canal sodique $Na_v1.5$, partenaire de la Cx43 (Jansen, Noorman, et al. (2012)).

L'IC est une maladie qui s'installe progressivement en réponse à un stress et touche la structure cardiaque et/ou sa fonction (la réponse β -AR, les mouvements calciques, le CEC). Si ces modifications au départ permettent d'assurer la fonction cardiaque à un niveau homéostatique, sur le long terme elles deviennent des altérations pro-arythmogéniques. Il est donc important d'identifier les protéines pouvant retarder l'IC et ses arythmies.

III.4. ARYTHMIES ET PROTEINES DU CYCLE CALCIQUE

Les protéines du CRC, plus particulièrement RyR2 et ses protéines associées, sont le plus souvent liées à une pathologie particulière, la Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique (TVPC, *Catecholaminergic Polymorphism Ventricular Tachycardia*) (Figure 27). C'est une maladie génétique héréditaire touchant le rythme cardiaque. Elle se caractérise par des syncopes et des morts subites, en réponse à un stress intense (physique ou émotionnel), mettant en jeu les catécholamines par l'activation du système nerveux sympathique. Les arythmies provoquées sont responsables de la survenue de morts subites chez des individus de moins de 30 ans. C'est une maladie difficile à détecter : le cœur est structurellement sain et son activité électrique au repos, mesurée par l'ECG, est normale. Sa prévalence est estimée à 1/10 000 (N. Liu, Ruan, and Priori (2008)).

L'origine des arythmies dans la TVPC découlerait de DADs et de l'activité spontanée qu'elles peuvent provoquer. En effet, l'observation de Tachycardie Ventriculaire (TV) bidirectionnelle chez des patients souffrant de TVPC ressemble à des arythmies induites par le digitalis, qui inhibe la pompe Na^+/K^+ -ATPase et l'extrusion de Ca^{2+} (N. Liu, Rizzi, Boveri, and Priori (2009); Leenhardt et al. (1995)). Il est connu que ces arythmies provoquent une surcharge du RS en Ca^{2+} capable d'activer l'échangeur NCX, qui à son tour génère un courant entrant, appelé courant entrant transitoire I_{Tj} . Ce courant est la cause des DADs qui peuvent alors faire atteindre à la membrane le voltage suffisant pour activer les canaux sodiques et ainsi déclencher des battements anormaux. L'initiation d'arythmies par ce mécanisme est appelée « activité déclenchée » ou « *triggered activity* » (TA). Les TV bidirectionnelles, issues de la TA, seraient initiées dans les fibres de Purkinje et évolueraient alors en TV polymorphe. Si l'activation adrénergique persiste, les DADs atteindraient les cardiomyocytes ventriculaires et créeraient ainsi des TV « irrégulièrement irrégulières » qui progressivement accélèreraient et dégèneraient en Fibrillations Ventriculaires (FV).

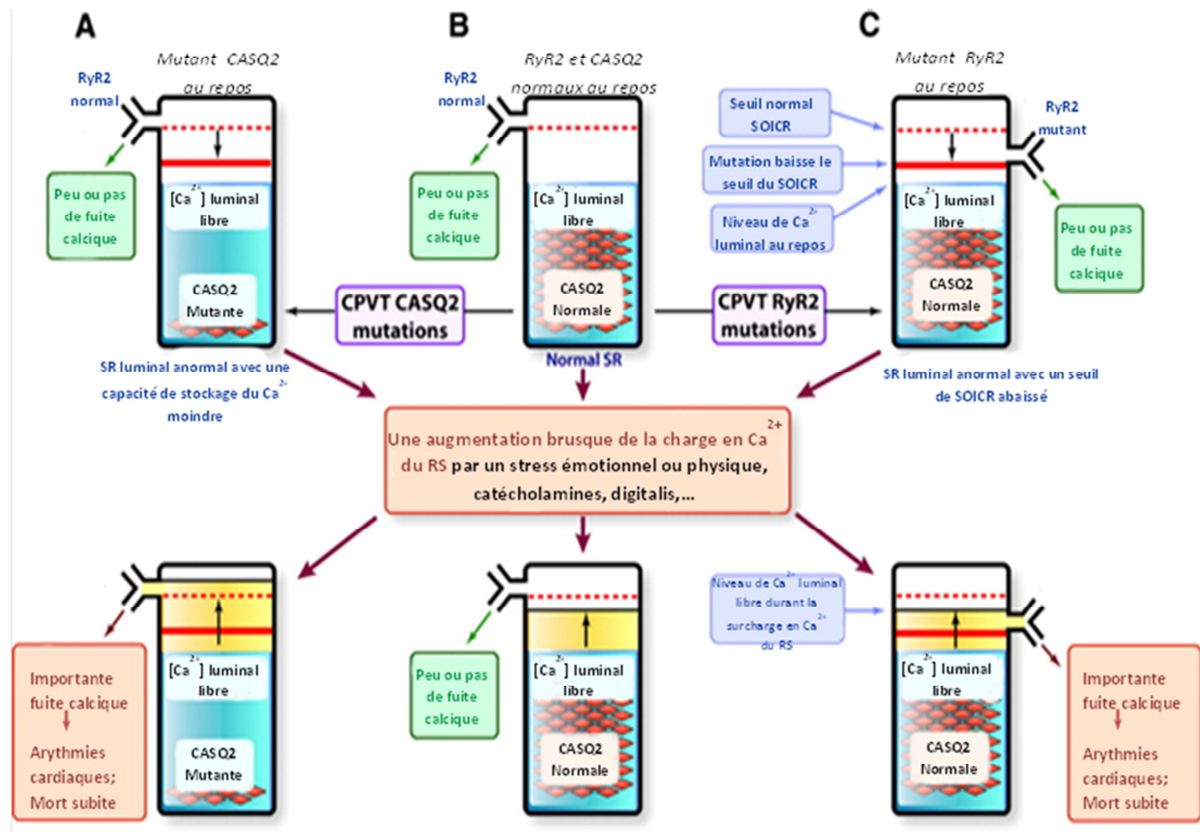


Figure 27 : Schéma des effets des mutations RyR2 et CSQ2 dans le cardiomyocyte. Modifiée d'après Priori and Chen (2011).

(a) RyR2

Le gène de RyR2 est le gène majoritairement associé à la TVPC (Cerrone et al. (2005)), plus de 70 mutations ont été répertoriés (<http://www.fsm.it/cardmoc/>). Quelques-unes ont fait l'objet d'investigations sur des modèles de souris transgéniques knock-in pour en élucider les mécanismes. En effet, il est impossible d'étudier un modèle KO du gène car il est létal au stade embryonnaire à 10 jours (Takeshima et al. (1998)). Néanmoins des battements cardiaques y ont été détectés. Les embryons présentent une malformation cardiaque sévère probablement à l'origine du décès. RyR2 est donc indispensable au développement cardiaque ainsi qu'à la mise en place d'un CEC durable. Sa surexpression n'a jamais été étudiée à ce jour.

Nombre des mutations liées à la TPVC provoquent une augmentation de la sensibilité du canal au Ca^{2+} luminal en abaissant le seuil de libération du Ca^{2+} du RS (MacLennan and Chen (2009)), entraînant une activation répétitive et prématurée de RyR2 (Figure 27). Ce phénomène arrive plus particulièrement lorsque le RS est surchargé, lors d'une stimulation β -adrénergique, et on parle alors de surcharge de stockage induisant une libération de Ca^{2+} , ou en anglais *SOICR* (Y. Liu et al. (2013)). D'autres touchent également à la sensibilité de la réponse de RyR2 au Ca^{2+} cytosolique ou les deux (Thomas, George, and Lai (2004)) avec au final le même résultat : une libération de Ca^{2+} du RS.

Un temps, gène candidat pour la dysplasie ventriculaire droite arythmogène humaine (DVDA) (Bauce et al. (2002) ; Tiso et al. (2001)), les modèles murins développés avec les mutations identifiées n'ont montré aucune prédisposition ni symptôme de cette maladie (Kannankeril et al. (2006)). Cette hypothèse est à revoir : une étude à déterminer que 9% des cas de ces DVDA pourraient être imputés à des mutations du gène de RyR2 (Roux-Buisson et al. (2014)).

D'autres pathologies cardiaques humaines ont été associées au gène de RyR2 : la mort subite du nourrisson (Tester et al. (2007)) qui reste à étudier dans un modèle animal, la fibrillation ventriculaire post-infarctus (Ran et al. (2010)) et confirmée chez le chien (Belevych et al. (2009)), une cardiomyopathie (Lorenzon and Beam (2008)). Des formes de QT long « atypiques » sont également liées à des mutations du gène RyR2 (Medeiros-Domingo et al. (2009)).

Il a également été étudié dans des modèles pathologiques chez le rat et la souris le rôle de RyR2. Chez des souris souffrant de dystrophie de Duchenne (DMD), l'augmentation de la sensibilité de RyR2 par oxydation précéderait et conduirait à la progression de la maladie (Kyrychenko et al. (2013)). Des modifications post-traductionnelles comme la nitrosylation seraient responsables de l'apparition de phénotypes pro-arythmiques (Gonzalez, Beigi, Treuer, and Hare (2007); Gonzalez, Treuer, Castellanos, Dulce, and Hare (2010)). RyR2 participe également au développement de l'hypertrophie cardiaque lors d'une surcharge de pression (TAC) (Zou et al. (2011)) ainsi qu'à la détérioration de la fonction cardiaque lors d'une ischémie-reperfusion (Tang et al. (2010)).

(b) CSQ2

La CSQ2 par son interaction avec la Trd/JNC se lie à RyR2 et le rend sensible au Ca^{2+} luminal du RS. La probabilité d'ouverture de RyR2 en diastole sera diminuée pour éviter d'être un substrat de déclenchement des DADs pouvant mener à des arythmies létales (Figure 25).

Actuellement, 20 mutations sur le gène de la CSQ2 ont été répertoriées pour être impliquées dans la TVPC. Contrairement aux mutations sur le gène RyR2, celles sur le gène de la CSQ2 sont transmises majoritairement sur un mode autosomique récessif avec des mutations homozygotes ou des cas de double hétérozygotie. Comme pour le gène de RyR2, les effets de ces mutations sont étudiés sur des modèles murins transgéniques. Contrairement au KO RyR2, il est possible d'étudier à l'âge adulte le KO CSQ2 (Knollmann et al. (2006)) qui présente le phénotype particulier de la TVPC sous l'effet de catécholamines. Mais ce modèle nous enseigne également que la calséquestrine n'est pas indispensable au stockage du Ca^{2+} dans le RS. Plusieurs modèles de surexpression ont été développés et ont montré une sévère hypertrophie et insuffisance cardiaque (Jones et al. (1998) ; Sato et al. (1998) ; W. Wang, Cleemann, Jones, and Morad (2000)). Dans un de ces modèles, malgré le développement d'une hypertrophie menant à une IC et une charge calcique du RS plus importante, il est observé moins de *sparks* et une fraction de Ca^{2+} libérée à chaque stimulation moins importante (Sato et al. (1998)).

Certaines mutations altèrent la liaison du Ca^{2+} à la CSQ entraînant une plasticité de conformation de la protéine plus réduite (Kirchhefer et al. (2010) ; Bal et al. (2010)) La capacité de stockage du Ca^{2+} dans le RS peut être également touchée et réduite par ces mutations (Terentyev et al. (2003)) (Figure 27). Comme d'autres perturbent directement la régulation de RyR2 en touchant à la liaison de RyR2 avec ses protéines régulatrices Trd et JNC qui ancrent la CSQ2 à RyR2 ((Viatchenko-Karpinski et al. (2004) ; Terentyev et al. (2006) ; di Barletta et al. (2006)).

Le gène CSQ2 serait impliqué dans le développement de cardiomyopathie hypertrophique (Landstrom and Ackerman (2012)) mais il reste encore à le démontrer avec

un modèle animal. Comme pour RyR2, des modifications post-traductionnelles sur la calséquestrine comme la glycosylation participeraient au développement de l'IC (Jacob et al. (2013) ; Kiarash et al. (2004)). L'expression de la protéine est sujette à controverse lors de l'insuffisance cardiaque, inchangée (Knollmann (2009)) ou baissée (Hu et al. (2011)).

(c) HRC (POUR REVUE : ARVANITIS, VAFIADAKI, SANOUDOU, AND KRANIAS (2011))

Comme la CSQ2, l'*histidine-rich Ca²⁺-binding protein* (HRC), 165 kDa, est capable de lier le Ca²⁺ avec une grande capacité mais une faible affinité. L'HRC est capable de se lier à la Trd et SERCA2a. La liaison entre l'HRC et la Trd est sensible au Ca²⁺, la constante de liaison est la plus élevée à des [Ca²⁺] modérées, similaires à la [Ca²⁺]_{RS} physiologique (Arvanitis et al. (2007) ; Lee, Kang, Kim, and Park (2001) ; Sacchetto, Damiani, Turcato, Nori, and Margreth (2001)). Elle est rompue lorsque cette [Ca²⁺]_{RS} physiologique est modifiée. L'HRC est capable également de se lier à SERCA2a. Des études *in vivo* restent à entreprendre pour déterminer le rôle exact de la liaison entre la Trd/HRC et SERCA2a/HRC et leur implication dans la libération et le recaptage de Ca²⁺ du RS.

Dès 1995, l'équipe de de Meeus A. a relié le gène de la HRC à une maladie cardiaque de conduction isolée (de Meeus et al. (1995)). Un polymorphisme de ce même gène semblerait participer à la survenue d'arythmies chez des patients souffrant de cardiomyopathies dilatées et de morts subites (Arvanitis et al. (2008)). Hypothèse confirmée trois ans plus tard lorsque cette mutation a été surexprimée dans des cardiomyocytes de rats adultes (Han et al. (2011)). Comme de nombreuses protéines du CRC, l'altération de la fonction cardiaque par l'IC s'accompagne d'une baisse de l'expression de l'HRC chez l'homme comme dans de nombreux modèles animaux d'IC (G. C. Fan, Gregory, Zhao, Park, and Kranias (2004) ; Gupta et al. (2009)). Le KO HRC ne présente pas de phénotype cardiaque particulier de base mais développe une hypertrophie élevée sous l'effet d'isoprotérénol (Jaehrig, Heidt, Greene, Cornelissen, and Black (2006)). Le modèle de surexpression de la HRC conduit avec l'âge et une surcharge de pression au développement d'une IC (Gregory et al. (2006)) tout en étant cardioprotecteur dans l'ischémie-reperfusion (Zhou et al. (2007)).

(d) JNC

Protéine transmembranaire du RS, homologue de la triadine (60%), la junctine (26 kDa) se lie à la CSQ2, RyR2 et la Trd. A ce jour, elle n'est retrouvée que dans les muscles squelettiques et cardiaques car sous la dépendance d'un promoteur tissu spécifique du muscle strié et du cœur (Jones, Zhang, Sanborn, Jorgensen, and Kelley (1995) ; Treves, Feriotto, Moccagatta, Gambari, and Zorzato (2000)).

Le gène ASPH codant pour la junctine (JNC) a fait l'objet d'investigations pour connaître son implication dans des formes rares de TVPC (Roux-Buisson et al. (2012)) sans résultat jusqu'alors. Il a été remarqué que son expression lors de l'IC humaine est presque inexistante (Gergs et al. (2007)) ainsi que dans l'IC murine (Gergs et al. (2007)). D'un autre côté, la JNC se retrouve surexprimée dans des cardiomyocytes de rats diabétiques (Yildirim, Akman, Catalucci, and Turan (2013)) montrant son implication dans le développement de la cardiomyopathie diabétique. Il était donc nécessaire d'étudier des modèles transgéniques pour identifier l'impact de cette protéine dans le développement des maladies cardiovasculaires. Il a été remarqué dans les modèles KO l'absence de remodelage cardiaque malgré une mortalité prématurée d'un quart des souris et un phénotype arythmique avec des DADs et des blocs atrio-ventriculaires (Yuan et al. (2007)). Le même KO a démontré son implication dans les lésions après une ischémie-reperfusion cardiaque (Cai et al. (2012)). La surexpression de la JNC dans le cœur chez la souris entraîne des modifications structurales du RS : une réduction de l'épaisseur des citernes terminales, une densité plus importante de la CSQ2 aux pieds de RyR2, une augmentation des contacts entre les citernes terminales et les tubules-T (S. Gyorke and Terentyev (2008) ; L. Zhang, Franzini-Armstrong, Ramesh, and Jones (2001)).

Suivant les modèles de surexpression de la JNC, ses effets sont discutés. Alors que Kirchhefer et al. (2006) trouve que ce modèle aurait un effet cardio-protecteur pour la fonction cardiaque, celui de C. S. Hong et al. (2002) présente une hypertrophie cardiaque s'accompagnant d'une insuffisance cardiaque et d'une bradycardie. D'après la plupart de ces modèles, la JNC participerait à un mécanisme adaptatif mis en place par le cœur dans des

conditions de stress et pourrait également avoir un rôle dans la structuration du RS dans les cardiomyocytes.

D'autres protéines du CRC ont été sondées pour caractériser des formes rares de TVPC.

A ce jour, aucun variant du gène de la calstabine 2 ou FKBP12.6 (FKBP1B) n'a pu être relié au développement d'une cardiomyopathie dilatée même si on a retrouvé dans un modèle canin une augmentation de son expression dans la même pathologie (Oyama, Chittur, and Reynolds (2009)). L'expression de la protéine est constante (Hasenfuss and Pieske (2002)) ou abaissée (Feng, Tang, Dai, and Dai (2007) ; Y. S. Cheng, Dai, and Dai (2009)) lors de l'IC. Son efficacité à lutter contre les fuites calciques via RyR2 est sujette à discussion pour de nombreuses équipes. En utilisant un KO calstabine 2, Lehnart et al. (2006) pensent qu'elle est à l'origine des arythmies cardiaques alors que dans des modèles de TVPC les arythmies provoquées n'ont aucun lien avec la calstabine 2 (Xu et al. (2010)). Sa surexpression est insuffisante pour lutter contre la survenue des sparks dans le remodelage post-IM (Bito et al. (2013)) alors que de base elle réduit leur fréquence (Gellen et al. (2008)), laissant penser que d'autres mécanismes dans ce modèle sont impliqués dans la survenue des *sparks*.

Une autre protéine partenaire de RyR2, la sorcine, est capable de lier le Ca^{2+} . Un polymorphisme naturel (L112) est présent chez l'Homme. Ce variant est un candidat pour des maladies génétiques d'hypertrophie cardiaque et d'hypertension. Exprimé dans un modèle murin de surexpression, il provoque le développement d'une hypertrophie dilatée avec une fonction préservée (Collis et al. (2007)). D'autres facteurs doivent être additionnés au variant de la sorcine pour expliquer le développement de l'hypertrophie et l'hypertension.

Nous allons aborder dans la partie suivante le cas de la triadine.

(e) TRIADINE

Protéine transmembranaire du RS, la triadine (Trd) appartient au complexe de libération du Ca^{2+} . Elle participe ainsi au CEC dans les myocytes cardiaques et squelettiques

(S. Gyorke and Terentyev (2008) ; Knollmann (2009) ; Marty et al. (2009) ; Peng, Fan, Kirley, Caswell, and Schwartz (1994) ; Perez (2011)).

Identifiée pour la 1^{ère} fois dans le muscle squelettique (Caswell, Brandt, Brunschwig, and Purkerson (1991)), la triadine tient son nom de sa localisation particulière au niveau de la triade. La triade est composée de deux sacs du RSj entourant un tubule-T. La Trd se trouve au niveau de la membrane du RSj. Elle fut ensuite retrouvée dans le cœur au sein des dyades (complexe tubule-T/RSj) (Brandt et al. (1993)). Elle est également exprimée dans l'hippocampe du cerveau murin (C. Li, Dong, Wang, and Hu (2011)). Au vu de ses partenaires (RyR, CSQ, HRC), il y a de fortes probabilités dans le futur que l'on retrouve la Trd au niveau d'autres organes.

Transmembranaire, avec une extrémité N-terminale cytosolique très courte (47 acides aminés) et un domaine transmembranaire composé d'une hélice (résidus 48 à 68), la triadine possède une grande extrémité C-terminale luminale de longueur différente suivant son isoforme (Peng et al. (1994)) (Figure 28). Ces différentes isoformes sont issues d'un gène unique par un épissage alternatif et spécifique d'un tissu (Thevenon et al. (2003)). Elle peut subir des post-modifications comme des phosphorylations (en N et C-terminal sites probables) et glycosylations (C-terminal sur l'arginine 75) (H. Fan, Brandt, and Caswell (1995)). Au total il existe 4 isoformes : Trisk 32 ou Cardiac Triadin isoforme 1 (CT1), Trisk 49, Trisk 51 et Trisk 95. L'isoforme cardiaque est CT1, d'une taille de 35 et 40 kDa (forme glycosylée pour la dernière taille). Dans le muscle squelettique, les isoformes Trisk 95 et 51 interagissent avec le récepteur de la ryanodine squelettique (RyR1) (Vassilopoulos et al. (2005)).

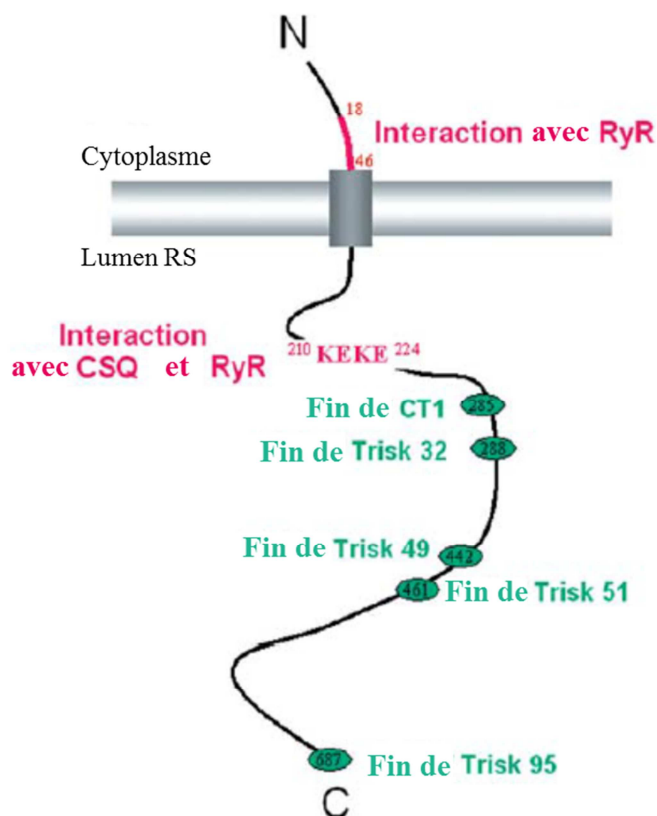


Figure 28 : Structure des isoformes de la triadine. Les quatre isoformes squelettiques (Trisk32, Trisk 49, Trisk 51 et Trisk 95) et l'isoforme cardiaque (CT1). La numérotation des acides aminés permet de délimiter des zones d'interaction (en rose), les extrémités des isoformes (vert). D'après Marty (2004).

Une répétition du motif « KEKE », entre les acides aminés 200 et 224, dans le lumen du RS, permet à la triadine d'interagir avec RyR2, CSQ2 et la JNC (W. Guo and Campbell (1995)) mais également à HRC (Lee et al. (2001)), dans le muscle squelettique et le cœur. Elle n'est pas la seule à pouvoir se lier à RyR2 ou CSQ2, la junctine (JNC) également. Ce même motif sert à la JNC pour se lier à RyR2 et CSQ2 (Jones et al. (1995)).

La CT1 possède une seule cystéine dans sa chaîne d'acides aminés, l'empêchant de se polymériser comme dans le muscle squelettique (H. Fan et al. (1995)). A ce jour, aucun site de phosphorylation de la CaMKII n'a été mis en évidence sur l'isoforme cardiaque alors qu'il est présent sur l'isoforme squelettique (Damiani, Picello, Saggin, and Margreth (1995)).

Par sa localisation et ses capacités de liaison à de nombreuses protéines, la triadine a un rôle-clé au sein du myocyte.

(i) DANS LA STRUCTURE

In vitro, dans un modèle de lignée cellulaire Cos-7, l'infection par un adénovirus d'une isoforme de la triadine du muscle squelettique, Trisk95, conduit à des modifications des membranes du réticulum endoplasmique qui se structurent comme des cordes (« rope-like structures »), associées à une désorganisation du réseau des microtubules. Celle-ci est possible par la formation de ponts disulfures entre les Trisk95 car elles possèdent 2 cystéines dans leur séquence contrairement à l'isoforme cardiaque qui n'en a qu'une (Fourest-Lieuvin et al. (2012)). La surexpression par un adénovirus de l'isoforme principale du muscle squelettique (Trisk95) dans des myocytes néonataux de souris altère la morphologie des fibres musculaires, la forme des cellules, et augmente la fibrose lorsque la surexpression est au niveau du muscle squelettique (Vassilopoulos et al. (2010)). *In vivo*, l'observation des EDL (extensor digitorum longus) dans le modèle KO pour le gène de la triadine du Dr. Marty montre une mauvaise orientation des triades aux tubules-T (1/4 en longitudinale au lieu de transversale) (Oddoux et al. (2009)). Dans leur modèle KO, l'équipe de Pérez retrouve aussi une mauvaise orientation de la triade en longitudinale dans les EDL comme dans les muscles sterno-cléido-mastoïdiens (Shen et al. (2007) ; Oddoux et al. (2009)). Dans les deux modèles KO Trd de Pérez et de Marty (Shen et al. (2007) ; Oddoux et al. (2009)), les citernes du réticulum sarcoplasmique jonctionnel (RSj) voient leur volume diminué. Le contenu luminal du RSj est modifié dans les muscles sterno-cléido-mastoïdiens avec un mauvais rattachement de la CSQ2 au RSj pour le modèle KO de Pérez (Shen et al. (2007)).

Dans le cœur, *in vivo*, la surexpression de CT1 dans les oreillettes ou le cœur entier entraîne une désorganisation des myofilaments et mitochondries (Kirchhefer et al. (2002) ; Kirchhefer et al. (2001)). Dans un autre modèle de surexpression de la triadine dans le cœur, la largeur des vésicules du RSj est réduite (Kucerova et al. (2012)). De même, on observe dans le modèle KO de Pérez utilisé par Chopra et al., une réduction des jonctions entre RyR2 et les tubules-T et celles entre RyR2 et les LTCC (Chopra et al. (2009)).

Que ce soit au niveau du cœur ou du muscle squelettique, la triadine participe en partie à la structuration des éléments indispensables à un bon CEC (dyades, myofilaments, mitochondries).

(ii) DANS LE CEC

La triadine est l'une des protéines transmembranaires responsables de l'ancrage de la calséquestrine sur la face jonctionnelle du RS. Elle va permettre la liaison entre la CSQ2 et RyR2 à ce niveau. Elle facilite alors indirectement la libération du Ca^{2+} via RyR2 en permettant à la CSQ2 d'être proche des sites de libération du Ca^{2+} tout en le liant (L. Zhang, Kelley, Schmeisser, Kobayashi, and Jones (1997) ; Kobayashi, Alseikhan, and Jones (2000)). Elle pourrait également avoir un contrôle direct sur l'activation et l'ouverture de RyR2 et influencer les transitoires calciques, la charge en Ca^{2+} du RS et la survenue de sparks. En introduisant Trisk95, du côté cytoplasmique d'un RyR incorporé dans une bicouche lipidique l'ouverture du canal se retrouve inhibée (Ohkura et al. (1998)) alors que si dans le même type de modèle l'isoforme CT1 est introduite on observe une activation de l'ouverture de RyR (I. Gyorke et al. (2004)). Pour s'affranchir de ce modèle *in vitro* assez loin d'un modèle vivant, des études ont été menées sur différents types cellulaires (en lignée ou en culture primaire) pour déterminer le rôle exact de la triadine dans le CEC.

Dans une lignée cellulaire (C2C12) de myoblastes de muscles squelettiques de rat, la surexpression de Trisk 95 par un adénovirus a peu de conséquences sur le CEC. Lorsque la seule source de Ca^{2+} de la cellule est celle de la cellule avec le RS alors le transitoire est plus faible (Fodor et al. (2008)). Sur le même type cellulaire, l'extinction de Trisk 95 par un siRNA via un AAV n'a aucune incidence sur le CEC (Y. Wang et al. (2009)). Ce modèle a ses limites : la structure est éloignée de la structure d'un myocyte squelettique, l'expression de Trisk 95 est transitoire, l'extinction ou la surexpression sont peut-être insuffisantes pour avoir des effets et montrer l'influence de la triadine sur l'homéostasie calcique.

Dans une autre lignée cellulaire (L6.G8), des myoblastes de muscle squelettique de rat, la surexpression de Trisk32 permet une colocalisation avec IP_3 (Phosphatidyl Inositol 4,5 biphosphate) et une régulation de l'homéostasie calcique en augmentant la libération de Ca^{2+} par IP_3 grâce au traitement par de la vasopressine et de la bradykinine qui augmentent la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Vassilopoulos et al. (2005) ; Fodor et al. (2008)).

Au sein de cellules néonatales de muscle squelettique de rat, la surexpression de Trisk 95 bloque le CEC en supprimant le transitoire calcique par l'inhibition de l'ouverture de RyR1 (Rezgui et al. (2005); Fodor et al. (2008)). Avec le même modèle et en inhibant Trisk95 par un shARN aucune incidence sur le CEC n'est observée mais il y a des conséquences sur l'homéostasie calcique : une baisse du transitoire, de la charge du RS et une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fodor et al. (2008)). Chez la souris, avec le même type cellulaire, la surexpression de Trisk 95 baisse l'amplitude et la fréquence du transitoire calcique sans pour autant supprimer le CEC (Fodor et al. (2008)). En utilisant des cellules néonatales de souris dyspédiques et en y incorporant un RyR1 perdant son domaine de liaison à la Trd, on assiste à une altération des signaux orthogrades (voltage-gated SR Ca^{2+} release) et rétrogrades du CEC dans la cellule (Goonasekera et al. (2007)).

Le KO Trd murin entraîne une interruption de la liaison RyR-FKBP12 dans les cellules adultes du muscle squelettique, rétablie en partie en surexprimant FKBP12.6 (Eltit et al. (2010); Eltit, Szpyt, Li, Allen, and Perez (2011)). L'implication de la triadine sur le CEC est établie dans les deux modèles KO de Pérez et Marty : le KO de Marty développe une force moins importante résultant de transitoires calciques d'amplitudes diminuées comparativement aux WT et dans le modèle KO de Pérez, il est observé un signal orthograde affaibli, rétabli par la surexpression de FKBP12.6. Les études sur ces deux modèles KO remarquent un CEC normal malgré une charge du RS et un transitoire calcique plus petit (Eltit et al. (2010); Eltit et al. (2011) ; Oddoux et al. (2009)). Il serait opportun de signifier que la perte de la liaison RyR1-Trd-CSQ est importante pour l'homéostasie calcique (Shen et al. (2007) ; Boncompagni et al. (2012); Eltit et al. (2010) ; Oddoux et al. (2009)) mais aussi pour le CEC (Oddoux et al. (2009) ; Boncompagni et al. (2012)).

En effet, dans deux modèles murins de surexpression de CT1 dans le cœur, l'homéostasie calcique (transitoire calcique, $[Ca^{2+}]$ diastolique) dans le myocyte ventriculaire isolé est prolongée pour le premier et augmentée pour le second paramètre. Leur contraction est également déprimée (Kirchhefer et al. (2002) ; Kirchhefer et al. (2001)). A l'opposé, dans un modèle de surexpression de CT1 dans des cardiomyocytes de rats adultes, la surexpression augmente l'activation de RyR2 et donc la survenue d'événements arythmogènes comparables à ceux observés dans des myocytes exprimant des mutations du gène de la CSQ2, responsable de CPVT (Terentyev et al. (2005)). L'équipe de Kirchhefer et al., un an

auparavant, a également observé que cette surexpression dans des myocytes atriaux entraîne une altération de la réponse β -adrénergique par une désensibilisation plus importante des β -AR ainsi qu'une phosphorylation du PLB sur la Thr 17 modifiée (Kirchhefer et al. (2004)).

Toujours en isolant les cardiomyocytes ventriculaires mais dans le modèle KO de Pérez, le CEC est affecté au niveau de ses propriétés calciques (amplitude du transitoire calcique et recaptage du Ca^{2+} ; courant I_{CaL} ; charge RS ;...)(Chopra et al. (2009)). La stimulation β -adrénergique permet pour ce même modèle d'observer des sparks *in vitro* et des arythmies ventriculaires *in vivo*, confortant l'idée d'une mauvaise homéostasie calcique dans ce modèle.

Malgré de nombreuses études, la fonction de la triadine dans le CEC comme l'homéostasie calcique reste un sujet à approfondir. Il est vrai que ses effets inhibiteurs sur ces deux processus sont retrouvés dans des modèles de surexpression ou d'extinction du gène TRDN dans le cœur ou le muscle squelettique. Ainsi, quel que soit le modèle utilisé, il semble qu'une bonne stœchiométrie de CT1 dans le complexe de RyR2 est indispensable à un bon CEC (Rezgui et al. (2005) ; Kucerova et al. (2012)).

Dans un panel de 97 patients souffrants de TVPC sans mutations RyR2 et CSQ2, trois mutations ont été identifiées sur le gène TRDN, localisé sur le chromosome 6 (Thevenon et al. (2003)). Elles ont pour conséquence de faire de ces patients des cas humains naturels de KO CT1 (Roux-Buisson et al. (2012)).

Le modèle murin de KO CT1 de Pérez déclenche *in vivo* des extrasystoles et tachycardies ventriculaires sous catécholamines (isoprotérénol) mais ce phénotype de TVPC n'est pas aussi marqué que dans les cas de modèles murins de KO de la CSQ et/ou portant des mutations de RyR2 (Chopra et al. (2009)). Ce même modèle de KO pour CT1 démontre son implication dans les lésions après une ischémie-reperfusion cardiaque (Cai et al. (2012)).

Alors que sa protéine homologue, la JNC, se retrouve surexprimée dans des cardiomyocytes de rats diabétiques aucune modification significative de l'expression de CT1 n'a été observé (Yildirim et al. (2013)). Face à la nouveauté de cette étude, l'importance de CT1 dans le développement de la cardiomyopathie diabétique n'est peut-être pas à exclure

car il a été remarqué dans un modèle canin et un autre type de cardiomyopathie dilatée, une baisse de son expression (Oyama et al. (2009)).

D'après cette revue bibliographique, la triadine par son interaction avec RyR2 et la HRC, participe à l'homéostasie calcique au sein du cardiomyocyte lors du CEC. Elle contribue également à la formation des structures où a lieu ce même mécanisme. Si le rôle des protéines du complexe RyR2 a été étudié dans le développement de l'hypertrophie cardiaque, la dysfonction contractile et/ou des arythmies associées à l'IC, celui de la triadine reste à approfondir.

CONTEXTE EXPERIMENTAL

II.1.1.PROBLEMATIQUE

Comme décrit dans l'introduction, si de nombreuses protéines du CRC ont été étudiées dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et de la transition vers l'IC, le rôle de la triadine reste à élucider. Dans ces études, les modèles présentent soit une augmentation de l'expression de la triadine (Jaehnig (2006) ; Kirchhefer et al. (2004)) soit une diminution (Denegri et al. (2012) ; Valle, Boncompagni, Sacchetto, Protasi, and Volpe (2014)). Dans des modèles d'IC, les données actuelles montrent que son niveau d'expression est diminué (Oyama et al. (2009) ; Gergs et al. (2007)).

Dans ce contexte, mon projet de thèse a utilisé un modèle murin de délétion, knock-out (KO) pour le gène de la triadine (TRDN) donné par le Dr. Isabelle Marty pour identifier son rôle dans les mécanismes du remodelage cardiaque et ses conséquences sur la fonction cardiaque dans la transition vers l'IC.

II.1.2.OBJECTIFS

Pour ce faire, mon projet s'est articulé autour de deux axes de recherche :

1. Définir l'implication de la triadine au cours du développement de l'HVG. A cet effet, nous avons utilisé un modèle de surcharge de pression et un modèle de diffusion chronique de catécholamines dans un modèle de knock-out (KO) pour le gène de la triadine. Nous avons recherché si la triadine était à l'initiation du processus d'hypertrophie et son impact dans la transition vers l'IC, en analysant la fonction cardiaque.
2. Définir l'implication de la triadine au cours de l'IC chronique ischémique. A l'aide du même modèle murin avec un infarctus du myocarde (IM) au niveau du VG, nous avons cherché à déterminer quel était le rôle de la triadine dans les mécanismes mis en jeu dans le remodelage post-ischémique cardiaque, aux niveaux structurel et fonctionnel.

METHODES EXPERIMENTALES

III.I. MODELES ANIMAUX ET CELLULAIRES

III.I.1.SOURIS KNOCK-OUT (KO) POUR LE GENE DE LA TRIADINE (TRDN)

La lignée de modèle murin dont le gène de la triadine a été invalidé (KO Trd), a été réalisée à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France), sur fond génétique C57BL/6J. Ce projet de modèle KO Trd est à l'initiative du Docteur Isabelle Marty (Oddoux et al. (2009)). L'invalidation du gène se fait grâce au système Cre-LoxP. La présence de 2 sites LoxP autour de l'exon 1 du gène de la triadine (flox mice), permet l'excision du fragment en présence de la Cre recombinase (cytomegalovirus Cre^{+/+} mice) et l'obtention de la lignée KO (Figure 29). Les souris KO Trd seront notées KO par la suite si elles portent les deux allèles KO et WT pour celles qui portent les allèles WT. Cette lignée KO Trd, donnée par le Dr. Isabelle Marty, va nous permettre d'étudier l'effet de l'absence de la triadine dans la mise en place d'une hypertrophie du VG par une surcharge de pression (TAC) ou une diffusion chronique de catécholamines ainsi que dans le remodelage cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde (IM).

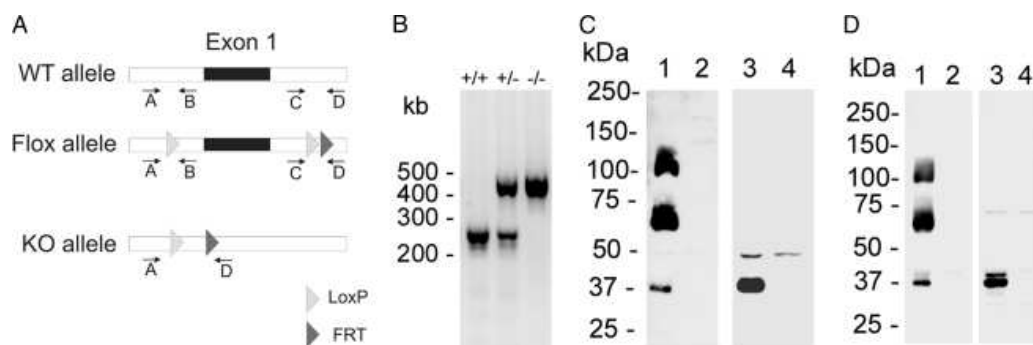


Figure 29 : Caractérisation du modèle murin de knock-out total de la triadine. (Oddoux et al. (2009)). **A.** Représentation schématique des allèles WT floxés et KO et du positionnement des primers utilisés pour la PCR d'amplification. **B.** PCR d'amplification de l'ADN avec un mélange de primers A, C, et D. La bande de 240pb correspond aux animaux WT (+/+, primers C et D), la bande de 477 pb est caractéristique des animaux KO (-/-, primers A et D), et les deux sont retrouvées chez les animaux hétérozygotes (+/-). **C et D.** Western blot : révélation de la présence de la triadine dans du muscle squelettique WT (ligne 1), du muscle squelettique KO (ligne 2), du cœur WT (ligne 3), et du cœur KO (ligne 4) par un anticorps reconnaissant la partie N-terminale des différentes isoformes de triadine (**C**) et par un mélange d'anticorps reconnaissant les différentes isoformes de la triadine (**D**). Les signaux correspondants à Trisk 95 (100 kDa), Trisk 51 (60 kDa), et Trisk 32 (37 kDa) sont absents dans les muscles KO (squelettique and cardiaque).

III.1.2. LA STENOSE DE L'AOORTE ASCENDANTE (TAC) CHEZ LA SOURIS

Agé de 8 à 12 semaines, l'animal, la souris mâle KO Trd, est anesthésié avec de l'isoflurane (2% + O₂) sous ventilation. Une thoracotomie permet de dégager l'aorte ascendante. L'aorte est rétrécie entre les deux carotides par une ligature sur un guide calibré (aiguille 26G) (Figure 30). Après évacuation du pneumothorax, le thorax est refermé. Le taux de survie, après cette intervention chirurgicale, dépend du rôle du gène délété dans le remodelage cardiaque. Il est de 87% chez les souris WT et diminue à 64% chez les souris KO (**, $p \leq 0.01$ versus WT, test Mantel-Cox, Figure 31).



Figure 30 : Schéma d'une sténose de l'aorte ascendante (TAC). D'après van Rooij and Olson (2007)

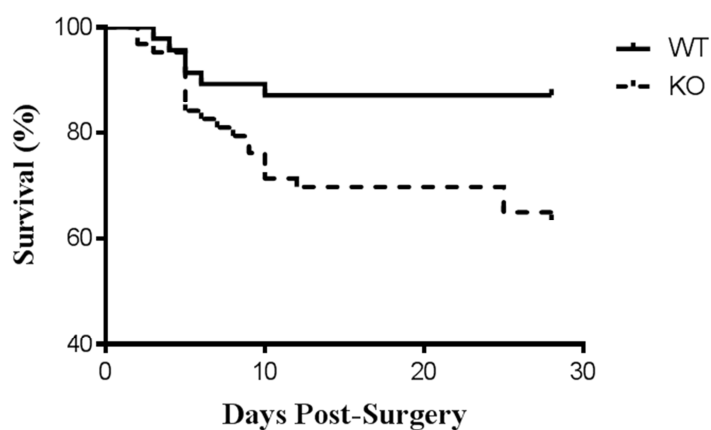


Figure 31 : Représentation graphique du taux de survie des souris WT et KO Trd après une TAC.

III.1.3. L'INFARCTUS DU MYOCARDE CHEZ LA SOURIS

Agé de 8 à 12 semaines, l'animal, la souris mâle KO Trd, est anesthésié avec de la Xylazine (10 µg/g) et Kétamine (100 µg/g) et ensuite ventilé. Une thoracotomie permet de dégager le cœur. L'infarctus du myocarde est réalisé par une ligature de la coronaire gauche (Figure 32). Après évacuation du pneumothorax, le thorax est refermé.

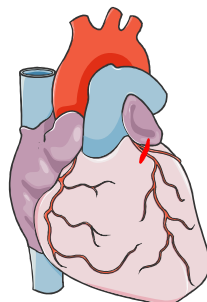


Figure 32 : Schéma de la ligature de la coronaire gauche du myocarde ou IM.

Quel que soient l'étude et les souris opérées, un groupe d'animaux témoins ou Sham subit la même procédure expérimentale sans mise en place de la ligature.

VII.1.4. DIFFUSION DE CATECHOLAMINES EN SOUS-CUTANEE PAR MINI-POMPE OSMOTIQUE

Après anesthésie sous isoflurane (2% + O₂) avec ventilation, une incision de la peau est réalisée au niveau des lombaires. Les plans tissulaires sont dissociés. La mini-pompe osmotique Alzet Model 2004®(Durect, CA, Etats-Unis), préalablement équilibrée 24h, est glissée en sous-cutanée et la peau est suturée. Les animaux « contrôles » auront une mini-pompe infusant du sérum physiologique. L'administration chronique de l'agoniste des récepteurs β-adrénergique, l'isoprotérénol, permet de mimer l'activation adrénergique prolongée symptomatique des maladies cardiovasculaires. La dose d'isoprotérénol est de 30mg.kg-1.jour-1 pendant 28 jours (Buitrago et al. (2005)).

III.1.5. LA PRODUCTION DU VIRUS AAV9 RECOMBINANT POUR LA TRIADINE ET SA TRANSDUCTION *IN VIVO*

En premier lieu, les ADN codant pour la triadine cardiaque sauvage du rat (CT1) sont sous clonés dans le plasmide pZac2.1. A partir de ce plasmide, les virus AAV9 contenant l'ADNc de CT1 de rat sauvage sont produits par la société Penn Vector Core (Philadelphia, Etats-Unis). Le transgène est sous le contrôle d'un promoteur CMV. Le virus AAV9 a été choisi pour le tropisme cardiaque de ce sérotype. Ce projet et la construction de ce virus AAV9 est à l'initiative du Dr. Isabelle Marty (Roux-Buisson et al. (2012)). Le Dr. Isabelle Marty nous a donné ce virus recombinant pour réaliser l'expérience suivante (Figure 33).

Le modèle murin utilisé pour les expériences de transduction est la souris mâle KO Trd. Avant l'injection, la souris KO Trd est anesthésié avec de l'isoflurane (2% + O₂). Le génome viral est injecté en une seule fois par voie intraveineuse rétro-orbitale à une charge virale approximative de 2×10^{11} particules virales.

L'expérience suit la cinétique suivante :

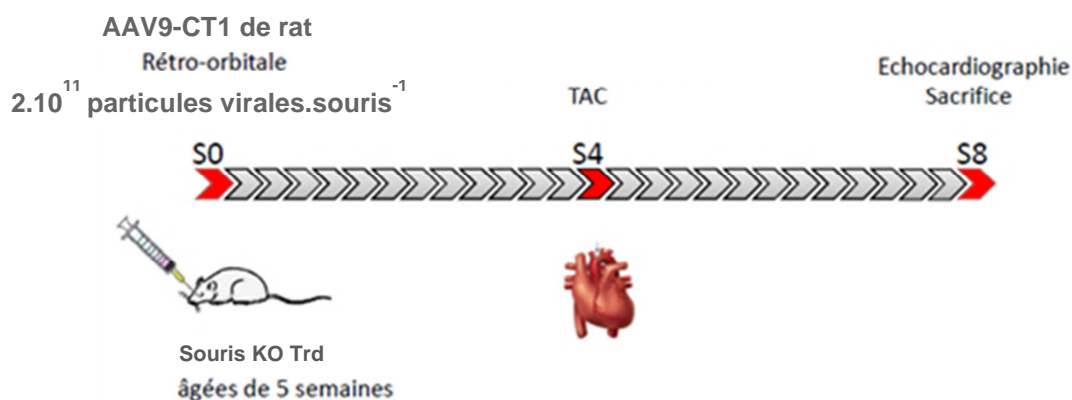


Figure 33 : Schéma de la transduction AAV9 –CT1 *in vivo* et des expériences en fonction du temps. S : semaine.

III.I.6. CARDIOMYOCYTES ISOLÉS DE SOURIS ADULTES

Les animaux utilisés pour cette expérience, les souris KO et WT Sham et opérées, sont âgés de 12 à 16 semaines, c'est-à-dire 4 semaines après l'opération. L'animal est sacrifié par dislocation. Le cœur est rapidement excisé et canulé à un système de Langendorff. Il est perfusé de manière rétrograde à 37°C pendant 5 minutes avec une solution de Tyrode modifiée (NaCl 117 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 0,625 mM, MgSO₄ 0,66 mM, NaHCO₃ 22 mM, HEPES 99.5% 10 mM, Taurine 30 mM, Glucose 5,6 mM, BDM 10 mM pH = 7.46) pour laver le cœur de toutes traces de sang. Ensuite, nous ajoutons à la solution un mélange d'enzymes (Collagenase Worthington de type 2 (248 u/mg) à 1mg/ml + Protéase de type XIV à 0.05mg/ml (Sigma, P5147)) pour digérer le cœur. Les cardiomyocytes isolés sont récupérés dans la solution Tyrode à laquelle nous ajoutons du SVF pour stopper la digestion. Ensuite on ajoute par étape du CaCl₂ pour arriver à une concentration finale de [Ca²⁺] = 1 mM. Les cellules sont ensuite stockées à température ambiante dans la solution initiale de perfusion si utilisées dans la journée ou lavées au PBS, centrifugées et congelées au -80°C pour des analyses biochimiques (WB, PCR, ...).

III.I.7. BIOPSIES HUMAINES DE VENTRICULE GAUCHE

Les biopsies humaines ont été données par le docteur Maack. Les caractéristiques des patients (patients sains ou NF : *nonfailing*, cœurs explantés mais non transplantés ; patients présentant une cardiopathie dilatée non ischémique ou DCM) qui ont consenti à donner ces biopsies sont décrites dans le tableau suivant (Tableau 1).

	NF	DCM
Nombre de patients (n)	8	8
Homme/Femme (n)	5/3	4/4
Age (an)	50±6	48±4
Paramètres cliniques		
Classe NYHA		3.6± 0.2
FE (%)		14±2
LVIDd (mm)		70±5
FS (%)		13±2
Traitements		
ACE-I/AT ₁ -Antagonistes		75%
β-bloquants		50%
Aldostérone-Antagonistes		63%
Digitalis		25%
Diurétiques		100%
Inotropes		38%
Nitrates		0%
Statines		0%

Tableau 1 : Caractéristiques des patients dont sont issus les biopsies de VG.

III.II. TECHNIQUES D'ANALYSES ANATOMO-PHYSIOLOGIQUES

III.III.1.ECHOCARDIOGRAPHIE

L'échocardiographie permet un suivi non invasif de la fonction cardiaque (FS : fraction de raccourcissement ; FE : fraction d'éjection ; ESV : volume télésystolique ; EDV : volume télédiastolique) et du remodelage du myocarde (LVIDs : diamètre télésystolique du VG ; LVIDd : diamètre télédiastolique du VG ; IVSs : paroi antérieure du VG en systole ; IVSd : paroi antérieure du VG en diastole ; LVPWs : paroi postérieure du VG en systole ; LVPWd : paroi postérieure du VG en diastole). Cet examen est réalisé avec l'échocardiographe Vivid

7(GE Healthcare, Fairfield, Etats-Unis) sur des souris anesthésiées à l'isoflurane (1 % + O₂). L'appareil est équipé d'une sonde de 14 MHz (i13L, GE Healthcare). L'acquisition se fait en mode Temps-Mouvement selon le petit axe parasternal, passant au niveau des muscles papillaires. Les images enregistrées sont analysées a posteriori avec le logiciel EchoPAC (GE Healthcare). Cet examen est réalisé 28 jours après l'imposition de la pathologie, juste avant le sacrifice.

III.III.2.CATHETERISME GAUCHE

Le cathétérisme gauche permet le recueil des pressions artérielles ainsi que celle des pressions intraventriculaires gauches de manière invasive (Figure 34). Le modèle utilisé est le SPR-1000 (Millar Instruments, Houston, Etats-Unis). Le cathéter est introduit dans la carotide droite de la souris sous anesthésie à l'isoflurane (2 % + O₂) pour arriver par la suite au ventricule gauche. Le cathéter utilisé ici mesure les pressions (LVsysP : Pression télésystolique du VG ; LVendP : Pression télédiastolique du VG ; LVdevP : Pression développée dans le VG). On obtient à partir du calcul de la dérivée première de la courbe de pression du VG les vitesses pour atteindre ces pressions (dP/dt max : Vitesse maximale de l'augmentation de la pression en systole, vitesse maximale de contraction ; dP/dt min : Vitesse maximale de la diminution de la pression en diastole, vitesse maximale de relaxation) (Scisence,Ithaca,Etats-Unis). Le logiciel d'acquisition vient de la société Emka (Emka, Paris, France) qui génère pour l'analyse un fichier Excel (Microsoft, Redmond, Etats-Unis).

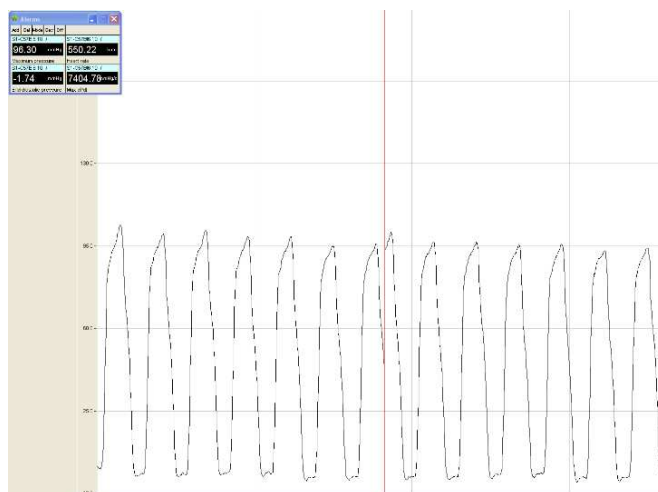


Figure 34 : Exemple d'un tracé obtenu par le cathéter de pression à l'intérieur du VG d'une souris WT.

III.III.3. MESURES ANATOMIQUES

Les souris mâles KO Trd Sham et opérées sont euthanasiées par une injection en rétro-orbitale de pentobarbital (dose maximale de 2,7 mg par souris), 4 semaines après l'opération (TAC ou IM). Le cœur est arrêté en diastole par injection de KCl saturé. Le cœur est rapidement excisé et pesé. Les ventricules droit et gauche sont ensuite pesés séparément. L'apex du ventricule gauche est coupé transversalement puis inclus dans de l'OCT (Cellpath, Newtown, Royaume-Uni) par congélation dans de l'isopentane préalablement refroidi dans de l'azote liquide, pour les analyses immunohistologiques. Le reste des tissus est congelé et dédié aux analyses biochimiques (WB, PCR, Co-IP,...). La mesure du foie, poumons et tibia permet d'évaluer le degré d'hypertrophie ou d'IC, rapporté à un paramètre de croissance (ie la longueur du tibia).

III.III.6.ETUDE DES COURANTS IONIQUES : PATCH-CLAMP

Après l'isolement des cardiomyocytes adultes du ventricule gauche et leur stockage à température ambiante, leur potentiel d'action (PA) ainsi que l'étude de leurs canaux calciques et potassiques sont étudiés par la technique du patch-clamp. Cette technique repose sur la mise en continuité électrique d'une micropipette en verre, d'un diamètre d'environ 1 μm , avec la membrane de la cellule vivante (Figure 35). L'intérieur de la micropipette contient une solution ionique de composition connue, dépendante des canaux étudiés ou de la configuration utilisée. Pour la mesure du courant I_{CaL} , la solution ionique à l'intérieur de la micropipette est la suivante (en mM): CsCl 100; TEA-Cl 20; EGTA 8; HEPES 10; CaCl_2 3; ATPNa_2 4 et GTPNa_2 0.4 (pH 7.3). La perfusion des cellules se fait dans une solution contenant (en mM): TEA-Cl 140; MgCl_2 2; CaCl_2 1.8; HEPES 10 et glucose 10 (pH 7.4). Pour l'enregistrement du PA, la solution ionique à l'intérieur de la micropipette est la suivante (en mM): KCl 120; EGTA 8; HEPES 10; MgCl_2 6.8; CaCl_2 3; ATPNa_2 4 et GTPNa_2 0.4 (pH 7.2). La perfusion des cellules se fait dans une solution contenant (en mM): NaCl 130; KCl 4; MgCl_2 1.8; CaCl_2 1.8; HEPES 10 et glucose 11 (pH 7.4).

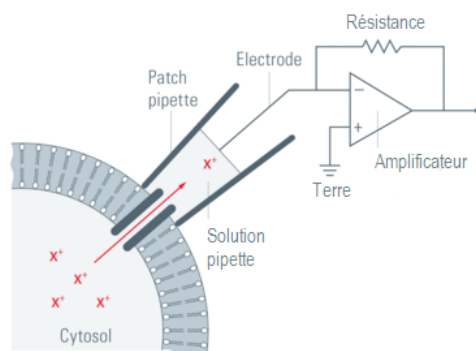


Figure 35 : Schéma général du dispositif de patch-clamp.

La configuration de patch-clamp utilisée dans notre étude est celle en cellule entière (*whole-cell* en anglais) et en "ruptured" patch : l'ensemble des courants ioniques de la cellule est enregistré après avoir cassé la membrane avec une légère aspiration. L'intérieur de la pipette et celui de la cellule ne forme plus qu'un.

L'enregistrement des PA est réalisé dans la configuration courant imposé par une brève injection (1-2 ms) d'un courant dépolarisant (1-2 nA) à 1 Hz. La mesure du courant I_{CaT} est effectuée par l'imposition de sauts de potentiels de 200 ms variant de -60 to +50 mV avec un potentiel au repos imposé de -60 mV (pour éliminer une contamination par les courants sodiques et I_{CaT}). Les sauts de voltage sont incrémentés de 10 mV toutes les 2 s.

Cette étude a été réalisée par le Dr Franck Aimond au sein de l'unité INSERM U1046 à Montpellier.

III.III. TECHNIQUES DE DETECTION, D'INDUCTION D'ARYTHMIES

III.III.1. ELECTROCARDIOGRAMME (ECG)

L'électrocardiogramme (ECG) permet un suivi légèrement invasif de la fonction électrique du cœur par quatre électrodes placées aux quatre membres en sous-cutanée sur l'animal anesthésié à l'isoflurane (1.5% + O₂). Il est réalisé 4 semaines après l'imposition de la pathologie. La température corporelle de la souris est maintenue à 37°C grâce à un tapis chauffant (Harvard Apparatus, Holliston, Etats-Unis). Les électrodes, placées à chacun des membres, permettent d'enregistrer un ECG 6 dérivations. Les enregistrements sont filtrés entre 0,5 et 250 Hz et enregistrés à l'aide d'un convertisseur analogique numérique IOX 1.585 (Emka, Paris, France). Pour chaque animal, un enregistrement de 15 minutes est réalisé : 5 minutes à l'état basal et 10 minutes après l'injection d'isoprotérénol. L'injection d'isoprotérénol se fait en intra-péritonéal à la concentration d'un mg.kg⁻¹.

La durée des intervalles RR, PR et QT est déterminée sur 8 à 9 complexes PQRST successifs en dérivation DI et moyennée à l'aide du logiciel ECGAuto 2.7 (Emka, Paris, France). L'intervalle RR est mesuré entre chaque onde R des complexes PQRST. L'intervalle PR est mesuré entre le début de l'onde P et de l'onde R. L'intervalle QT+ est mesuré à partir du début complexe QRS jusqu'au point T+ de l'onde T, au moment où elle rejoint la ligne isoélectrique (Figure 36). La détermination de la fin de cette onde étant difficile, d'autres

dérivations comme la DII et la DIII peuvent être utilisées. Nous avons dénommé notre intervalle QT+ : + pour avoir délimité l'onde T par le point de passage de la ligne isoélectrique du QT biphasique (entre la composante rapide et lente de la repolarisation ventriculaire). Nous utilisons ce point pour pouvoir comparer les modèles WT et KO en condition basale et sous isoprotérénol. On corrige l'intervalle QT+ obtenu chez la souris par la correction selon Mitchell $QT+cM = QT+ / \sqrt{((R-R_0)/100)}$, avec QT+ : intervalle entre le début de l'onde P et le point T+, R-R₀ intervalle R-R entre deux complexes qui se suivent et 100 est un facteur normalisant correspondant à la valeur moyenne en ms de l'intervalle R-R. Cette correction est utile car la fin de l'onde T est masquée par l'onde P du cycle suivant à cause du rythme cardiaque élevé de la souris.

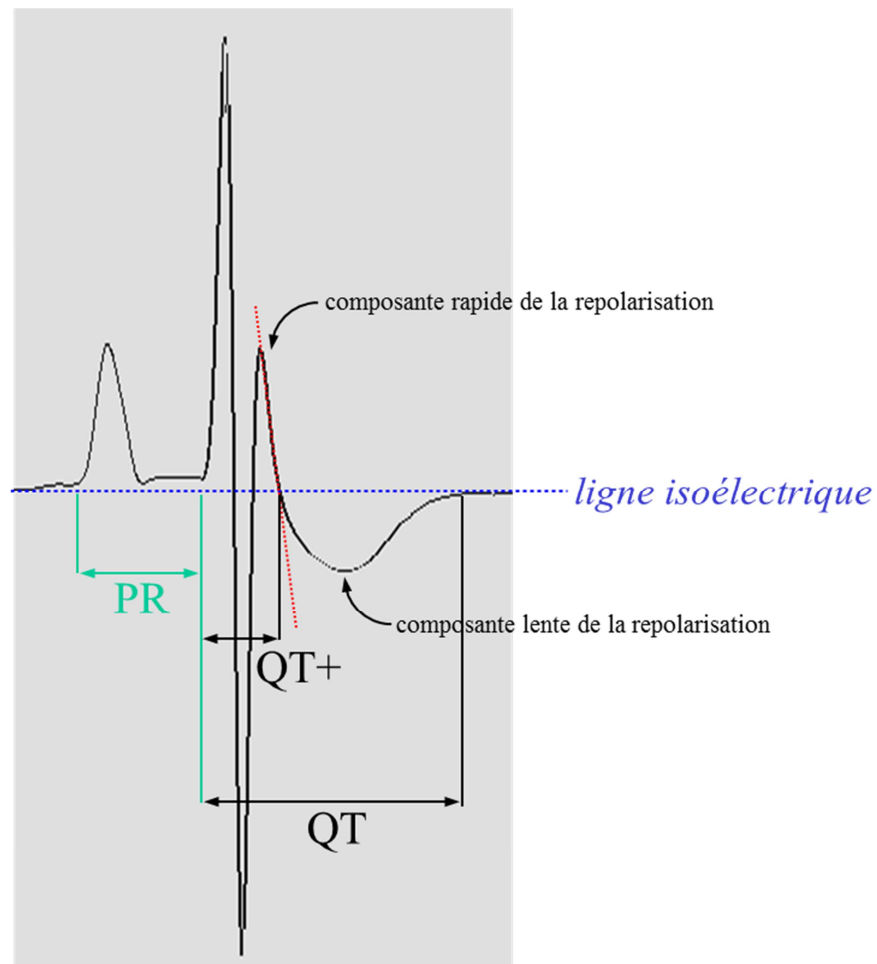


Figure 36 : Détermination des intervalles caractéristiques de l'ECG de souris.

III.III.2. ETUDE DES FUITES CALCIQUES

L'étude des fuites calciques du RS se fait à la fois avec la technique précédemment citée (Patch-clamp) comme celle de la détection des sparks calciques avec un microscope confocal. Après l'isolement des cardiomyocytes adultes et leur stockage à température ambiante, les cellules sont chargées avec une sonde fluorescente, Fluo-4 AM (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). Les mesures des sparks sont réalisées avec le microscope confocal Zeiss LSM510 Excitator (Oberkochen, Allemagne) sur les cardiomyocytes en phase quiescente à l'aide du logiciel d'acquisition ZEN 2008 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne), à l'objectif x63. Les sparks calciques se mesurent en mode balayage linéaire sur une ligne de 50 μm suivant l'axe de la cellule, à l'aide du système AIM4.2 (Figure 37). Dix images sont enregistrées par cellule (5 x 2 lignes) pour empêcher la dégradation de la cellule par le laser du confocal. L'analyse des sparks s'effectue à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, Etats-Unis) et de son programme d'analyse algorithmique *SparkMaster* d'après la méthode de Picht, Zima, Blatter, and Bers (2007).

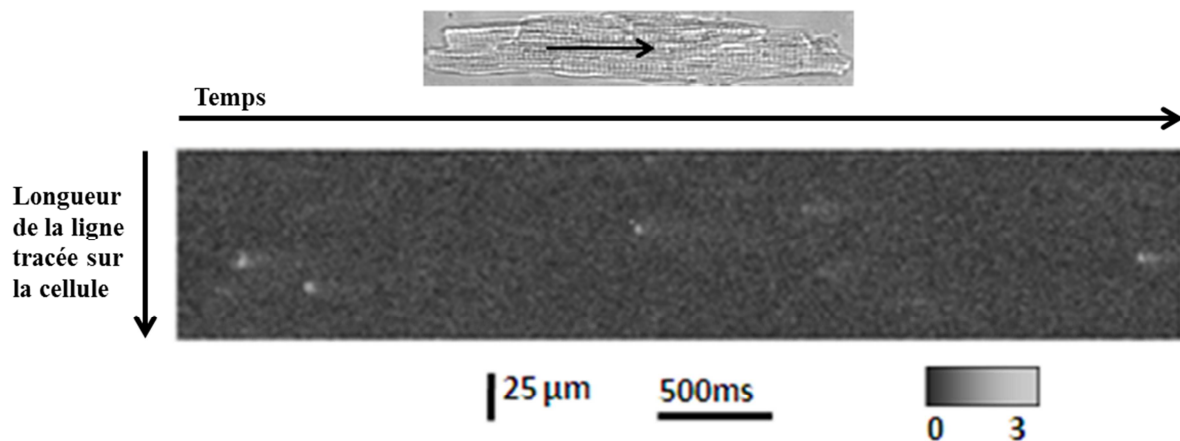


Figure 37 : Illustration de l'acquisition de sparks calciques sur un cardiomyocyte chargé au Fluo-4AM.

III.IV. TECHNIQUES MOLECULAIRES ET BIOCHIMIQUES

III.V.1. MESURE DE L'HYPERTROPHIE : IMMUNOMARQUAGE SUR COUPE

Afin de déterminer l'hypertrophie cardiomyocytaire, l'immunomarquage est réalisé sur une coupe transverse de 7 μm de l'apex du ventricule gauche congelé. Après décongélation des lames, nous saturons les coupes avec de la BSA 5%. Nous effectuons un double marquage anti-cavéoline 1 α (Santa Cruz, USA) (Tableau 3) pour détecter les cellules endothéliales des vaisseaux et anti-vinculine (Sigma-Aldrich, USA) (Tableau 3) pour les membranes cellulaires des cardiomyocytes. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dirigé contre l'anticorps primaire permet de détecter l'immunomarquage au microscope. La quantification est réalisée sur 10 champs de chaque coupe, prise au grossissement x16 avec le microscope AxioObserver.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Au moins 300 surfaces de cardiomyocytes sont mesurées par coupe. La quantification du nombre d'artérioles/ mm^2 est réalisée dans un champ de surface connue. L'analyse se réalise grâce aux logiciels AxioVision Rel.4.8. (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) et Image J (NIH, Bethesda, Etats-Unis).

III.V.2. MESURE DE LA FIBROSE PAR COLORATION : TRICHROME DE MASSON

Après décongélation, les coupes transverses de l'apex du ventricule gauche (10 μm) sont recouvertes d'hématoxyline pour marquer les noyaux. Ensuite, l'acide picrique permet la fixation du tissu. Le mélange de Fuchsiine/Ponceau marque le cytoplasme des cellules. Enfin, le collagène est révélé par l'acide phosphomolybdique qui est déposé préalablement sur les coupes pour fixer le colorant du collagène, le vert lumière. La fibrose représentée par les aires de couleur verte est quantifiée et exprimée en % de l'aire totale à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, Etats-Unis) après que les coupes aient été scannées par l'appareil NanoZoomer (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japon).

III.V.3. ILLUSTRATION DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE SUR COUPE DE CŒUR ENTIER AVEC COLORATION A L'EOSINE-HEMALUN (HE)

Les cœurs sont prélevés, lavés au PBS puis fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4%. Avant d'être inclus en bloc avec de l'OCT (Cellpath, Newtown, Royaume-Uni) par congélation, les cœurs sont plongés dans un bain de sucrose 30% pour préserver le tissu. Des sections longitudinales du cœur de 25 μm , avec ses quatre chambres apparentes, sont réalisées et colorées à l'éosine-hémalum (HE). Les images de ces coupes sont obtenues par scan.

III.V.4. QUANTIFICATION DES ARNm / PROTEINES : PCR QUANTITATIVE / WESTERN-BLOT.

L'ARN total de tissus congelés à -80°C est extrait à l'aide d'un solvant, le TRIzol. Pour déterminer leur quantité et leur qualité, on dose les ARNm obtenus à l'aide d'un nanodrop. Le ratio de la longueur d'onde d'absorbance 260 nm / longueur d'onde d'absorbance 280 nm détermine la pureté de l'échantillon, un ratio d'environ 2 détermine un échantillon « pur ». On réalise une quantification absolue ou relative de la quantité initiale d'ARNm cible par une PCR en temps réel ou PCR quantitative (PCR : Polymerase Chain Reaction). Cette PCR se réalise en 2 étapes : 1. Une RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction) transforme les ARNm en leur ADN complémentaire (ADNc). 2. Par la suite, les ADNc d'intérêts sont amplifiés par une PCR (Tableau 2).

Nom du primer	primer	ARNm du gène
β -MHC-F_CH	CAAGGTCAATACTCTGACCAAGG	<i>MYH7</i> (β -MHC)
β -MHC-R_CH	CCATGCGCACTTCTTCTC	<i>MYH7</i> (β -MHC)
ANF-F_CH	GGGTAGGATTGACAGGATTGGA	<i>NPPA</i> (ANF)
ANF-R_CH	CRACTGCCTTTTCCTCCTTG	<i>NPPA</i> (ANF)
Triadin-1	GGCTTCTGTGCATCGCTCTGAT	<i>TRDN</i> (CT1)
Triadin-2	CAATCTTGCAATGGAGCTTG	<i>TRDN</i> (CT1)
GAPDH-F	GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC ATG	<i>GAPDH</i> (GAPDH)
GAPDH-R	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAGCC	<i>GAPDH</i> (GAPDH)

Tableau 2 : Liste des primers utilisés en PCRq.

L'immunoempreinte ou Western Blot permet d'évaluer la quantité de protéines présentes. Elles sont extraites avec différents tampons, suivant les protéines d'intérêts. Une gamme standard d'albumine sérique de bœuf (BSA) permet de les doser. Les extraits protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide, dont le pourcentage varie selon la protéine d'intérêt. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose, incubée par la suite avec les anticorps propres aux protéines d'intérêts (Tableau 3). L'anticorps secondaire couplé à la HRP (*Horse Raddish Peroxidase*) dirigé contre l'anticorps primaire permet de détecter la quantité de protéines présentes. La révélation par chimiluminescence est possible avec un réactif de révélation Western ECL Substrate (*Enhanced Chemi Luminescence*) (Biorad, Hercules, Etats-Unis). Le système Chemidoc XRS+ permet de visualiser et recueillir le signal de luminescence (Biorad, Hercules, Etats-Unis), le signal est mesuré par analyse informatique avec Image Lab (Biorad, Hercules, Etats-Unis). Le rouge ponceau et/ou la quantité de GAPDH (protéine de référence) permettent la normalisation de la quantité de protéines déposées entre différents gels.

Anticorps	Protéines	Poids moléculaire (kDa)
Produit et donné par le laboratoire d'Isabelle Marty	CT1 souris	35/40
Produit et donné par le laboratoire d'Isabelle Marty	CT1 rat	32
Produit et donné par le laboratoire d'Isabelle Marty	CT1 humain	32
Ab3516 (Abcam)	CSQ2 souris, rat, humain	55
2614 (Cell Signaling)	Calcineurine souris	59
9315 (Cell Signaling)	GSK-3 β souris	46
5174 (Cell Signaling)	GAPDH souris	37
NBP1-59203 (Novus Biologicals)	SERCA2a souris	115
MAB-922 (Pierce)	Phospholamban (PLB) souris	25
A010-12 (Badrilla)	PLB S16 souris	30
SC-894 (Santa-Cruz)	Cavéoline 1 α souris	20
V-9274 (Sigma Aldrich)	Vinculine	116

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western-Blot et en immunomarquage.

III.V. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés ou représentés, en majorité, par leur moyenne \pm sem pour chaque groupe et le n dans chaque groupe est aussi précisé. Parfois ils sont représentés par leur moyenne \pm min/max Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, Etats-Unis). Une analyse de la variance à deux facteurs ou *two-way Anova* a été réalisée sur une grande partie des résultats car il faut prendre en compte deux facteurs : le génotype et la pathologie imposée (TAC, Iso, IM) sur 4 groupes. Par la suite, le post-test de Bonferroni est appliqué. Si un seul facteur est pris en compte et que le nombre de groupe est supérieur ou égal à 3 une analyse de la variance à un facteur ou *one-way Anova* est réalisé avec comme post-test celui de Bonferroni. Si le nombre de groupes traités est égal à 2 le test de Student est appliqué. Les étoiles représentent les différences significatives avec $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) versus WT. Les dièses représentent les différences significatives avec $p \leq 0.05$ (#), $p \leq 0.01$ (##), $p \leq 0.001$ (###) versus Sham.

RESULTATS

PARTIE 1 : ROLE DE LA TRIADINE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.

L'expression et la fonction de la triadine au cours de la mise en place de l'hypertrophie cardiaque n'étaient pas documentées lorsque nous avons commencé ce travail. Seules certaines protéines du CRC, RyR2 et la HRC, avaient été étudiées et démontrées comme participant au développement de l'hypertrophie et de l'IC (Y. Zou et al (2011) ; Gregory et al. (2006)).

Nous avons alors entrepris d'examiner la fonction de la triadine dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et la transition vers l'IC chez des souris dont le gène TRDN avait été invalidé.

1. LA TRIADINE EST NECESSAIRE AFIN DE PREVENIR LE REMODELAGE CARDIAQUE DELETERE SUITE A UNE PATHOLOGIE CARDIAQUE.

a) EXPRESSION DE LA TRIADINE (CT1) DANS L'HVG

Tout d'abord, nous avons analysé le niveau d'expression de la CT1 (ARNm et niveau protéique) dans un modèle d'hypertrophie cardiaque, la TAC (Figure 1).

Ainsi, dans un modèle de surcharge de pression induite pendant 28 jours par une constriction de l'aorte thoracique ascendante, on observe une diminution significative du niveau d'expression de CT1, tant au niveau ARNm (-21%) qu'au niveau protéique (-30%), comparativement à des souris Sham (Figure 1).

De manière très intéressante, nous démontrons également que l'expression protéique de CT1 diminue significativement dans des biopsies cardiaques de patients présentant une cardiopathie dilatée non ischémique, comparativement à des biopsies de patients sains (cœurs explantés mais non transplantés, Figure 2).

Ainsi, l'expression de CT1 diminue dans l'insuffisance cardiaque murine et humaine.

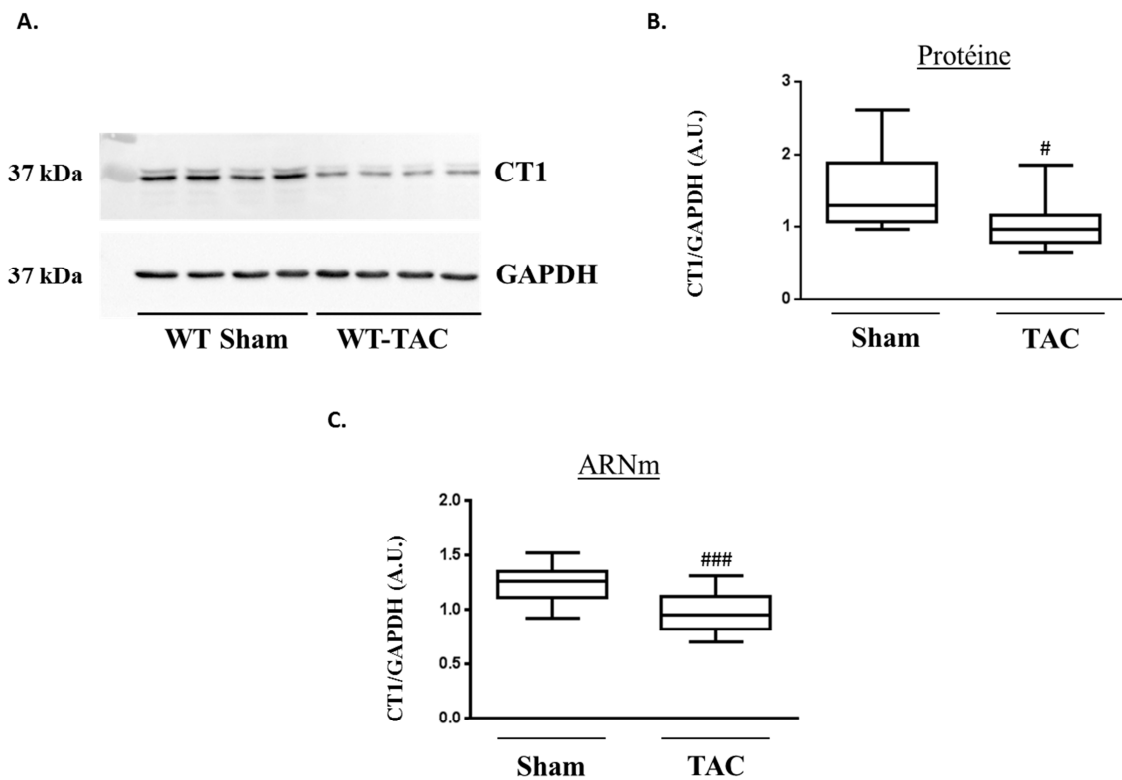


Figure 1 : Expression de la triadine cardiaque (CT1) par Western-Blot (WB) et PCRq dans un modèle d'hypertrophie cardiaque (TAC) chez la souris. **A et B.** Illustration (A) et représentation graphique (B) de l'expression protéique de la CT1 dans les modèles WT Sham ou WT-TAC. $n = 4$ par groupe pour l'image du WB, pour le graphique : moyenne \pm min/max, $n = 12$ par groupe, $\#p \leq 0.05$ versus Sham. **C.** Représentation graphique de l'expression en ARNm de la CT1 dans les modèles WT Sham ou WT-TAC. Moyenne \pm min/max, $n = 17-30$ par groupe, $###p \leq 0.001$ versus Sham. Analyse statistique par un t-test.

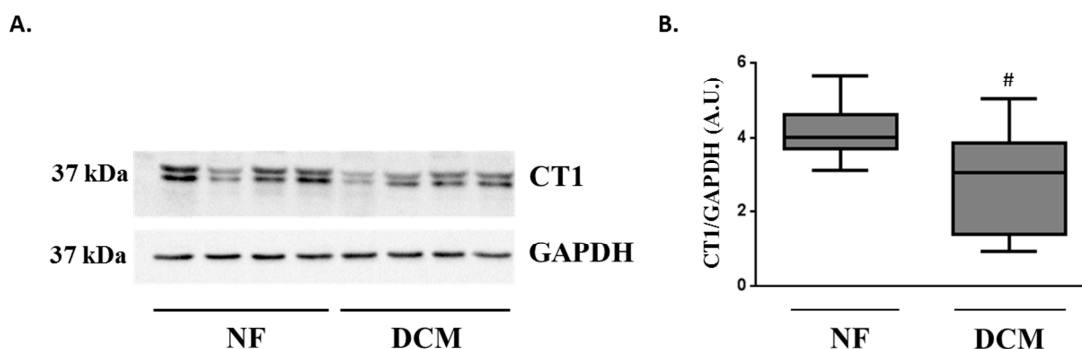


Figure 2 : Expression de la triadine cardiaque (CT1) par Western-Blot (WB) dans un modèle d'hypertrophie cardiaque dilatée (DCM) chez l'Homme. Illustration (A) et représentation graphique (B) de l'expression protéique de la CT1 dans des biopsies cardiaques humaines de patients sains (NF) et souffrants de cardiomyopathie dilatée non ischémique (DCM). $n = 4$ par groupe pour l'image du WB, pour le graphique : moyenne \pm min/max, $n = 7$ par groupe, $\#p \leq 0.05$ versus NF. Analyse statistique par un t-test.

b) RÔLE DE LA TRIADINE DANS L'HVG

Afin d'appréhender un possible impact fonctionnel de cette diminution d'expression de CT1, des souris dont le gène TRDN a été invalidé (modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty) (Figure 3) ont été soumises à deux types de pathologies cardiaques : a) une surcharge de pression d'une durée de 28 jours consécutifs par une sténose de l'aorte thoracique ascendante (TAC), b) un modèle d'hypertrophie cardiaque par infusion de catécholamines, l'isoprotérénol, en utilisant une mini-pompe osmotique. Les travaux ont combiné des approches anatomo-pathologiques, biochimiques, fonctionnelles avec mesures échocardiographiques et cathéterisme intraventriculaire. Le recueil des données a eu lieu 28 jours après l'opération avec l'intégration de groupes contrôles (Sham) du même âge. L'hypertrophie cardiaque a été évaluée par des paramètres anatomiques, une analyse échocardiographique et la mesure de la surface des cardiomyocytes.

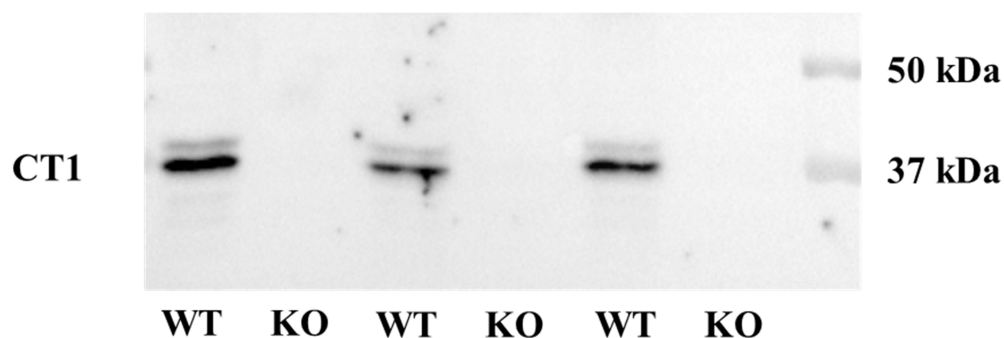


Figure 3 : Expression de la triadine cardiaque (CT1) par WB dans notre modèle murin. Souris qui porte deux allèles WT pour le gène TRDN (WT), souris qui porte deux allèles avec une délétion pour le gène TRDN (KO). n= 3 par groupe.

• PARAMETRES ANATOMIQUES

Au terme des 28 jours, les souris WT développent, comme attendu, une hypertrophie cardiaque et plus particulièrement une HVG en réponse à la surcharge de pression caractérisée par une augmentation du poids du VG de 82% (### $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 4.B). Il en est de même pour les souris KO avec une augmentation de ce poids de 104% (### $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 4.B). A noter que l'hypertrophie observée chez les souris KO est significativement supérieure à celle observée chez les souris WT-TAC (+21% au niveau du

cœur entier (***) $p \leq 0.001$ versus WT-TAC), et du VG (***) $p \leq 0.001$ versus WT-TAC, Figures 4.A et 4.B).

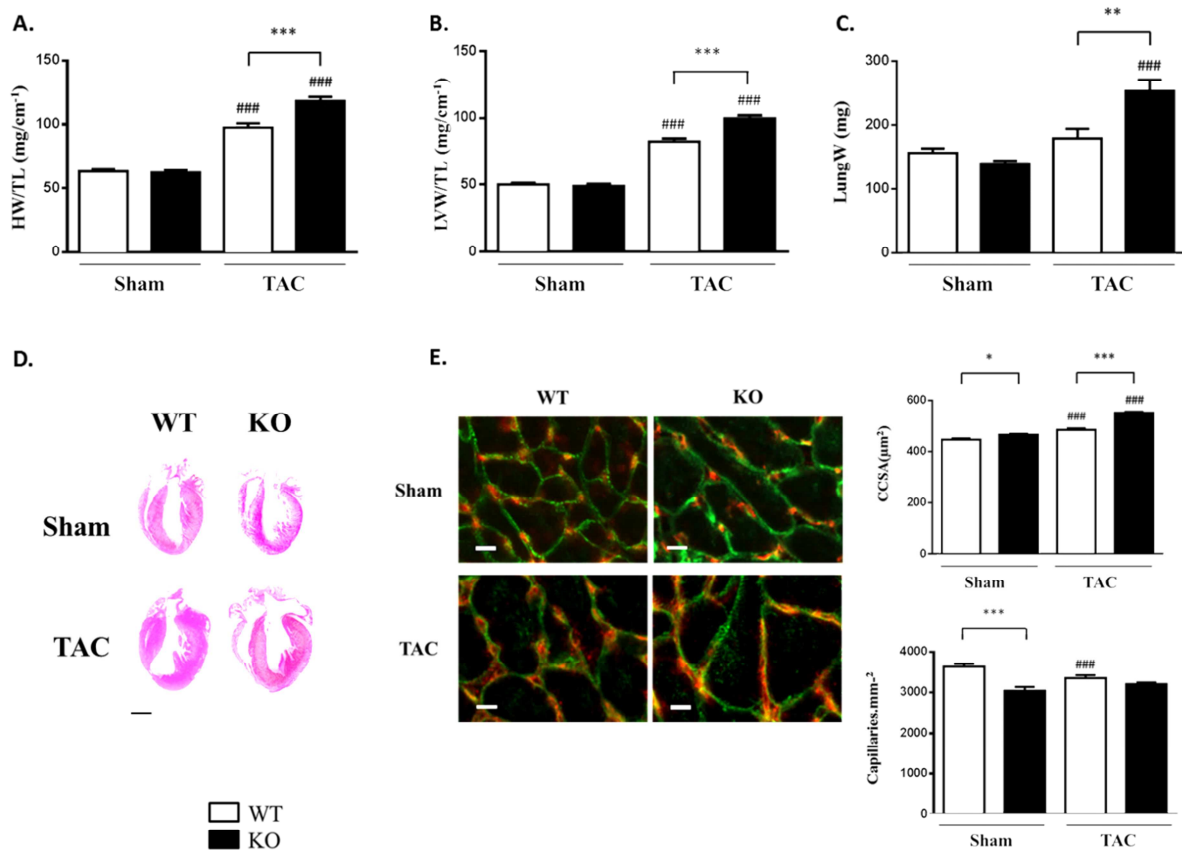


Figure 4 : La triadine prévient l'hypertrophie cardiaque dans un modèle de TAC. **A.** Ratio masse du cœur sur longueur du tibia (HW/TL) dans les génotypes indiqués après 4 semaines de Sham ou TAC. #### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **B.** Ratio masse du VG sur longueur du tibia (LVW/TL) dans les génotypes indiqués après 4 semaines de Sham ou TAC. #### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **C.** Poids des poumons (LungW) dans les génotypes indiqués après 4 semaines de Sham ou TAC. #### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **D.** Coloration à l'Eosine-Hémalum de coupes longitudinales de cœur entier de souris WT ou KO +/- TAC. Echelle : 2 mm. **E.** Image d'immunomarquage d'une coupe transversale de VG avec les capillaires immunomarqués par l'anticorps anti-Cav-1 α (rouge) et les membranes des cardiomyocytes avec l'anticorps anti-vinculine (vert), quantification de la surface des cardiomyocytes coupés en transverse (CCSA) et densité capillaire (Capillaries.mm⁻²). #### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. Echelle : 10 μm. #### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **A à C pour chacun** : Moyenne +/- sem n=7-14 par groupe. **D et E** : Moyenne +/- sem n=6-16 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

De façon similaire, dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induit par l'infusion de catécholamines (isoprotérénol à 30 mg.kg⁻¹ avec une mini-pompe osmotique pendant 28 jours), nous démontrons que la délétion de la Triadine est associée à une HVG

significativement supérieure, comparativement aux souris WT (+25%, *** $p \leq 0.001$ versus WT+Iso, Figure 5.B).

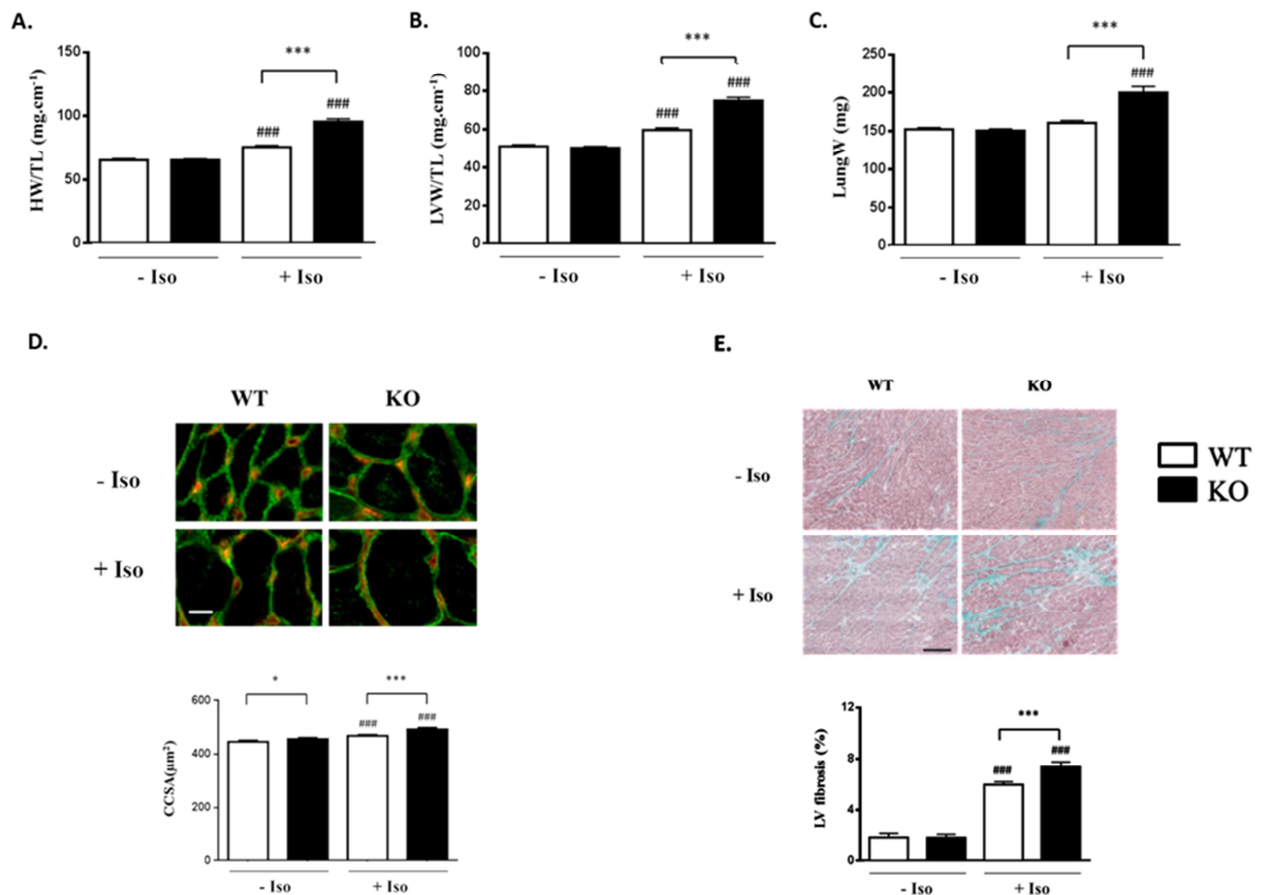


Figure 5 : La triadine prévient l’hypertrophie cardiaque et un remodelage délétère (fibrose) dans un modèle de mini-pompes (MP) d’isoprotérénol (+Iso) (30 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) ou non (-Iso). A. Ratio masse du cœur sur longueur du tibia (HW/TL) dans les génotypes indiqués après 4 semaines +/- Iso. ### $p \leq 0.001$ versus - Iso ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **B.** Ratio masse du VG sur longueur du tibia (LVW/TL) dans les génotypes indiqués après 4 semaines +/- Iso. ### $p \leq 0.001$ versus - Iso ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **C.** Poids des poumons (LungW) dans les génotypes indiqués après 4 semaines +/- Iso. ### $p \leq 0.001$ versus - Iso ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **D.** Image d’immunomarquage d’une coupe transversale de VG avec les capillaires immunomarqués par l’anticorps anti-Cav-1 α (rouge) et les membranes des cardiomyocytes avec l’anticorps anti-vinculine (vert) et quantification de la surface des cardiomyocytes coupés en transverse (CCSA). ### $p \leq 0.001$ versus - Iso ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. Echelle: 10 μ m. **E.** Image représentative et quantification de la fibrose sur une coupe transversale de VG colorée au Trichrome de Masson. ### $p \leq 0.001$ versus - Iso ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **A à C pour chacun :** Moyenne +/- sem n=35-45 par groupe. **D :** Moyenne +/- sem n=7 par groupe. **E :** Moyenne +/- sem n=7-12 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d’interaction et un post-test Bonferroni.

Après nous être intéressés à l'hypertrophie au niveau de l'organe entier, nous avons observé celle des cardiomyocytes. Ce sont normalement sur ces cellules que repose l'hypertrophie cardiaque (Swynghedauw (1999)). A l'état basal, le KO développe une légère hypertrophie au niveau de ces cardiomyocytes par rapport au WT (+2%, * $p \leq 0.05$ versus WT, Figures 4.E et 5.D) En réponse à la TAC, les WT et les KO voient leurs myocytes s'hypertrophier comparativement à leurs groupes Sham (+25%, #### $p \leq 0.001$ pour les WT ; +19% pour les KO, #### $p \leq 0.001$ Figure 4.E). En revanche, cette hypertrophie est plus importante chez les KO-TAC par rapport aux WT-TAC (+14%, *** $p \leq 0.001$ Figure 4.E).

En réponse à l'Iso, les WT et les KO voient également leurs myocytes s'hypertrophier comparativement à leurs groupes Sham (+5%, #### $p \leq 0.001$ pour les WT ; +8% pour les KO, #### $p \leq 0.001$ Figure 5.D). On peut remarquer que cette hypertrophie augmente chez les KO+Iso par rapport aux WT+Iso (+5%, *** $p \leq 0.001$ Figure 5.D).

Le KO a de légers effets pro-trophiques indépendamment du stimulus hypertrophique, comme la TAC ou les catécholamines. Le stimulus permet d'accentuer cette hypertrophie dans le KO. Ainsi l'effet trophique de la délétion de la triadine repose en grande partie sur l'hypertrophie de ses cardiomyocytes qui s'accroît et est potentialisée par la surcharge de pression de la TAC ou les catécholamines.

Enfin, en plus de l'accroissement de l'HVG, chez les KO-TAC, nous observons une augmentation significative du poids des poumons sûrement consécutive au développement d'un œdème pulmonaire (#### $p \leq 0.001$ versus Sham, ** $p \leq 0.01$ versus WT Figure 4.C). Il en est de même avec le traitement à l'Iso (#### $p \leq 0.001$ versus Sham, *** $p \leq 0.001$ versus WT Figure 5.C).

Ainsi, l'absence de la triadine participerait, du point de vue anatomique, à la transition vers l'IC avec une augmentation du poids des poumons qui s'ajoute au développement d'une hypertrophie cardiaque exacerbée. Les données fonctionnelles étudiées dans la partie suivante (partie 1.2) par échocardiographie et cathétérisme serviront à confirmer notre hypothèse.

Nous avons complété l'étude par une analyse semi-quantitative de l'expression de gènes caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque décompensée à savoir l'ANF et la chaîne lourde β de la myosine par PCRq (Figures 6 A, B). Nous remarquons bien une augmentation de leur expression en réponse à la TAC (ANF : +830% chez les WT, ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 6.A, +1073% chez les KO, ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 6.A ; β -MHC : +413% chez les WT, ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 6.B, +2443% chez les KO, ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 6.B). L'expression de ces marqueurs est accrue chez les KO sous TAC comparée aux WT sous TAC (ANF : +268%, ^{***} $p \leq 0.001$ versus WT, Figure 6.A ; β -MHC : +93%, ^{***} $p \leq 0.001$ versus WT, Figure 6.B).

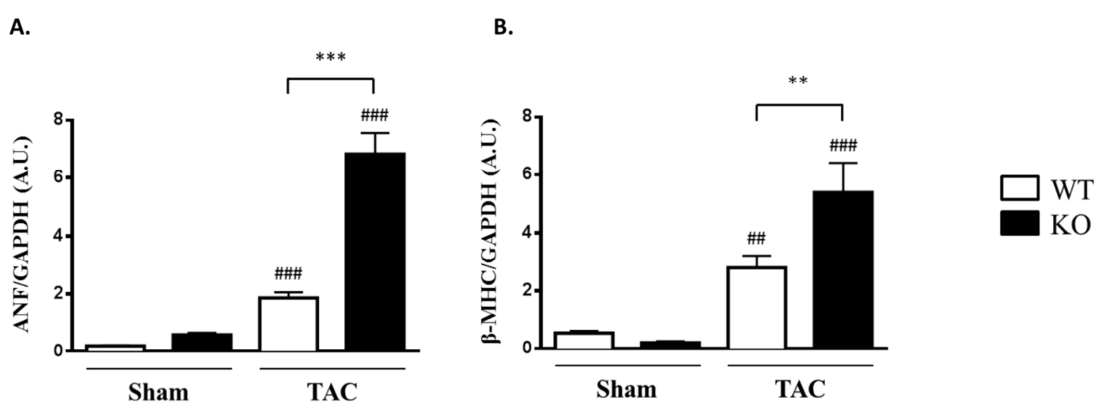


Figure 6 : Expression des marqueurs de l'hypertrophie dans les biopsies de VG dans le modèle de TAC avec ou sans la délétion de la triadine. A. Expression semi-quantitative de l'ANF en PCRq (ANF/GAPDH) dans une biopsie de VG des génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham ; ^{***} $p \leq 0.001$ versus WT. **B.** Expression semi-quantitative de la β -MHC en PCRq (β -MHC/GAPDH) dans une biopsie de VG des génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham ; ^{***} $p \leq 0.001$ versus WT. **A et B:** Moyenne +/- sem n=10-22 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

La délétion de la triadine conduit à l'induction des marqueurs du programme foetal comme l'ANF et la β -MHC, témoignant ainsi du développement d'une HVG décompensée synonyme d'IC.

• ANALYSE ECHOGRAPHIQUE DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE

L'analyse des données échographiques permet également de caractériser le remodelage cardiaque. De très nombreux paramètres peuvent être mesurés et analysés dont les plus pertinents dans notre étude sont : l'épaisseur de la paroi postérieure du VG en diastole et systole (LVPWd et LVPWs), l'épaisseur de la paroi antérieure du VG en diastole et systole (IVSd et IVSs) et le diamètre interne télédiastolique et télésystolique du VG (LVIDd et LVIDs) (Figures 7, 8 et Tableau 1).

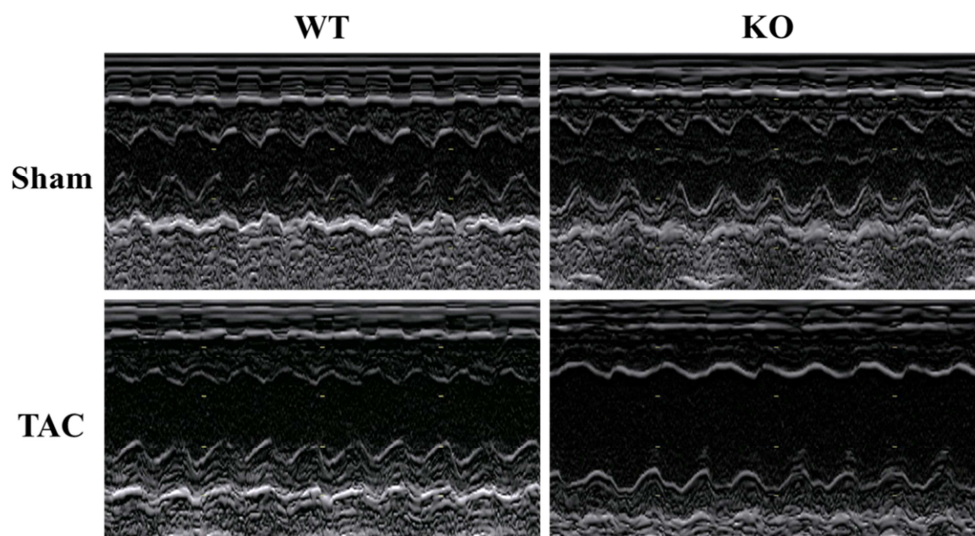


Figure 7 : La triadine prévient l'hypertrophie cardiaque excentrique non adaptative dans un modèle de TAC. Echocardiogramme du mode temps-mouvement (TM ou M-mode) sur les WT, KO Sham ou TAC.

On remarque qu'à l'état basal la délétion de la triadine a des effets sur deux paramètres : LVPWd et LVPWs. En diastole (LVPWd, +28%, * $p \leq 0.05$ versus WT, Figure 8.B) comme en systole (LVPWs, +17%, ** $p \leq 0.01$ versus WT, Figure 8.A), le KO présente une plus grande épaisseur pour ce paramètre, signalant une légère hypertrophie concentrique détectée également au niveau des cardiomyocytes (Figures 4.E, 8.A et B et Tableau 1).

L'ensemble des paramètres échocardiographiques augmentent en réponse à une surcharge de pression en diastole comme en systole chez les animaux WT-TAC (LVPWd +44%, ### $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 8.B et LVPWs +16%, ## $p \leq 0.01$ versus Sham, Figure 8.A ; IVSs + 13%, # $p \leq 0.05$ versus Sham, Tableau 1 et IVSd +16%, # $p \leq 0.05$ versus Sham, Tableau 1

; LVIDd +15%, # $p \leq 0.05$ versus Sham, Tableau 1 et LVIDs + 43%, #### $p \leq 0.001$ versus Sham, Tableau 1).

En réponse à la TAC, l'épaisseur de la paroi postérieure du VG des souris KO n'est pas modifiée par rapport aux KO Sham (LVPWd, Figure 8.B) et elle diminue en systole (LVPWs, -17%, #### $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 8.A). La paroi antérieure du VG augmente en diastole (IVSd +25%, #### $p \leq 0.001$ versus Sham, Tableau 1) mais reste inchangée en systole (IVSs, Tableau 1). Le diamètre interne du VG s'accroît fortement sous TAC chez les KO en diastole comme en systole (LVIDd +44%, #### $p \leq 0.001$ versus Sham, Tableau 1 et LVIDs +104%, #### $p \leq 0.001$ versus Sham, Tableau 1).

Comparativement aux souris WT-TAC, l'épaisseur de la paroi postérieure diminue chez les souris KO-TAC en diastole comme en systole (-15% pour la LVPWd, * $p \leq 0.05$ versus WT, Figure 8.B ; -16% pour la LVPWs, *** $p \leq 0.001$ versus WT, Figure 8.A), il est en de même pour la paroi antérieure du VG en systole (-12% pour IVSs, *** $p \leq 0.001$ versus WT, Tableau 1). Le diamètre interne du VG en diastole comme en systole est supérieur chez les KO-TAC (LVIDd +28%, *** $p \leq 0.001$ versus WT, Tableau 1 et LVIDs +48%, *** $p \leq 0.001$ versus WT, Tableau 1) par rapport aux souris WT-TAC.

Ainsi un mois après la TAC, les animaux KO-TAC présentent une HVG plus importante que les souris WT-TAC associée à une augmentation des diamètres télésystolique et télédiastolique indiquant une dilatation des cavités, absente chez les WT-TAC. Ces animaux développent donc une HVG de type excentrique comparée à leurs contrôles. En général, ce type d'hypertrophie est non compensé et implique une dysfonction cardiaque que nous étudierons dans la partie 2.

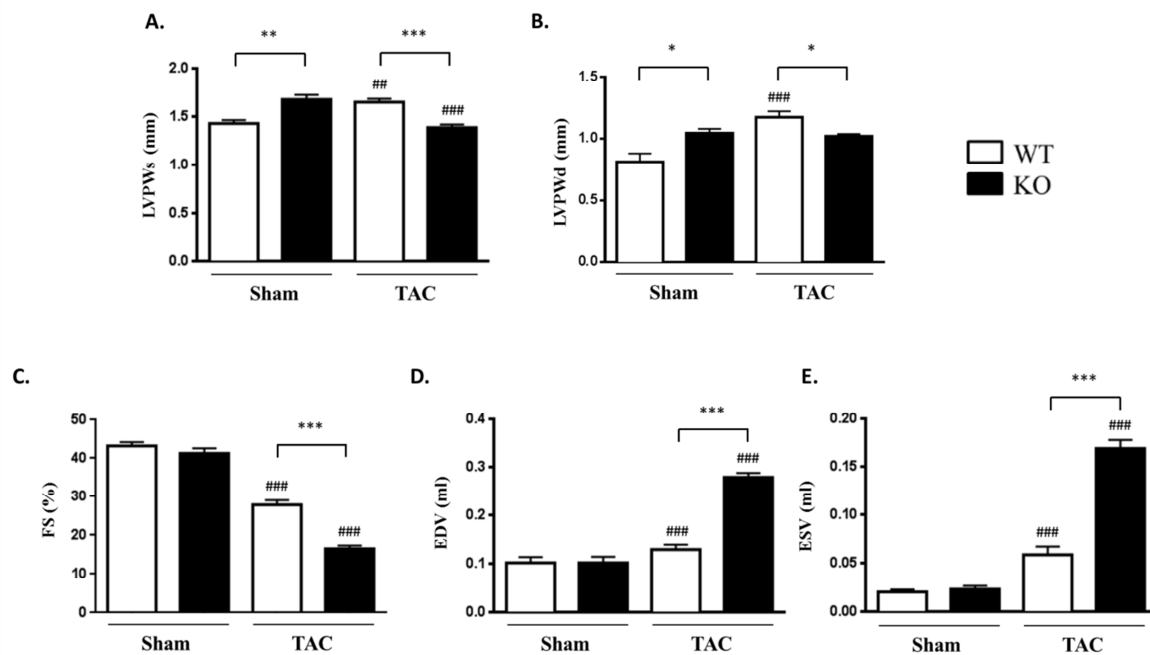


Figure 8 : La triadine prévient l’hypertrophie cardiaque excentrique non adaptative dans un modèle de TAC. A. Epaisseur de la paroi postérieure du VG en systole (LVPWs) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ### $p \leq 0.001$ versus Sham ; * $p \leq 0.05$ versus WT. **B.** Epaisseur de la paroi postérieure du VG en diastole (LVPWd) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **C.** Fraction de raccourcissement (FS) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **D.** Volume télédiastolique (EDV) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC.*** $p \leq 0.001$ versus WT. **E.** Volume télésystolique (ESV) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. *** $p \leq 0.001$ versus WT. **A à E pour chacun :** Moyenne +/- sem n=6-18 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d’interaction et un post-test Bonferroni.

Paramètres Echographiques	WT Sham n= 6	KO Sham n = 7	WT-TAC n = 12	KO-TAC n = 18
LVIDs (mm)	1,925 ± 0.073	1,986 ± 0.106	2,743 ± 0.123 ^{###}	4,060 ± 0.074 ^{####,***}
LVIDd (mm)	3,285 ± 0.105	3,373 ± 0.140	3,788 ± 0.116 ^{###}	4,854 ± 0.059 ^{####,***}
IVSs (mm)	1,447 ± 0.069	1,459 ± 0.042	1,639 ± 0.034 [#]	1,443 ± 0.027 ^{####,***}
IVSd (mm)	1,015 ± 0.038	0,946 ± 0.035	1,177 ± 0.034 [#]	1,181 ± 0.024 ^{###}
LVPWs (mm)	1,427 ± 0.038	1,676 ± 0.047 ^{**}	1,649 ± 0.035 ^{###}	1,386 ± 0.032 ^{####,***}
LVPWd (mm)	0,813 ± 0.068	1,044 ± 0.035 [*]	1,173 ± 0.048 ^{###}	1,021 ± 0.018 [*]
ESV (mL)	0,020 ± 0.003	0,023 ± 0.003	0,059 ± 0.009 ^{###}	0,169 ± 0.009 ^{####,***}
EDV (mL)	0,102 ± 0.012	0,101 ± 0.013	0,129 ± 0.01 ^{###}	0,278 ± 0.01 ^{####,***}
FS (%)	43,17 ± 1.05	41,29 ± 1.27	27,86 ± 1.16 ^{###}	16,50 ± 0.83 ^{####,***}

Tableau 1 : Paramètres échocardiographiques. LVIDs : diamètre télésystolique du VG ; LVIDd : diamètre télédiastolique du VG ; IVSs : paroi antérieure du VG en systole ; IVSd : paroi antérieure du VG en diastole ; LVPWs : paroi postérieure du VG en systole ; LVPWd : paroi postérieure du VG en diastole ; ESV : volume télésystolique ; EDV : volume télédiastolique ; FS : fraction de raccourcissement. Valeurs exprimées en moyenne ± sem. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni. # p≤0.05, ### p≤0.01, #### p≤0.001 versus Sham, * p≤0.05, *** p≤0.001 versus WT.

2. ROLE DE LA TRIADINE SUR LA DYSFONCTION CONTRACTILE CARDIAQUE CONSECUTIVE A LA TAC

En réponse à la TAC, les animaux des deux génotypes voient leur fonction altérée par une baisse de la contractilité du VG avec une chute de la fraction de raccourcissement (FS), observée en échocardiographie (Figure 8.C et Tableau 1) (-36% pour les WT, #### p≤0.001; -60% pour les KO, #### p≤0.001, Figure 8.C). Cette chute est beaucoup plus importante chez les KO-TAC comparativement aux WT-TAC (-41%, ***p≤0.001, Figure 8.C). Ce défaut de fonction se traduit également par une augmentation du volume en fin de systole (ESV) et diastole (EDV) chez les KO-TAC en comparaison aux WT-TAC (+188%, ***p≤0.001, Figure 8.E ; +115%, ***p≤0.001, Figure 8.D).

A l'aide d'un cathéter mesurant la pression interne du VG, nous pouvons également constater la dégradation de la fonction cardiaque suite à une surcharge de pression chronique (Figure 9). Nous observons une augmentation de la pression développée (LV devP) sous TAC pour les deux génotypes (+50% pour les WT, ^{###} $p \leq 0.001$; +26% pour les KO, [#] $p \leq 0.05$, Figure 9.C) pour s'adapter à l'augmentation de la résistance de l'aorte que nous avons imposée avec la TAC. Cette pression développée est la résultante d'une augmentation de la pression du VG en fin de systole (LV sysP) soustrait à celle en fin de diastole (LV endP) dans nos deux modèles (LV sysP : +48% pour les WT, ^{###} $p \leq 0.001$; +43% pour les KO, ^{###} $p \leq 0.001$, Figure 9.A; LV endP : +199% pour les WT, ^{##} $p \leq 0.01$; +431% pour les KO, ^{###} $p \leq 0.001$, Figure 9.B). Cette pression développée, ce travail, augmente pour compenser la chute de la FS. La hausse de la LV devP est inférieure chez les KO-TAC par rapport aux WT-TAC (-21%, ^{**} $p \leq 0.01$, Figure 9.C) comme pour la LV sysP (-14%, ^{*} $p \leq 0.05$, Figure 9.A). Par contre, la hausse de la LV endP est plus importante chez les KO-TAC par rapport aux WT-TAC (+126%, ^{***} $p \leq 0.001$, Figure 9.B). Ces paramètres mettent en évidence une défaillance systolique et diastolique des souris KO Trd par rapport aux WT suite à une TAC.

Si les WT-TAC parviennent à maintenir des vitesses de contraction (dP/dtmax) et de relaxation (dP/dtmin) similaires aux WT Sham en compensant avec une pression développée plus élevée, il n'en est pas de même pour les KO-TAC (Figure 9). En effet, comparativement aux souris WT-TAC, les souris KO-TAC présentent une altération des vitesses de contraction (dP/dtmax : -39%, ^{***} $p \leq 0.001$ Figure 9.D) et de relaxation (dP/dtmin -35%, ^{**} $p \leq 0.01$, Figure 9.E). Elles perdent également de la contractilité par rapport aux KO Sham (dP/dtmax -25%, ^{##} $p \leq 0.01$, Figure 9.D).

L'ensemble de ces données physiologiques sur la fonction cardiaque démontrent que contrairement aux souris WT avec TAC, les souris KO avec TAC sont plus avancées vers une IC, avec une décompensation de leur fonction.

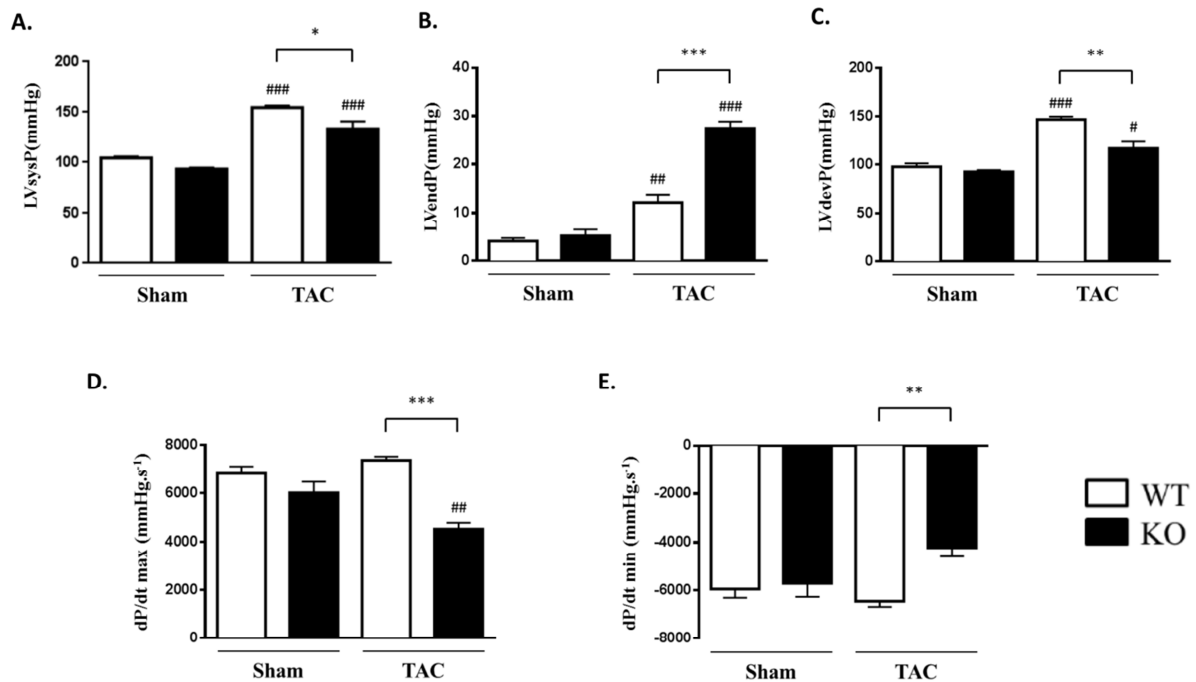


Figure 9 : La triadine préserve la fonction cardiaque dans un modèle de TAC. **A.** Pression téléystolique du VG (LVsysP) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ### $p \leq 0.001$ versus Sham ; * $p \leq 0.05$ versus WT. **B.** Pression télédiastolique du VG (LVendP) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **C.** Pression développée dans le VG (LVdevP) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$ versus Sham ; ** $p \leq 0.01$ versus WT. **D.** Vitesse maximale de l'augmentation de la pression en systole ou vitesse de contraction (dP/dt max) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ## $p \leq 0.01$ versus Sham ; *** $p \leq 0.001$ versus WT. **E.** Vitesse maximale de la diminution de la pression en diastole ou vitesse de relaxation (dP/dt min) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou TAC. ** $p \leq 0.01$ versus WT. **A à E pour chacun :** Moyenne +/- sem n=7-14 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

3. MECANISMES CELLULAIRES ET VOIES DE SIGNALISATION POTENTIELLES A L'ORIGINE DES EFFETS OBSERVES SUITE AU KNOCK-OUT DE LA TRIADINE

a) VOIES HYPERTROPHIQUES

Ayant démontré *in vivo* le rôle pro-trophique de la délétion de la triadine, il était important de définir les voies de signalisation impliquées. Parmi les voies de signalisation impliquées dans le processus hypertrophique, nous nous sommes plus particulièrement

intéressés aux voies Ca^{2+} -dépendantes comme les voies CaN-NFAT ou CaMKII, connaissant l'engagement de la triadine dans l'homéostasie calcique cardiaque (Kirchhefer et al. (2002); Kirchhefer et al. (2001); Terentyev et al. (2005); Chopra N. et al. (2009)).

L'expression de la protéine GSK-3 β reste stable quels que soient le génotype et la pathologie (Figure 10.A). Le ratio de la forme GSK-3 β phosphorylé sur la GSK-3 β totale reste à étudier car sa variation permet d'établir son activité. En ce qui concerne l'expression de la CaN (Figure 10.B), elle augmente avec la TAC pour le génotype WT (+36%, # $p \leq 0.05$ versus Sham) mais reste stable chez les KO.

Ainsi si l'hypertrophie développée chez les WT en réponse à la TAC pourrait reposer sur la voie CaN, celle activée par notre modèle KO reste à déterminer. Il ne faut pas pour autant éliminer la piste de la voie hypertrophique CaN/NFAT. En effet, même si son expression ne bouge pas, son activité pourrait augmenter chez les KO-TAC et participer au développement de son hypertrophie et d'un remodelage cardiaque délétère (Sussman et al. (1998)).

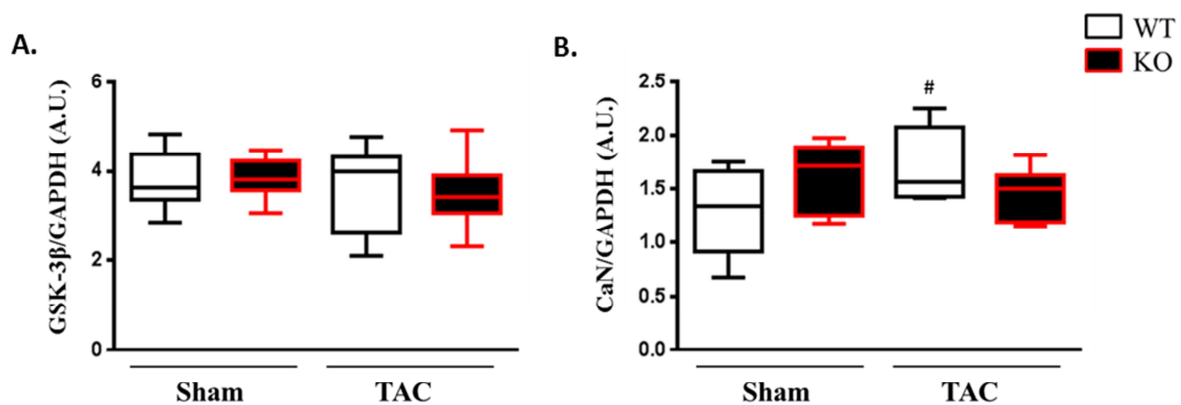


Figure 10 : La triadine et les voies hypertrophiques. **A.** Représentation graphique de l'expression protéique de la GSK-3 β dans les modèles Sham et TAC. Moyenne \pm min/max, n = 9-12 par groupe. **B.** Représentation graphique de l'expression de la CaN dans les modèles Sham et TAC. Moyenne \pm min/max, n = 8-10 par groupe, # $p \leq 0.05$ versus Sham. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

b) LA FIBROSE CARDIAQUE

Nous observons une augmentation de la fibrose dans le VG lors du remodelage cardiaque post-TAC pour les deux génotypes (+274% pour les WT, ^{####} $p \leq 0.001$ versus Sham, et + 451% pour les KO, ^{####} $p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 11). A noter que cette proportion est plus importante chez les KO sous TAC que chez les WT sous TAC (+30%, ^{***} $p \leq 0.001$, Figure 11).

Il en est de même après le traitement à l'isoprotérénol : la fibrose augmente dans le VG lors du remodelage cardiaque pour les deux génotypes (+221% pour les WT, ^{####} $p \leq 0.001$, Figure 5.E et +302 % pour les KO, ^{####} $p \leq 0.001$, Figure 5.E). Sa proportion est plus importante chez les KO+Iso que chez les WT+Iso (+24%, ^{***} $p \leq 0.001$, Figure 5.E).

Ainsi cette augmentation de fibrose pourrait participer à la diminution significative de la fonction cardiaque observée chez les souris KO Trd dans nos 2 modèles expérimentaux d'HVG.

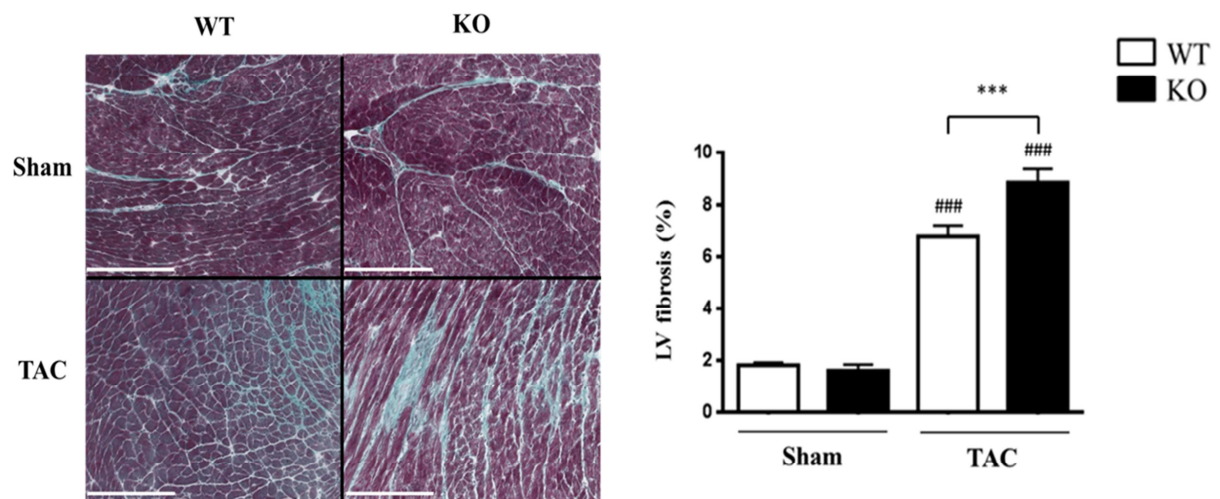


Figure 11 : Image représentative et quantification de la fibrose sur une coupe transversale de VG colorée au Trichrome de Masson. ^{####} $p \leq 0.001$ versus Sham ; ^{***} $p \leq 0.001$ versus WT. Echelle : 200 μ m. Moyenne +/- sem n=12-28 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

c) LE COMPARTIMENT MICROVASCULAIRE

Au niveau du compartiment microvasculaire, nous remarquons une diminution significative du nombre de capillaires par mm^2 entre les WT et KO en basal (-16%, $^{###}p \leq 0.001$ Figure 4.E). Comme il est clairement établi dans la littérature scientifique, ce compartiment diminue en réponse à une sténose : phénomène observé chez les WT (-10%, $^{##} p \leq 0.01$ versus Sham, Figure 4.E). Nous n'observons pas de perte additionnelle de vaisseaux chez les KO en réponse à la TAC (Figure 4.E).

Cette diminution basale du nombre de capillaires pourrait participer, via l'hypoxie qu'il entraîne, aux altérations structurelles présentes dans notre modèle, comme la fibrose, mais également à sa dysfonction contractile (étudiées dans la partie 1.2) (Shiojima et al. (2005)).

Ainsi en réponse à la TAC, les animaux KO présentent un remodelage cardiaque plus délétère que les animaux WT caractérisé par une dilatation de la cavité du VG, une augmentation du poids des poumons et de l'expression des marqueurs de l'hypertrophie. L'ensemble de ces altérations peut conduire à une transition plus précoce vers l'IC chez les animaux KO Trd, observée avec les données fonctionnelles de la partie 1.2.

d) ROLE DE LA TRIADINE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE

L'hypertrophie cardiaque décompensée ou IC se caractérise par une altération majeure de l'homéostasie calcique (Houser, Piacentino, and Weisser (2000)). Des stratégies thérapeutiques visant à normaliser le cycle calcique démontrent un rôle bénéfique sur la survenue de l'IC (Wehrens and Marks (2004)). Par sa localisation dans le RS et ses interactions physiques avec RyR2 et CSQ2, CT1 devrait avoir un rôle non négligeable dans le maintien de la contractilité cellulaire et du cycle calcique, à l'état basal et après une TAC.

Nous observons que l'expression de la CSQ2 est diminuée en réponse à la TAC chez les WT (-22%, $^{\#}p \leq 0.05$ versus Sham, Figure 12.B). Chez les KO Sham, son expression est fortement diminuée comparée aux WT (-72%, $^{***}p \leq 0.001$ versus WT, Figure 12.B). Sous TAC son expression reste diminuée par rapport aux WT (-50%, $^{***}p \leq 0.001$ versus WT, Figure 12.B). Par contre, son expression ne diminue pas plus avec la TAC chez le KO (Figure 12.B).

L'expression protéique de SERCA2a n'est pas altérée avec le génotype comme avec la pathologie (Figure 12.A). Le ratio PLB/SERCA2a est uniquement augmenté dans les WT-TAC comparativement à leur Sham (+93%, #p≤0.05 versus Sham, Figure 12.C). La phosphorylation du phospholamban sur sa sérine 16 diminue avec la TAC et est du même ordre pour les deux génotypes (WT :-50%, #p≤0.05 versus Sham, WT :-46%, #p≤0.05 versus Sham, Figure 12.D).

Ainsi, la délétion de la triadine altère le stockage du Ca²⁺ par la diminution de l'expression de la CSQ2. Cette réduction de la CSQ2, qui sensibilise RyR2 au Ca²⁺ luminal entraîne des altérations dans les dynamiques calciques (Kasneci, Kemeny-Suss, Komarova, and Chalifour (2009)), pouvant être impliquées dans la dysfonction cardiaque de notre modèle observée dans la partie 1.2.

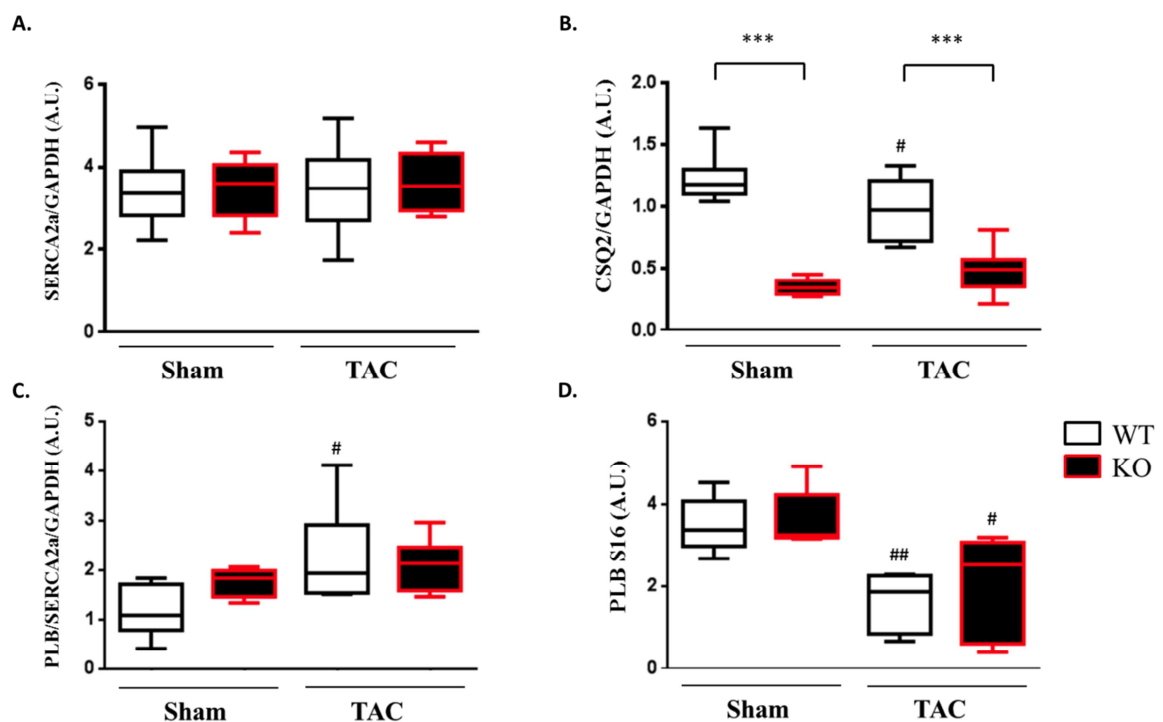


Figure 12 : Expression des protéines du RS par Western-Blot (WB) en réponse à la TAC. A. Représentation graphique de l'expression protéique de SERCA2a. Moyenne ± min/max, n = 7-12 par groupe. **B.** Représentation graphique de l'expression protéique de CSQ2. Moyenne ± min/max, n = 9-12 par groupe, #p≤0.05 versus Sham ; ***p≤0.001 versus WT. **C.:** Représentation graphique de l'expression protéique du ratio PLB/SERCA2a. Moyenne ± min/max, n = 6-9 par groupe, #p≤0.05 versus Sham. **D.** Représentation graphique de l'expression protéique de PLB S16. Moyenne ± min/max, n = 5-7 par groupe, #p≤0.05, ##p≤0.01 versus Sham. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

4. LA TRIADINE, UNE PROTEINE A POTENTIEL THERAPEUTIQUE DANS L'IC

L'IC est un problème majeur de santé publique dans la population mondiale. L'approche thérapeutique actuelle est majoritairement pharmacologique. Elle repose sur l'utilisation de molécules bloquant des voies neurohormonales ne stoppant pas la progression de l'IC. Devant ce constat, il est important de trouver de nouvelles options thérapeutiques (Lompre et al. (2010)).

Il est à noter que le niveau d'expression protéique de CT1 baisse dans des modèles pathologiques hypertrophiques murins et humains (TAC, DCM) (Figures 1 et 2).

Lors de l'IC, le cycle calcique est altéré avec des fuites de calcium du RS via RyR2 comme une baisse de la charge du RS par une diminution de l'activité de SERCA2a. Ainsi, rétablir la défaillance du cycle calcique constitue une option thérapeutique potentielle pour l'IC et les protéines qui en sont responsables comme les protéines régulatrices seraient les cibles de ces traitements (Lompre et al. (2010)). Afin d'améliorer le recaptage du calcium dans le RS, la surexpression de SERCA2a, par l'utilisation d'un adénovirus AAV1 portant SERCA2a, montre des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque lors d'un essai clinique en phase 2 sur des patients en IC avancée (Jessup et al. (2011)). Sa protéine régulatrice, le PLB, paraît également une bonne cible pour restaurer la fonction cardiaque et servir de thérapies dans des cas d'IC (Minamisawa et al. (1999)). Les fuites calciques en diastole sont des facteurs importants dans l'avancée de l'IC par le déclenchement d'arythmies. La stabilisation de RyR2 les freinera et est possible avec une approche thérapeutique : l'utilisation du JTV 519. Son action réside dans le rétablissement ou non de l'interaction entre RyR2 et sa protéine stabilisatrice la calstabin 2 ou FKBP12.6 (Hunt et al. (2007) ; Yano et al. (2000)) et fait l'objet d'un essai clinique en phase 2 depuis 2000 (James (2007)). Récemment le transfert du gène de la CSQ2, par un adénovirus dans un modèle murin souffrant de CPVT, a permis la restauration de la fonction cardiaque en prévenant les arythmies (Denegri et al. (2014)).

Nos résultats montrent que la délétion de CT1 altère l'expression de la CSQ2 (Figure 12.B). Ainsi CT1, partenaire de RyR2 comme de la CSQ2, peut également se révéler être une protéine cible et envisager pour une thérapie génique de l'IC car elle participe à la transition

vers l'IC. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de réexprimer le gène TRDN à l'aide d'un adénovirus (AAV9) donné par le Dr. Isabelle Marty dans le modèle murin KO Trd qu'elle nous a donné soumis par la suite à une TAC.

La première étape a été de vérifier que l'injection de cet AAV9 entraînait bien une réexpression de CT1 dans le cœur des souris KO Trd (Figure 13).

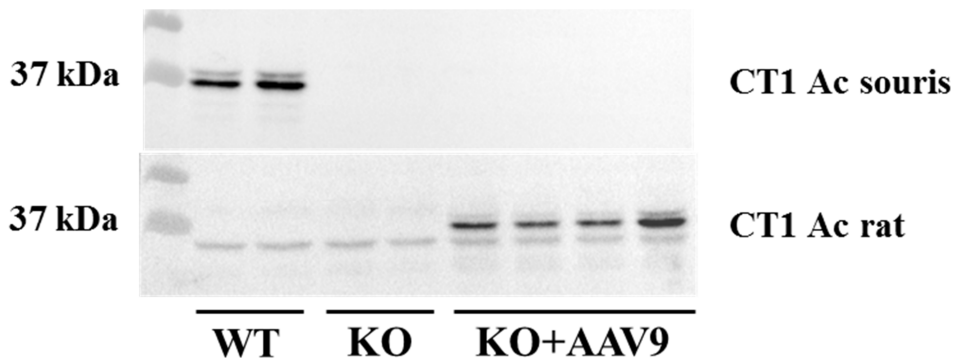


Figure 13 : Mise en évidence de la surexpression de la triadine cardiaque (CT1) de rat dans le modèle KO par l'adénovirus AAV9 CT1. n= 2-4 par groupe.

Le modèle réexprime bien la CT1 dans le cœur et ceci va nous permettre d'étudier les effets de cette réexpression dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et de l'IC suite à une TAC.

Au terme des 28 jours après opération, nous remarquons que la réexpression de CT1 entraîne une diminution de l'hypertrophie cardiaque développée par les KO-TAC et est similaire à celle développée par les WT-TAC (HW/TL : -16%, % $p \leq 0.05$ versus KO-TAC et LVW/TL : -14%, % $p \leq 0.05$ versus KO-TAC, Figures 14 A et B).

En accord avec ce remodelage cardiaque plus favorable, on note également que cette réexpression est associée à une diminution de l'œdème pulmonaire présent chez les KO en réponse à la TAC (- 40%, %% $p \leq 0.01$ versus KO-TAC, Figure 14.C).

Ainsi, la réexpression de la triadine permet de ralentir le développement d'une HVG.

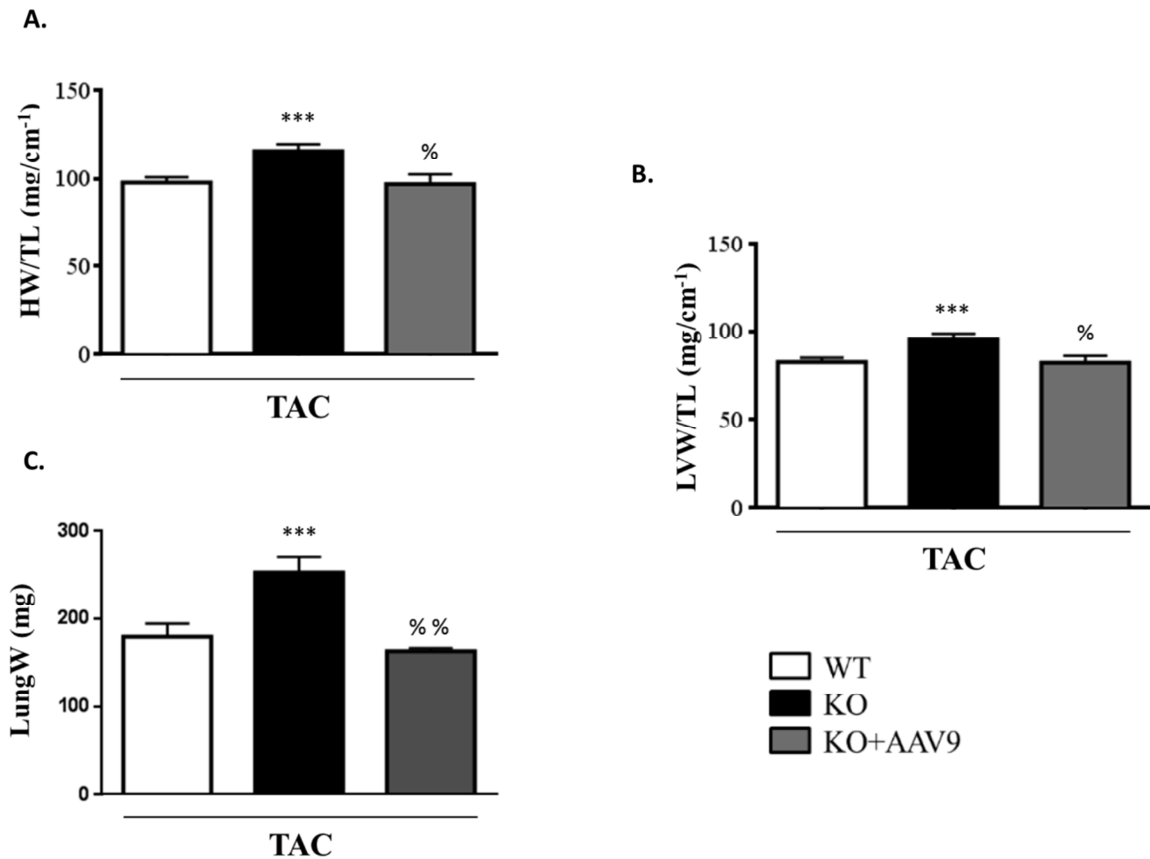


Figure 14 : La réexpression de la triadine prévient le développement de l'hypertrophie cardiaque dans un modèle de TAC. A. Ratio masse du cœur sur longueur du tibia (HW/LT) dans les génotypes indiqués après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. % $p \leq 0.05$ versus KO-TAC; *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **B.** Ratio (LVW/LT) dans les génotypes indiqués après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. % $p \leq 0.05$ versus KO-TAC; *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **C.** Poids des poumons (LungW) dans les génotypes indiqués après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. %% $p \leq 0.01$ versus KO-TAC; *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **A à C pour chacun :** Moyenne +/- sem, n=5-14 par groupe. Analyse statistique par un one-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

En réponse à la TAC, le diamètre télésystolique comme télédiastolique des animaux KO+AAV9 diminuent par rapport aux KO-TAC (LVIDd : -24%, %%% $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; +28%, *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC ; LVIDs : -38%, %%% $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; +48%, *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC, Figures 15 A et B). Les KO+AAV9-TAC développeraient une hypertrophie concentrique similaire aux WT-TAC et non excentrique comme les KO-TAC.

Un défaut de fonction cardiaque se remarque par une augmentation du volume en fin de systole (ESV) et diastole (EDV) et c'est le cas chez les KO-TAC en comparaison aux WT-TAC (ESV : +19%, *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC ; EDV : +95%, *** $p \leq 0.001$ versus WT-TAC, Figures 15.D et C). Cette dysfonction disparaît avec l'injection de l'AAV9 CT1 (ESV : -72%, %%% $p \leq 0.001$ versus KO-TAC, Figure 15.D ; EDV : -53%, %%% $p \leq 0.001$ versus KO-TAC, Figures

15.D et C). Les KO-TAC ont une baisse de leur fonction cardiaque plus importante que les WT-TAC et les KO+AAV9-TAC, avec une chute de leur fraction de raccourcissement (FS) par rapport aux deux groupes (FS : -41%, $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; +97%, $p \leq 0.001$ versus WT-TAC, Figure 15.E).

Ainsi, en plus de ralentir le développement de l'hypertrophie cardiaque en réponse à une surcharge de pression, la réexpression de la triadine améliore la fonction cardiaque.

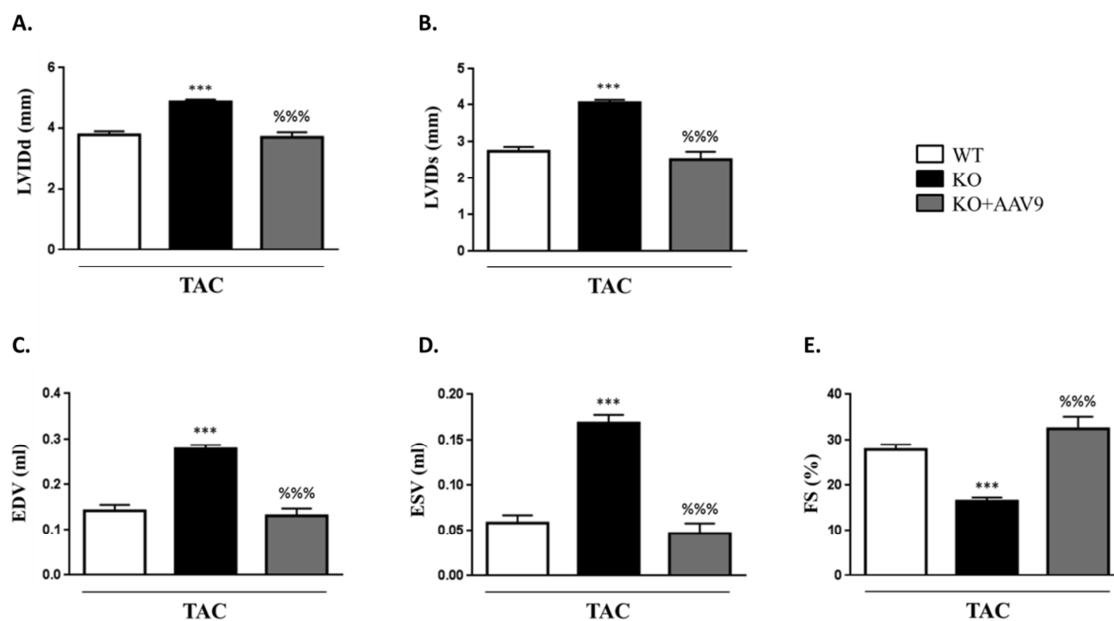


Figure 15 : La réexpression de la triadine prévient la dysfonction cardiaque dans un modèle de TAC. A. Diamètre télédiastolique du VG (LVIDd) dans les génotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **B.** Diamètre télésystolique du VG (LVIDs) dans les génotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **C.** Volume télédiastolique (EDV) dans les génotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **D.** Volume télésystolique (ESV) dans les génotypes légendés après 4 semaines TAC ± AAV9 CT1. $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **E.** Fraction de raccourcissement (FS) dans les génotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. $p \leq 0.001$ versus KO-TAC; $p \leq 0.001$ versus WT-TAC. **A à E pour chacun :** Moyenne +/- sem n=6-18 par groupe. Analyse statistique par un one-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

Ces données d'échocardiographie ont été validées par des études fonctionnelles à l'aide d'un cathéter intraventriculaire gauche. En effet, la réexpression de la triadine améliore la pression télédiastolique par rapport aux KO-TAC et revient au niveau des WT-TAC (LVendP : -65 % $p \leq 0.001$ versus KO-TAC, Figure 16.A). La vitesse de contraction est

également augmentée (dP/dt max : + 31%^{%%%} p≤0.001 versus KO-TAC, Figure 16.C). Le nombre d'animaux est insuffisant pour conclure sur les autres paramètres.

Ainsi en compilant les données fonctionnelles et anatomiques, on peut dire que la triadine joue un rôle clé dans l'amélioration de la fonction et du remodelage dans l'IC.

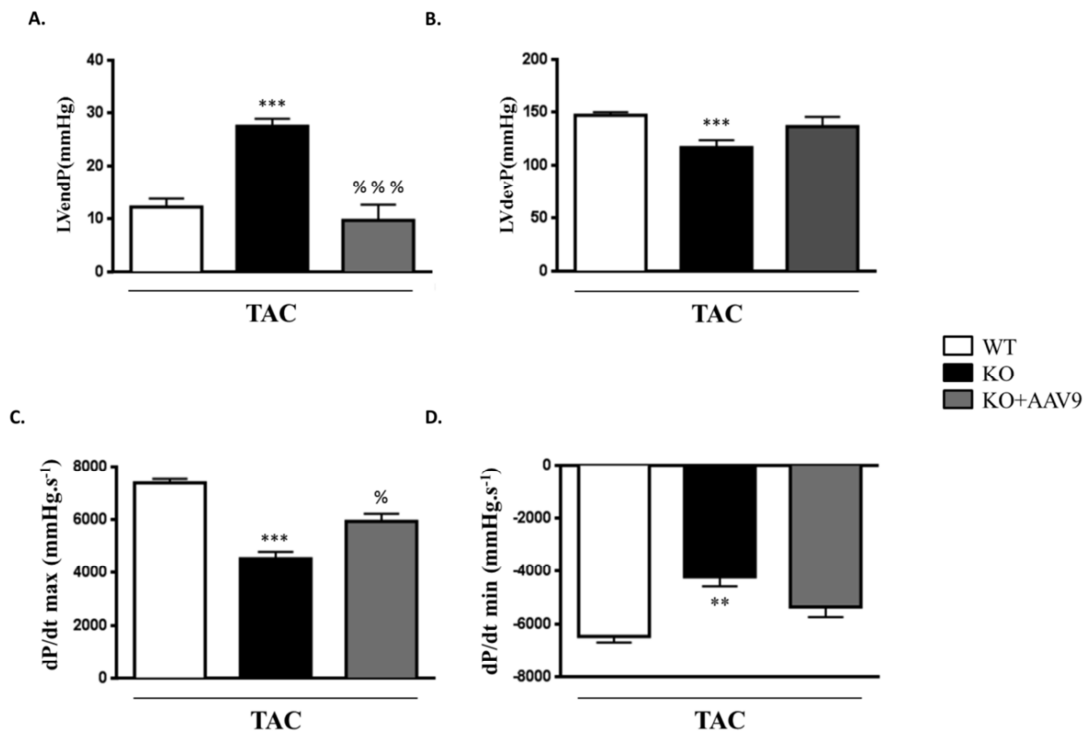


Figure 16 : La triadine préserve la fonction cardiaque dans un modèle de TAC. **A.** Pression télédiastolique du VG (LVendP) dans les géotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. ^{%%%}p≤0.001 versus KO-TAC ; *******p≤0.001 versus WT-TAC. **B.** Pression développée dans le VG (LVdevP) dans les géotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. *******p≤0.001 versus WT-TAC. **C.** Vitesse maximale de l'augmentation de la pression en systole (dP/dt max) dans les géotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. [%]p≤0.05 versus KO TAC ; *******p≤0.001 versus WT-TAC. **D.** Vitesse maximale de la diminution de la pression en diastole (dP/dt min) dans les géotypes légendés après 4 semaines de TAC ± AAV9 CT1. ******p≤0.01 versus WT-TAC. **A à D pour chacun :** Moyenne +/- SEM n=6-12 par groupe. Analyse statistique par un one-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

La réexpression de CT1 permet de restaurer en partie l'expression de la CSQ2 (Figure 17).

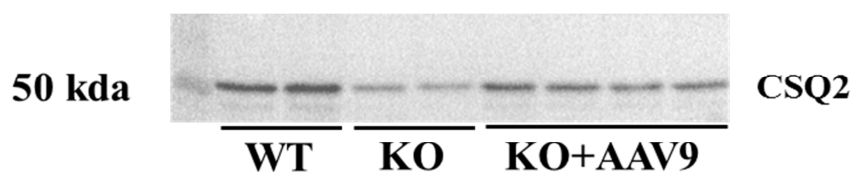


Figure 17 : Expression de la calséquestrine cardiaque (CSQ2) par WB dans nos modèles murins TAC WT, KO ± AAV9 CT1.

Ainsi, grâce à notre étude, nous montrons que comme d'autres protéines du RS comme SERCA2a (Byrne et al. (2008)) ou CSQ2 (Denegri et al. (2014)), la présence de la triadine est nécessaire à la prévention de l'hypertrophie et au maintien de la fonction cardiaque dans l'IC. Il manque dans notre étude des groupes contrôles avec l'AAV9 GFP.

PARTIE 2 : ROLE DE LA TRIADINE DANS L'ISCHEMIE CARDIAQUE - FOCUS SUR LA GENESE DES ARYTHMIES VENTRICULAIRES

L'infarctus du myocarde (IM) représente la première cause de morbidité, mortalité dans les pays industrialisés. Cette pathologie, et la mortalité associée, sont à la fois caractérisées par une dysfonction contractile (fonction mécanique de pompe) mais également par l'apparition d'arythmies ventriculaires létales. Cette dernière est le résultat de l'apparition dans un premier temps d'une zone infarctée, dépourvue de contractilité, résultat de la mort cellulaire par ischémie mais également dans un deuxième temps d'un remodelage dans la zone infarctée pour s'adapter à ce nouvel état (Gomez, Guatimosim, Dilly, Vassort, and Lederer (2001)). Les altérations dans la signalisation calcique concernent ces deux phases et de très nombreuses publications ont déjà démontré le rôle essentiel de certaines protéines du RS, en particulier RyR2. Ce canal est impliqué à la fois dans la fuite de calcium en diastole, comme dans la genèse de la dysfonction contractile et d'arythmies cardiaques au cours du processus d'ischémie cardiaque (H. Zhang et al. (2012) ; Fauconnier, Pasquie, Bideaux, Lacampagne, and Richard (2010) ; Fagnoli et al. (2013) ; Bito et al (2012) ; Wehrens et al. (2005)). A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible quant à un rôle de la Triadine sur la genèse des arythmies cardiaques au cours de l'IM.

1. LA TRIADINE ET LA FONCTION CARDIAQUE POST-IM

28 jours après l'IM, les animaux des deux génotypes montrent une dysfonction de la contractilité cardiaque avec une baisse de leur fraction d'éjection (FE) observée en échographie, non significative car notre nombre d'animaux WT PMI est insuffisant (Figure 18.C). Cette chute est plus importante chez les KO PMI comparée aux WT PMI, mais non

significative car notre n pour les WT PMI est insuffisant (Figure 18.C). Ce défaut de fonction se remarque également par une augmentation du volume en fin de systole (ESV) et diastole (EDV) chez les KO PMI en comparaison aux WT PMI, toujours non significative pour les mêmes raisons (Figures 18 A et B).

Ces résultats préliminaires montrent l'importance de la triadine dans l'établissement d'un remodelage post-IM favorable à la fonction cardiaque.

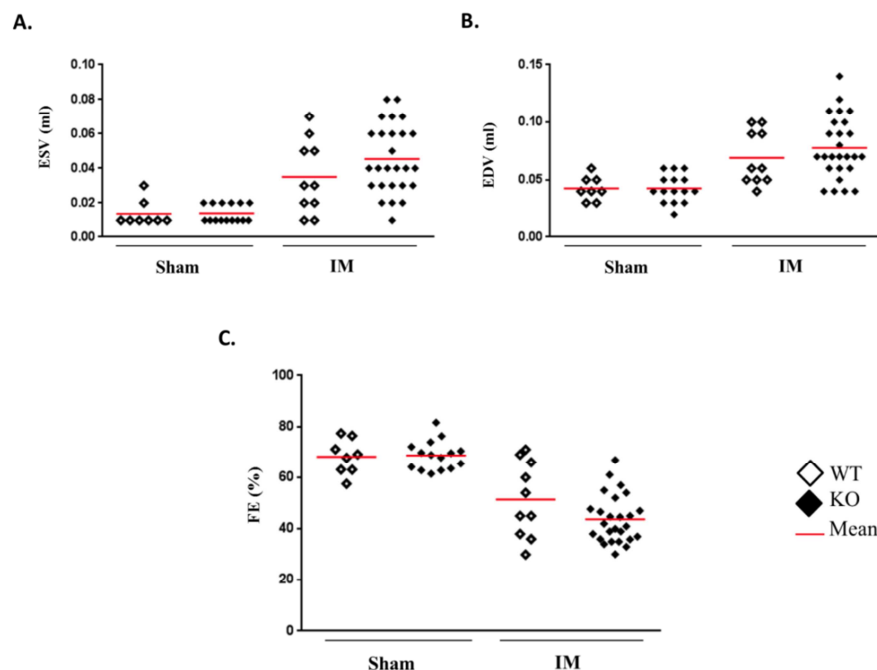


Figure 18 : La triadine prévient la dysfonction cardiaque post-IM. **A.** Volume télédiastolique (EDV) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. **B.** Volume télésystolique (ESV) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. **C.** Fraction d'éjection (FE) dans les génotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. **A à C pour chacun :** Moyenne +/- sem n=8-26 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

2. LA TRIADINE, UNE PROTEINE QUI PREVIENT LA SURVENUE D'ARYTHMIES AU COURS DE L'ISCHEMIE CARDIAQUE

a) *IN VIVO*

Nous avons étudié la fonction cardiaque électrique en utilisant l'ECG. De base, aucune différence n'est observée chez les WT et KO au niveau des intervalles de l'ECG

(Figures 19 et 20). Néanmoins, une injection d'isoprotérénol (1mg.kg^{-1}) permet de démasquer des différences. En effet, nos deux modèles répondent à l'agoniste en augmentant leur rythme cardiaque en diminuant l'intervalle RR. La réponse β -adrénergique est plus importante chez les WT (-34%, $###p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 19.A) que chez les KO (-26%, $###p \leq 0.001$ versus Sham, Figure 19.A). Ainsi l'intervalle RR est plus important chez les KO (+7%, $***p \leq 0.001$ versus WT, Figure 19.A). Si les souris WT parviennent à réduire leur intervalle PR sous l'effet de l'isoprotérénol (-11%, $###p \leq 0.001$ versus Sham, Figures 19.B et 20) ce n'est pas le cas pour les souris KO et cet intervalle reste supérieur aux WT (+7%, $***p \leq 0.001$ versus WT, Figures 19.B et 20). Ces mêmes souris augmentent même leur intervalle QT, noté QT+cM, sous l'effet du β -agoniste (+36%, $***p \leq 0.001$ versus WT, +31%, $###p \leq 0.001$ versus Sham, Figures 19.C et 20).

A l'état basal, le modèle KO ne présente aucune dysfonction. Sous l'effet des catécholamines - stimulation pharmacologique avec de l'isoprotérénol – des dysfonctions apparaissent. L'activité du nœud sinusal est altéré (intervalle RR). Les vitesses de conduction et de repolarisation cardiaques sont modifiées (intervalles PR et QT). La surcharge en calcium induite par cette situation peut être à l'origine de l'augmentation des intervalles. Cette situation est retrouvée dans des cas de mutations de RyR2 induisant un syndrome de QT long atypique avec l'exercice physique. Cela provoque également un allongement du PA, source de survenue d'arythmies (Medeiros-Domingo et al. (2009)).

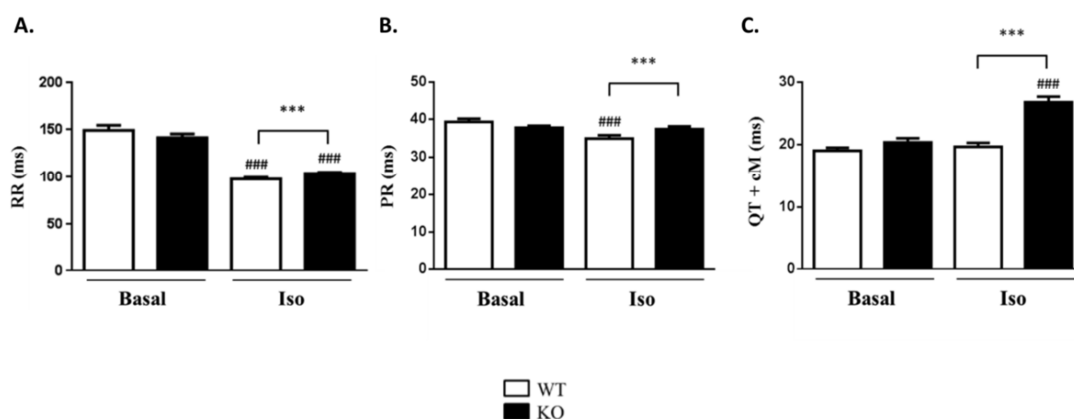


Figure 19 : La triadine préserve la fonction cardiaque lors d'une réponse bêta-adrénergique. A. L'intervalle RR (RR) lors d'un ECG dans les génotypes légendés avant et après une injection d'isoprotérénol (1 mg.kg^{-1}). $###p \leq 0.001$ versus Sham ; $***p \leq 0.05$ versus WT. B. L'intervalle PR (PR) lors d'un ECG dans les génotypes légendés avant et après une injection d'isoprotérénol (1 mg.kg^{-1}). $###p \leq 0.001$ versus Sham ; $***p \leq 0.001$ versus WT. C. L'intervalle QT corrigé (QT + cM) lors d'un ECG dans les génotypes légendés avant et après une injection d'isoprotérénol (1 mg.kg^{-1}). $###p \leq 0.001$ versus Sham ; $***p \leq 0.01$ versus WT. A à C pour chacun : Moyenne +/- SEM n=8 par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

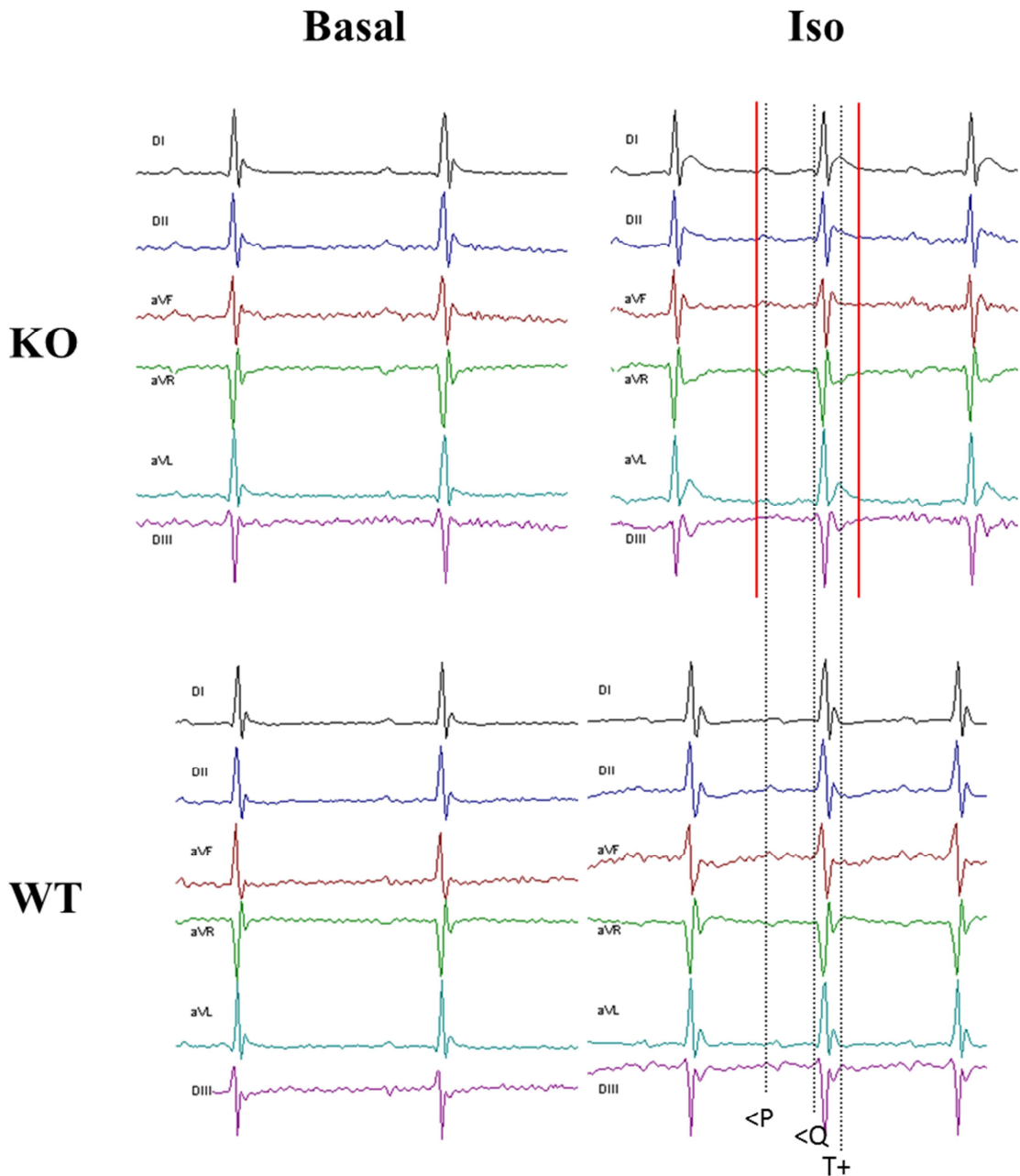


Figure 20 : Illustration par les six dérivées d'un électrocardiogramme de la prolongation des intervalles ECG chez les souris KO par l'injection d'isoprotérénol en intra-péritonéal. Les traits en pointillés matérialisent le début de l'onde P (<P>), de l'onde Q (<Q>) et un point de l'onde T (T+) chez les souris WT après l'injection d'isoprotérénol. Les traits pleins en rouge matérialisent le décalage du début de l'onde P (<P>) et du point de l'onde T (T+) chez les souris KO après l'injection d'isoprotérénol.

Après l'IM, l'intervalle QT, noté QT+cM, s'allonge sous isoprotérénol chez les KO comparativement aux Sham (+21% ^{##} p<0.01, Figure 21.A). Ainsi les KO PMI montrent un allongement de la repolarisation ventriculaire uniquement sous isoprotérénol. Ce

phénomène est synonyme d'un prolongement de la durée du PA capable de favoriser les phénomènes de réentrée et de provoquer des tachycardies (J. J. Kim et al. (2013)). Une hypothèse validée au cours de la même expérience : durant l'enregistrement on remarque que l'injection d'isoprotérénol provoque le déclenchement de tachycardies ventriculaires (VT) chez 3 souris WT PMI sur 55 alors que 36 souris KO PMI sur 57 en déclenchent (** $p \leq 0.01$, Figures 21.B et 22).

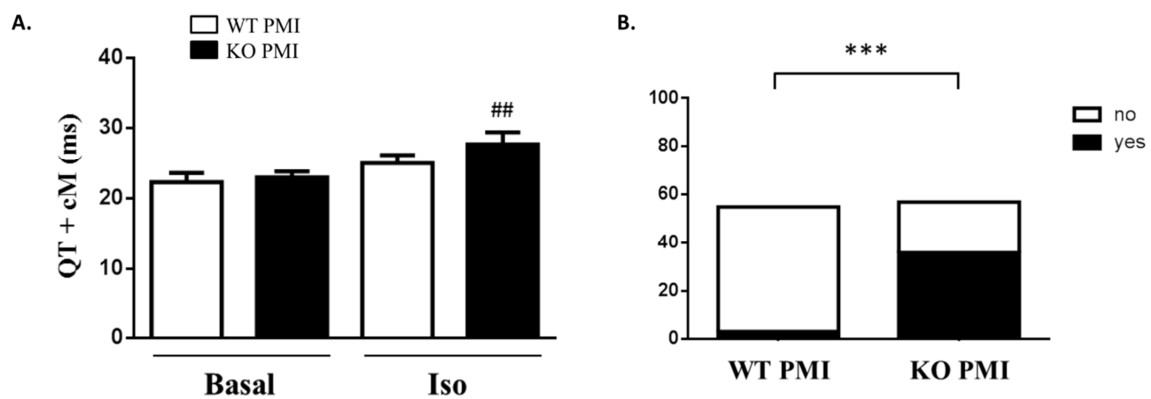


Figure 21 : La triadine préserve la fonction cardiaque lors d'une réponse bêta-adrénergique après l'IM. **A.** Intervalle QT + cM (QT + cM) lors d'un ECG dans les génotypes légendés avant et après une injection d'isoprotérénol (1 mg.kg^{-1}). ^{###} $p \leq 0.001$ versus Sham ; ^{***} $p \leq 0.05$ versus WT. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni. **B.** Représentation graphique de la survenue de tachycardie ventriculaire (TV) chez des souris WT et KO post-IM (PMI) lors de l'enregistrement d'un ECG après une injection d'isoprotérénol en IP (1 mg/kg). ^{***} $p \leq 0.05$ versus WT. $n=55-57$ par groupe. Analyse statistique par un test de Fisher.

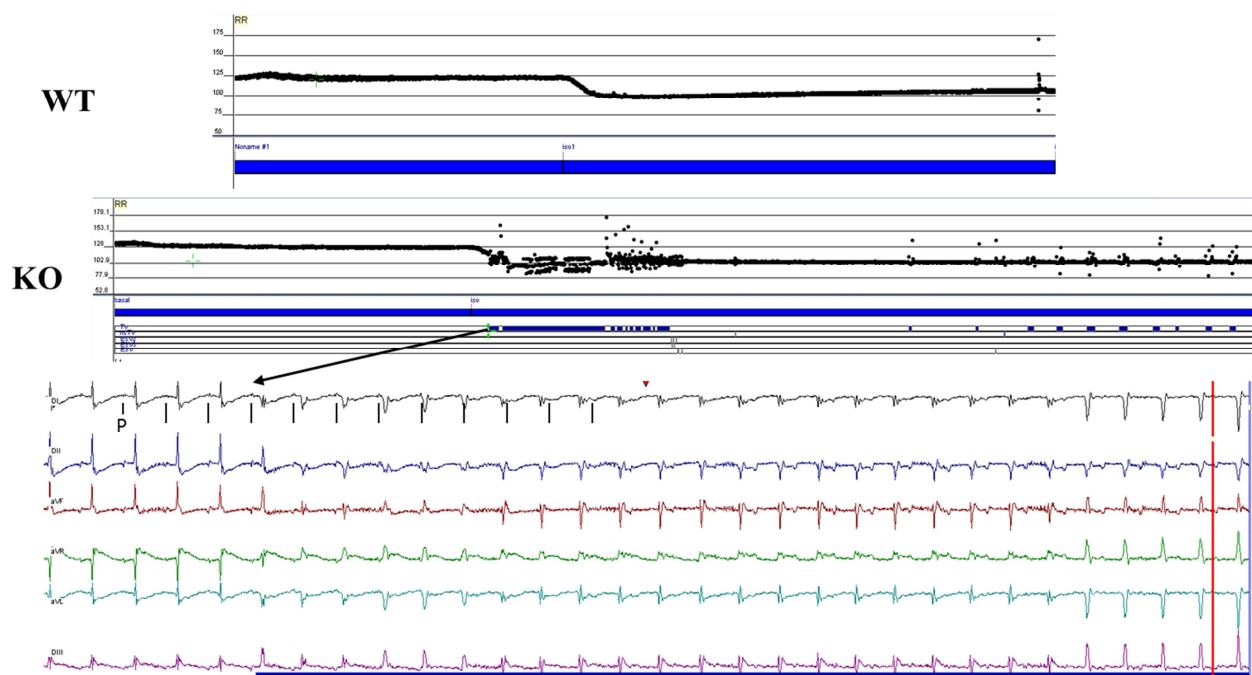


Figure 22 : Illustration par les six dérivations d'un électrocardiogramme de la survenue de tachycardies ventriculaires chez les souris KO PMI par l'injection d'isoprotérénol en intra-péritonéal.

b) IN VITRO

Afin d'expliquer les données obtenues ci-dessus en matière de variation de la durée de l'intervalle QT+cM et la survenue d'arythmies cardiaques chez les KO PMI, nous nous sommes intéressés au remodelage électrophysiologique des principaux canaux ioniques.

Dans l'étude du remodelage électrophysiologique par patch-clamp de la zone non infarctée, nous n'observons pas de modifications des canaux potassiques (données non présentées).

Les courants potassiques dominant et forment le PA (Nerbonne and Kass (2005)). Ainsi, il est normal de ne voir que très peu de modifications de ses propriétés dans nos modèles. Mais on observe quand même un prolongement de la durée du PA des WT et KO PMI comparées à leur Sham (^{##} $p \leq 0.01$, ^{###} $p \leq 0.001$ WT PMI versus WT. [&] $p \leq 0.05$, ^{&&} $p \leq 0.01$ KO PMI versus KO., Figure 23.A). Ce prolongement est plus important chez les WT que chez les KO (APD50 : +70% [§] $p \leq 0.05$, APD90 : +74% ^{§§} $p \leq 0.01$ WT PMI vs KO PMI, Figure 23.A). Ainsi, si une dysfonction cardiaque apparaît dans le modèle KO PMI, on ne peut pas dire que cela

reposerait uniquement sur l'allongement de la durée du PA car celui-ci est plus long chez les WT PMI. Le prolongement du PA pourrait être le résultat d'une dysfonction du courants I_{CaL} , étudiée ci-dessous (Figures 23 B et C) ou du cycle calcique intracellulaire.

Seuls les KO PMI possèdent un potentiel de membrane au repos plus élevé que les 3 autres groupes (Figure 23.A). Ce potentiel de membrane plus élevé peut favoriser la survenue d'arythmies, observées ci-dessus (Figures 21.B et 22). Cette différence de potentiel de membrane pourrait être provoquée par la survenue de sparks. En effet, ils peuvent influencer le potentiel de membrane au repos d'environ 5 mV (Crocini et al. (2014)). Nous observons une différence de potentiel au repos de cet ordre. Nous étudierons la contribution des sparks dans cette différence de potentiel au repos et leur survenue dans cette partie un peu plus tard (Figure 24).

On peut également émettre une autre hypothèse pour cette différence de potentiel de membrane au repos : elle peut être la conséquence d'une plus grande quantité de Ca^{2+} entrant et restant dans la cellule des KO PMI (Figure 23.C). Il est vrai que la quantité de Ca^{2+} entrant par les LTTC dans la cellule est plus importante chez les KO de base par rapport aux WT. Cette différence disparaît post-IM entre les deux génotypes sauf dans les potentiels de membrane inférieure à -40 mV ($^{\$}p \leq 0.05$ KO PMI versus WT PMI, Figure 23.C). La différence de potentiel de membrane au repos entre les WT PMI et KO PMI pourrait s'expliquer ainsi mais cela n'explique pas la différence de potentiel de membrane au repos entre les KO et les KO PMI. Pour ce faire, il serait opportun d'étudier l'activité de SERCA2a (Noble, Borysova, Wray, and Burdyga (2014)) ou de NCX (Bahlouli, Hamdache, and Riane (2008)). En effet, leur contribution à la régulation du calcium peut faire varier ce potentiel de membrane au repos et expliquer les différences entre les KO et KO PMI.

Si nous n'avons pas observé de changements dans les courants potassiques, il n'en est pas de même pour les courants calciques. On observe peu de différences pour ce courant entre les WT PMI et leur Sham à l'exception d'une amplitude diminuée, contrairement à ce qui est observé dans la littérature (Aimond et al (1999)) (Figure 23.B). Par contre, les KO Sham et PMI ont une amplitude plus faible pour le courant I_{CaL} par rapport à leurs contrôles respectifs (Figure 23.B). Par ailleurs, ce même courant s'inactive plus lentement chez les KO Sham et PMI comparativement aux WT Sham et WT PMI (Figure 23.B). Les KO PMI ont le même profil de courant I_{CaL} que leur Sham excepté l'amplitude qui diminue (Figure 23.B). Si

cette amplitude diminue avec l'IM, elle est sûrement le résultat d'une diminution de la densité des LTTC (Aggarwal and Boyden (1996)).

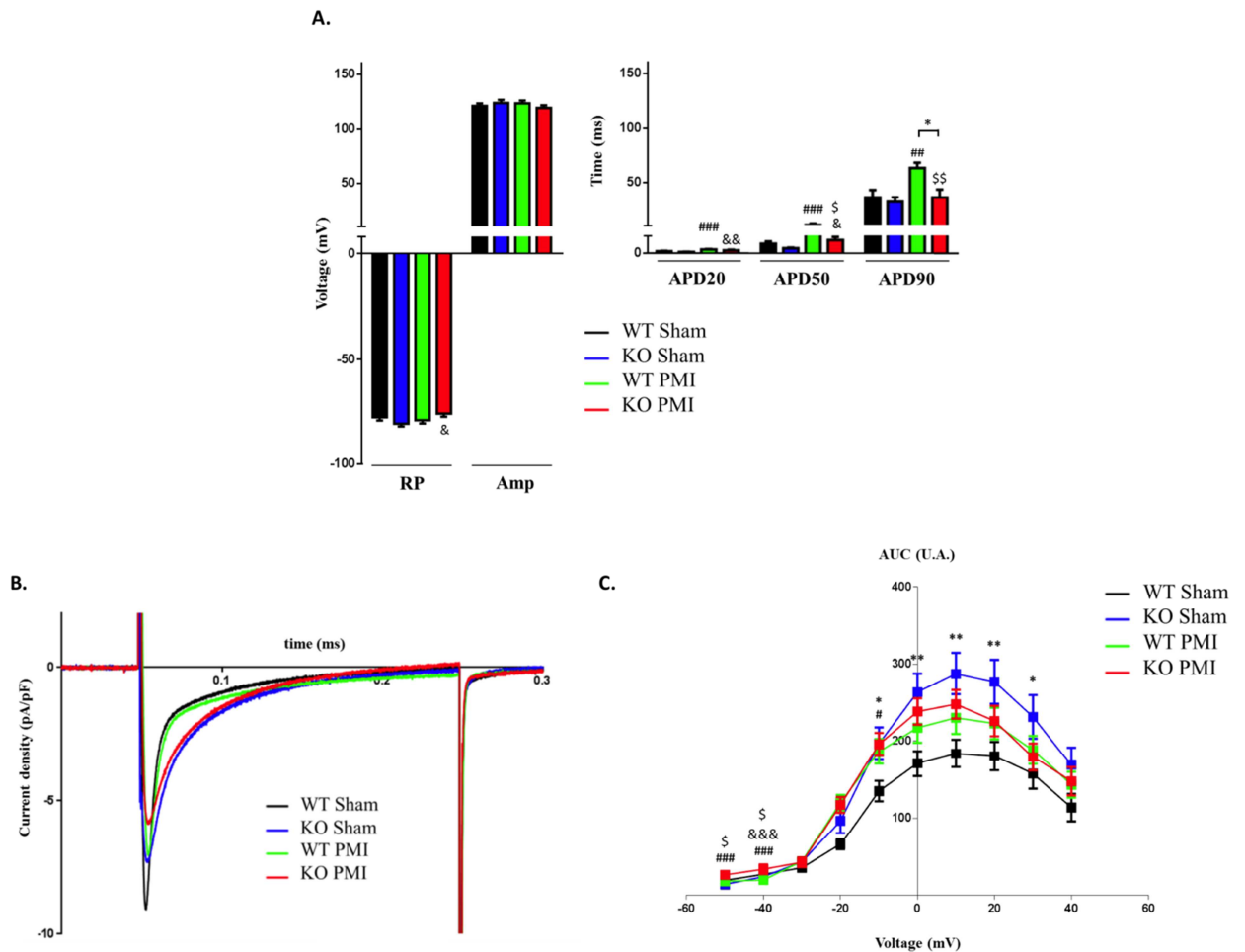


Figure 23 : La triadine et le remodelage électrophysiologique. **A.** Propriétés du potentiel d'action (AP) : potentiel de membrane au repos (resting potential), amplitude du potentiel de repos (Amp), durée du potentiel d'action (APD) 20(%), 50(%), et 90(%). * $p \leq 0.05$ KO versus WT. ### $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ WT PMI versus WT. & $p \leq 0.05$, && $p \leq 0.01$ KO PMI versus KO. § $p \leq 0.05$, §§ $p \leq 0.01$ KO PMI versus WT PMI. **B.** Courbe représentative de la densité du courant I_{CaL} au cours du temps pour les 4 groupes WT (Sham/PMI), KO (Sham/PMI). **C.** Aire sous la courbe du courant I_{CaL} pour les 4 groupes WT (Sham/PMI), KO (Sham/PMI). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ KO versus WT. # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$ WT PMI versus WT. &&& $p \leq 0.001$ KO PMI versus KO. § $p \leq 0.05$ KO PMI versus WT PMI. **A à C :** Moyenne +/- sem n= 14 à 23 cellules par groupe. Analyse statistique par un t-test.

Ainsi la délétion de CT1 altère le courant I_{CaL} dans son amplitude et son inactivation. Ce mécanisme favorise la transition vers l'IC car il provoque un courant I_{CaL} similaire à celui rencontré dans des modèles d'IC (Rossner (1991); Aggarwal and Boyden (1996)) ; Aimond et al (1999)). On retrouve des résultats similaires dans des modèles transgéniques touchant des protéines partenaires de RyR2, la sorcine (Fowler, Colotti, Chiancone, Smith, and Fearon (2008)) et la CSQ2 (Sato et al. (1998)) comme dans le modèle KO Trd de Pérez (Chopra et al (2009)).

Etant donnée la relation physique existant entre CT1 et RyR2 au sein du RS, cette étude électrophysiologique sur cardiomyocytes isolés a été complétée par la réalisation d'expériences ayant pour but d'étudier le rôle de triadine sur la fuite de calcium en diastole au cours de l'ischémie cardiaque (Figure 24).

En diastole, la survenue ou la fréquence des sparks est le reflet des propriétés d'ouverture de RyR2 (C. Zhang et al. (2014)). Nos résultats préliminaires démontrent que cette fréquence diminue chez les KO Sham et KO PMI comparativement aux WT, caractérisant une dysfonction de RyR2 par l'absence d'une de ces protéines partenaires (* $p \leq 0,05$ versus WT, *** $p \leq 0,001$ versus WT, Figure 24.B). En ce qui concerne les WT PMI, leur fréquence de sparks augmente tandis que leur amplitude de sparks diminue par l'altération de RyR2 et la diminution de l'amplitude du RS dans le remodelage après l'IM comme décrit dans la littérature (Figures 24.B et C) (Gomez et al. (1997) ; Fauconnier et al. (2010)). L'altération de RyR2 chez les KO PMI est plus accentuée avec des sparks qui durent plus longtemps (Figure 24.D) et possédant des amplitudes plus importantes (Figure 24.C). Ce phénomène pourrait favoriser un potentiel de membrane au repos plus élevé (Figure 23.A).

Ces altérations pourraient être à l'origine du déclenchement de vagues calciques au sein du cardiomyocyte (Figure 24.A) et *in vivo* des arythmies déclenchées avec l'isoprotérénol consécutivement à la surcharge du RS induite (Figures 21.B et 22).

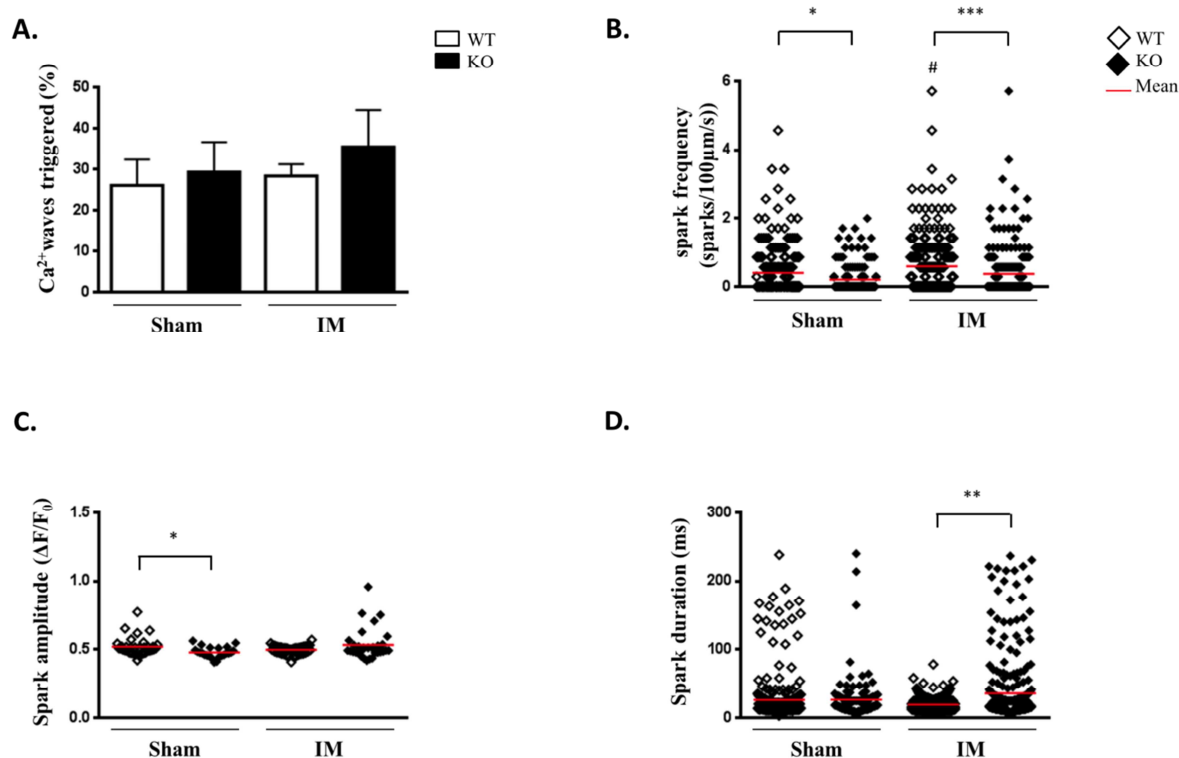


Figure 24 : La délétion de la triadine influe sur la survenue des sparks. **A.** Représentation graphique du pourcentage de déclenchement de vagues calciques (Ca^{2+} waves triggered) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. **B.** Représentation graphique de la fréquence de survenue des sparks (spark frequency) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. * $p \leq 0,05$ versus WT, *** $p \leq 0,001$ versus WT, # $p \leq 0,05$ versus Sham. **C.** Représentation graphique de l'amplitude des sparks (spark amplitude) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. * $p \leq 0,05$ versus WT. **D.** Représentation graphique de la durée des sparks (spark duration) dans les géotypes légendés après 4 semaines de Sham ou IM. * $p \leq 0,05$ versus WT. **A à D :** Moyenne. N= 23-34 cardiomyocytes par groupe. Analyse statistique par un two-way ANOVA avec analyse d'interaction et un post-test Bonferroni.

En conclusion, les travaux effectués durant ma thèse démontrent :

- 1 - que l'expression de la triadine diminue dans l'insuffisance cardiaque murine et humaine,
- 2 - que l'absence de triadine favorise la transition vers l'insuffisance cardiaque, de l'HVG à la dysfonction contractile, dans trois modèles pathologiques (TAC, Iso, IM),
- 3 - que l'absence de triadine favorise la survenue d'arythmies cardiaques post-ischémiques,
- 4 - que la réexpression de la triadine est suffisante pour prévenir l'insuffisance cardiaque dans le modèle TAC.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Lors de mon projet de thèse, nous avons essayé de définir l'implication de la triadine dans l'adaptation du cœur face à un stress.

Pour ce faire, trois modèles de pathologies cardiaques ont été réalisés sur un modèle murin dans lequel le gène de la triadine a été délété dans la totalité de l'organisme (modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty). Le premier modèle pathologique utilisé, la surcharge de pression (TAC) va permettre d'initier un processus d'hypertrophie et potentiellement à long terme une insuffisance cardiaque. Le deuxième modèle pathologique utilisé a été induit par la diffusion d'isoprotérénol et conduit à une hypertrophie. Avec la ligature de la coronaire gauche du cœur, nous obtenions un modèle d'ischémie cardiaque, l'infarctus du myocarde (IM), provoquant une insuffisance cardiaque chronique.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont permis d'apporter de nouvelles connaissances concernant l'expression et le rôle de la triadine, en particulier dans le processus hypertrophique. Nous démontrons pour la première fois 1-un rôle anti-trophique de la triadine en réponse à des stimuli hypertrophiques différents (TAC et Iso), 2-un rôle préventif de la triadine sur la survenue de l'IC dans un contexte de surcharge mécanique mais également sur la survenue d'arythmies dans le cas d'une insuffisance cardiaque chronique comme l'IM et 3-un rôle thérapeutique de la triadine dans le traitement de l'IC. Nous confirmons que comme d'autres protéines du RS l'expression de la triadine est modifiée lors de l'IC. Ce dernier point va être discuté en premier.

Importance de la triadine dans le remodelage cardiaque

Le niveau d'expression de CT1 dans l'IC est controversé. En effet, il peut diminuer (Gergs et al. (2007) ; Valle et al. (2014) ; Jones et al. (1998)) comme augmenter (Fan et al. (2004) ; Kirchhefer et al. (2004)), voire être stable (Sato et al. (1998)).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que chez l'Homme comme la souris le niveau d'expression de CT1 (ARNm et protéine) diminue dans l'HVG et l'IC. Ainsi nous retrouvons dans nos résultats le même changement d'expression-une diminution- de l'expression d'une protéine du RS, comme pour la CSQ2 et SERCA2a (Zarain-Herzberg, Estrada-Aviles, and Fragoso-Medina (2012)). La diminution du niveau d'expression de CT1

peut être la conséquence d'une augmentation de sa dégradation par l'activation du protéasome (Roux-Buisson et al. (2012)) ou par un défaut de glycosylation (Milstein et al. (2008)). Ce mécanisme peut être envisagé comme une réponse adaptative du cœur face à un stress et la triadine pourrait devenir une cible potentielle pour prévenir le syndrome de l'IC (Scimia, Gumpert, and Koch (2014). Ce point sera discuté plus tard dans la discussion.

Chez l'Homme, deux mutations sur le gène TRDN affectent la stabilité de la protéine, faisant de ces personnes des cas naturels de KO. Ces patients souffrent d'arythmies cardiaques responsables de morts subites, les TVPC (Roux-Buisson et al. (2012)).

Il était donc indispensable de disposer d'un modèle murin KO pour étudier les conséquences de ces mutations dans le cœur et savoir s'il présentait le phénotype TVPC. Pour notre étude, le modèle KO Trd, donné par Dr. Isabelle Marty est utilisé entre 2 à 4 mois. Les souris KO Trd de Pérez utilisées dans l'étude de Chopra sont âgées de 4 à 7 mois et présentent le phénotype CPVT contrairement aux nôtres (Chopra et al. (2009)). Ainsi, peut-être que le phénotype de cet autre modèle KO Trd est apparu au cours du vieillissement et que de notre côté nous n'avons pas attendu assez longtemps pour qu'il se manifeste. Nous avons pu étudier 3 souris KO âgées de 8 mois. Nous n'avons pas pu observer le phénotype CPVT. Mais nous n'avons pas utilisé le même protocole pour observer la survenue d'arythmies sous l'effet des catécholamines (isoprotérénol). Il serait donc intéressant de pouvoir vérifier si le modèle KO du Dr. Isabelle Marty présente les mêmes caractéristiques que dans l'article de Chopra en utilisant des souris plus âgées et également en utilisant l'exercice, une des conditions associées aux morts subites chez les patients souffrants de CPVT, avec l'élévation des catécholamines circulantes.

L'adaptation fonctionnelle du cœur face à une surcharge de travail repose sur l'augmentation de sa masse, l'hypertrophie. La surcharge de pression (TAC) comme l'infusion de catécholamines par MP sont des modèles capables d'entraîner cette adaptation. Les protéines du RS sont impliquées à la fois dans l'homéostasie calcique comme dans le développement de l'hypertrophie avec les deux modèles pathologiques que nous avons utilisés (Zou et al. (2011) ; Jaehnig et al. (2006) ; Mitsuyama et al (2013)).

Grâce aux données anatomiques, échographiques et cellulaires, nous avons confirmé pour la première fois dans la littérature qu'*in vivo* la délétion de la CT1 a des effets trophiques dans le cœur et dans deux modèles d'HVG différents.

Les deux modèles pathologiques que nous avons utilisés activent des voies pathologiques hypertrophiques principalement Ca^{2+} -dépendantes, CaN/NFAT et CaMKII (Zarain-Herzberg, Fragoso-Medina, and Estrada-Aviles (2011)). Si les protéines du RS et leur implication dans le développement d'une hypertrophie sont très documentées, les voies hypertrophiques activées qu'elles activent sont peu étudiées et diverses. En effet, si RyR2 active les voies CaN/NFAT et ERK1/2 (Zou et al (2010)), de son côté HRC active les voies MAPK avec la voie de la CaMKII (Park et al. (2013)) tandis que le PLB activerait uniquement la voie CaN (Louch et al. (2012)). On peut voir que les voies hypertrophiques activées par les protéines du RS sont variées et pas uniquement Ca^{2+} -dépendantes comme nous pouvions le supposer au départ. Pour stopper l'hypertrophie développée par les altérations de l'expression de ces protéines du RS, il serait peut-être plus efficace et simple de les cibler plutôt que d'inhiber les voies qu'elles activent. Notre étude n'a pas permis d'identifier les voies hypertrophiques activées par la délétion de la triadine. En effet, les résultats sur les voies hypertrophiques activées par la délétion de la triadine ne sont pas concluants et sont incomplets (GSK-3 β , CaN). L'expression de la CaN est la même entre les WT+TAC et KO+TAC. Mais l'expression de la CaN ne reflète pas son activité, responsable de l'hypertrophie (Molkentin et al. (1998)) tout comme l'expression de ses protéines régulatrices comme MCIP-1 (Aramburu et al. (2004) ; Roehrl et al. (2004)). Les effecteurs de la CaN, comme NFATc, sont également impliqués dans son action (Wilkins et al. (2002)). Ce facteur a la particularité d'être régulé avec la CSQ2 par un même facteur de transcription, Egr-1 (Kasneji et al. (2009)). Egr-1 est activé durant l'IC (Saadane et al. (1993)) et provoque l'inhibition du promoteur de la CSQ2 tout en activant NFAT (Kasneji et al. (2009)). La diminution de l'expression de la CSQ2 comme le développement de l'hypertrophie dans notre modèle KO-TAC pourrait être liés à deux facteurs de transcription Egr-1 et NFAT.

Le rapport de Gsk-3 β phosphorylée sur Gsk-3 β non phosphorylée est le meilleur indicateur pour déterminer l'activité inhibitrice d'hypertrophie de Gsk-3 β , il nous reste donc à déterminer ce rapport pour voir si elle se trouve diminuée chez les KO-TAC. Nous n'avons pas non plus regardé toutes les autres voies hypertrophiques que peuvent activer les protéines du RS : ERK1/2 (Zou et al (2010)), CaMKII (Park et al (2012)). Les voies

hypertrophiques activées dans notre modèle de mini-pompe restent à étudier et aucune voie n'est à privilégier. En effet, aucun projet avec un modèle d'hypertrophie développée par une mini-pompe d'isoprotérénol (Jaehning et al. (2006)) n'a identifié la voie hypertrophique activée par les protéines du RS.

Un autre modèle d'HVG pourrait être envisagé : l'entraînement physique. Avec notre étude nous avons montré que la présence de la triadine prévient l'hypertrophie déclenchée par les catécholamines. Dans ce contexte, la délétion de la triadine pourrait avoir un rôle dans la transition de l'hypertrophie physiologique, provoquée par l'exercice à l'hypertrophie pathologique.

Si nous avons démontré les effets trophiques de la triadine *in vivo*, il reste à identifier ses effets *in vitro*. En effet, si nous observons de base et en réponse aux stimuli hypertrophiques une hypertrophie des cardiomyocytes chez les KO, il ne faut pas oublier que ce ne sont pas les seules cellules du cœur et que des signaux paracrines des autres cellules du cœur peuvent influencer sur cette hypertrophie (Barth et al. (2000) ; Sadoshima and Izumo (1993)). Pour s'affranchir de ces signaux et identifier que la triadine a bien un rôle dans l'hypertrophie des cardiomyocytes, nous pourrions utiliser des cardiomyocytes de rats nouveau-nés infectés par un adénovirus Trd ou un adénovirus anti-sens Trd en réponse à la PE. L'utilisation de la lignée H9c2 sera plus pertinente car elle présente un phénotype adulte tout en étant capable d'être transfectée.

L'expression des gènes fœtaux et marqueurs d'hypertrophie augmente avec le temps et avec la transition vers l'IC (X. M. Li et al. (2009)) tout comme l'accumulation de collagène, de fibrose interstitielle (Sabbah, Sharov, Lesch, and Goldstein (1995)). La souris KO Trd en réponse à la TAC exprime 4 fois plus d'ANF et 2 fois de β -MHC que le modèle WT sous TAC . Son VG est également composé de plus de fibrose interstitielle avec TAC ou MP Iso. Ainsi avec notre étude, nous montrons que la triadine comme d'autres protéines du RS, SERCA2a et la CSQ2 participe à la transition vers l'IC par une augmentation de l'expression des marqueurs d'hypertrophie et la présence d'une fibrose interstitielle plus importante (Takahashi, Allen, and Izumo (1992) ; Linck et al. (2000)). L'animal KO possède de base une raréfaction capillaire qui n'impacte pas sur sa fonction cardiaque. Il y aurait donc des mécanismes de compensation de base mais qui ne seraient plus suffisants sous l'effet de nos

modèles pathologiques. A ce jour, aucune étude n'avait montré un lien entre une protéine du RS et une raréfaction capillaire. Il conviendrait d'identifier la cause de ce défaut en nombre de capillaires. Une altération de la voie pro-angiogénique du VEGF en est souvent à l'origine (pour revue : T. Oka, Akazawa, Naito, and Komuro (2014)). De plus, il existe une corrélation entre la diminution de l'expression de SERCA2a et du PLB et l'altération de la voie angiogénique VEGF (Huang et al. (2004) ; H. He et al. (2008)). Ainsi, si le lien entre les protéines du RS, le Ca^{2+} et l'angiogenèse n'est pas évident, le modèle KO Trd pourrait aider à établir ce mécanisme.

Dans notre étude, sous l'effet d'une surcharge de pression (TAC), le cœur de la souris KO Trd va s'hypertrophier pour s'adapter à ses nouvelles contraintes de charge d'après la loi de Laplace. Selon cette loi, la charge en tout point du cœur se rapporte à la valeur suivante : (pression x rayon) (2 x épaisseur de la paroi). Or la dilatation du VG développée par les souris KO en addition de l'hypertrophie ne permet pas de normaliser les contraintes, comme nous l'indiquent les données échocardiographiques et celles obtenues à l'aide des expériences de cathétérisme intraventriculaire gauche. Ainsi la délétion de la triadine conduit à un remodelage cardiaque ne permettant pas le maintien de la fonction cardiaque. Ce remodelage conduit à une dysfonction cardiaque aussi bien en diastole qu'en systole. En comparaison, les souris WT développent une hypertrophie concentrique du VG capable de maintenir leur fonction cardiaque.

La diminution de l'expression de la CSQ2, constatée dans notre étude, peut être un élément délétère dans l'adaptation de le modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty en réponse à la TAC. En effet, par son rôle de sensibilisateur au Ca^{2+} pour RyR2, son absence pourrait entraîner un défaut du CEC par l'altération des propriétés intrinsèques de RyR2 et impacter sur la fonction cardiaque. Par ailleurs, la triadine et la calséquestrine sont importantes dans l'établissement de l'ultrastructure du RS. Leur absence ou la diminution de leur expression peuvent entraîner une détérioration de l'ultrastructure participant également à la dysfonction cardiaque (Chopra et al. (2009) ; Knollmann et al. (2006)).

Notre étude est incomplète et nécessite d'étudier par exemple d'autres facteurs pouvant participer au défaut d'adaptation du modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty à la pathologie qu'on lui a imposée comme les phosphorylations de RyR2 (Reiken et al. (2003)) et la liaison de RyR2 à FKBP12.6. Cette liaison est absente dans le KO de la triadine au niveau du muscle squelettique (Eltit et al. (2010)).

Depuis plusieurs années, l'implication de SERCA2a dans le défaut de recaptage de calcium au niveau du RS est établie dans les modèles d'IC (Arai et al. (1996) ; (Yano et al. (2005)). Le maintien de son activité est indispensable premièrement à la relaxation cardiaque par le recaptage du Ca^{2+} dans le RS mais également à la contraction cardiaque en permettant le maintien d'une quantité de Ca^{2+} suffisante dans le RS à cet effet. Une approche thérapeutique a été envisagée pour augmenter son expression et sa fonction pour pallier la perte de contractilité associée à l'IC. Des molécules pharmacologiques ont prouvé leurs effets bénéfiques en augmentant la transcription ou l'expression de SERCA2a (Y. L. Sun, Hu, Wang, Hu, and Zhou (2005) ; Kubo, Margulies, Piacentino, Gaughan, and Houser (2001)). L'utilisation d'une thérapie pharmacologique ayant ses limites (effets pléiotropes), l'option de la thérapie génique s'est peu à peu imposée et a démontré son efficacité sur les performances cardiaques par la mise en place d'un essai clinique chez l'Homme : CUPID trial. Ainsi SERCA2a est maintenant considérée comme une cible essentielle dans le traitement de l'IC (Hajjar et al. (2008) ; Jaski et al. (2009)). Cette année, des résultats montrent que la réexpression de la CSQ2 dans un modèle de CPVT a un effet curatif à long terme sur l'ensemble des dysfonctions présentes dans le modèle CPVT (Denegri et al. (2014). Grâce à nos travaux, nous montrons que la réexpression de la triadine par un AAV9 (don du Dr. Isabelle Marty), peut être envisagée comme une nouvelle cible utilisée en thérapie génique pour prévenir le développement de l'IC. Notre étude montre que sa réexpression a des effets préventifs sur l'IC induite par la TAC. Ainsi par les résultats de notre étude et l'implication de la triadine dans les CPVT (Roux-Buisson et al. (2012)), il pourrait être envisagé également d'utiliser le gène de la triadine en thérapie génique dans le cadre d'un essai clinique pour traiter l'IC par l'IM. Il serait intéressant de savoir si la réexpression de la triadine présente les mêmes effets que celle de la CSQ2 sur un modèle de CPVT dans la prévention de la survenue d'arythmies dans notre modèle d'infarctus du myocarde. En outre, la réexpression de la triadine dans le modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty par l'adénovirus est effectuée avant l'imposition de la pathologie. Il serait pertinent d'effectuer cette thérapie génique après l'instauration de la pathologie cardiaque pour voir si cette réexpression a des effets curatifs, comme dans les cas de la CSQ2 et SERCA2a (Byrne et al. (2008) ; Denegri et al. (2014)).

Notre étude réalisée à l'aide de cet AAV9 reste à compléter afin d'étudier si cette réexpression est capable de ralentir le développement des éléments d'un remodelage

délétère (marqueurs d'hypertrophie, fibrose, raréfaction capillaire,...) et de maintenir la fonction cardiaque. Nous remarquons dans nos résultats que la réexpression de la triadine est capable de restaurer en partie de l'expression de la CSQ2. Dans le cas de la réexpression de la CSQ2, il y a restauration de l'expression de ces protéines partenaires, la triadine et la JNC, ainsi qu'une normalisation de la structure du RSj (Denegri et al. (2014)).

Ces résultats sont encourageants au vu du faible nombre d'animaux utilisés pour cette étude (n = 6) et l'idée d'une thérapie génique par la triadine pour lutter contre l'IC est très envisageable.

Même si le versant *in vitro* est absent de notre étude, *in vivo* la présence de la triadine ralentit le processus hypertrophique en réponse à un stress mécanique ou humoral. Comme d'autres protéines du RS, RyR2, CSQ2 et SERCA2a, elle participe à ces étapes de transition dans l'IC (Zou et al (2010) ; Haghghi et al. (2001) ; Linck et al. (2000)). Nos travaux montrent pour la première fois l'implication de la triadine dans le ralentissement de la transition vers l'IC en agissant à la fois sur le remodelage et la dysfonction cardiaque. Pour compléter notre étude sur l'implication de la triadine dans la transition vers l'IC, il conviendrait d'étudier les conséquences de la triadine sur l'état du métabolisme, de l'apoptose et des voies de survie dans nos différents modèles pathologiques (X. M. Li et al. (2009)).

Importance de la triadine dans la survenue des arythmies

Lorsque l'IM est effectué, la ligature n'est pas aussi haute qu'habituellement – sous l'oreillette gauche – mais plus basse pour éviter une morbidité précoce chez les KO. Dans ce contexte, il est très difficile d'identifier si la triadine intervient dans le remodelage trophique post-IM au vu de la variabilité de la taille de la zone infarctée. Nous n'avons pas encore pu mesurer les tailles des zones infarctées des IM chez les WT et les KO ou l'hypertrophie de leurs cardiomyocytes car cela demande une série entière d'IM et que nous nous sommes penchés en priorité sur l'impact de la triadine sur la fonction après l'IM.

La raréfaction capillaire pourrait être une des causes de la morbidité précoce chez les KO. En effet, il est important de maintenir un compartiment microvasculaire pour assurer la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde (Besnier et al. (2014)).

Sous l'effet d'une insuffisance cardiaque chronique (IM), nous démontrons pour la première fois que la délétion de la triadine conduit à un remodelage cardiaque ne permettant pas le maintien de la fonction cardiaque. Il nous reste à ajouter quelques animaux pour que nos résultats soient concluants et significatifs.

Le modèle KO Trd ne présente pas de base une dysfonction cardiaque lors de l'enregistrement de son activité par ECG. L'utilisation de catécholamines, l'isoprotérénol, entraîne une augmentation de la repolarisation ventriculaire, par l'augmentation de l'intervalle QT mais également un défaut de conduction de la dépolarisation ventriculaire. En réponse à la stimulation β -adrénergique, le rythme cardiaque des KO est moins augmenté que chez les WT. L'inactivation plus lente des canaux I_{CaL} dans le modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty pourrait être à l'origine de ce défaut de réponse β -adrénergique (nœud sinusal, conduction) (Vinogradova et al. (2006)).

Nous établissons pour la première fois grâce à nos travaux la survenue d'arythmies cardiaques dans l'IM lors de la stimulation β -adrénergique en l'absence de la triadine. L'allongement de l'intervalle QT, présent également chez KO PMI, favorise la survenue d'arythmies, comme les torsades de pointe présentes dans les syndromes du QT long (Trinkley, Page, Lien, Yamanouye, and Tisdale (2013)). Dans les myocytes ventriculaires, la stimulation des récepteurs β -AR avec l'Iso accroît la libération du Ca^{2+} du RS et de sa charge. Il est intéressant que seule la stimulation β -adrénergique altère les intervalles d'ECG des modèles KO et KO PMI. Il est possible que les LTTC situés en dehors des dyades possèdent des propriétés d'ouverture différentes et /ou que ces canaux participent au PA que sous l'effet de l'Iso et que leur inactivation plus lente participe au prolongement du PA (Chopra et al. (2009)).

Par son interaction avec RyR2 et la HRC, la triadine participe à l'homéostasie calcique au sein du cardiomyocyte lors du CEC. Cette homéostasie calcique participe également à la régulation du potentiel d'action et son altération va favoriser un PA plus long donc pro-arythmogène, comme dans l'IC cardiaque (Sipido, Stankovicova, Flameng, Vanhaecke, and Verdonck (1998)). L'accroissement de l'activité d' I_{CaL} , par l'inactivation plus lente de ce courant, peut être à l'origine de la survenue d'arythmies dans notre modèle KO PMI par

l'allongement du PA. C'est un mécanisme retrouvé dans le syndrome du QT long (Sims et al. (2008)).

Nos résultats montrent que la délétion de la triadine altère l'inactivation du courant I_{CaL} . Deux mécanismes pourraient y participer : la structure des dyades et l'homéostasie calcique.

En premier lieu, les membranes des dyades des cardiomyocytes des KO auraient une architecture altérée comme dans le modèle KO de Pérez (Chopra et al (2009)). Celle-ci entraîne une réduction de la colocalisation des LTTC avec RyR2. Cela réduirait l'inactivation des LTCC par le Ca^{2+} libéré par le RS (Adachi-Akahane, Cleemann, and Morad (1996)). Ce défaut de colocalisation pourrait également apparaître dans le modèle KO du Dr. Isabelle Marty par le développement d'une hypertrophie. Cette délocalisation peut être aussi présente si la structure des tubules-T est altérée dans les cardiomyocytes de le modèle KO du Dr. Isabelle Marty (Brette, Salle, and Orchard (2004)) . Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'utiliser la technique présente dans l'article de Crocini paru cette année qui permet de détecter le couplage entre les tubules-T et RyR2 (Crocini et al (2014)). On ne peut pas oublier que cette inactivation lente du courant I_{CaL} est la même chez les KO avant et après IM. Donc l'hypothèse de l'hypertrophie comme cause de la délocalisation des LTTC et RyR2 ne peut être retenue mais les autres possibilités restent possibles.

L'inactivation du canal LTCC dans le temps dépend principalement du Ca^{2+} lui-même et donc de l'homéostasie calcique intracellulaire au sein du cardiomyocyte. Il est vrai que le Ca^{2+} sortant du RS est le mécanisme le plus effectif pour l'inactivation d' I_{CaL} (Kubalova (2003)). Ainsi l'inactivation plus lente du courant I_{CaL} présente dans le modèle KO du Dr. Isabelle Marty pourrait avoir les mêmes mécanismes que le modèle KO Trd de Pérez : une fraction de Ca^{2+} libérée du RS plus faible (Chopra et al (2009)). Elle pourrait être le résultat d'une charge du RS plus faible par une inhibition de SERCA2a (Masaki et al. (1998)). D'autres possibilités existent pour expliquer ce phénomène : une augmentation du mode 2 de facilitation du courant I_{CaL} (Hess, Lansman, and Tsien (1984)), un changement dans la composition des sous-unités du canal favorisant la facilitation du courant I_{CaL} (Dai, Klugbauer, Zong, Seisenberger, and Hofmann (1999)) ou encore une facilitation médiée par la CaMKII (Wu, Dzhura, Colbran, and Anderson (2001)) ou la PKA (pour revue : Weiss, Oz, Benmocha, and Dascal (2013)). Si les cardiomyocytes des KO présentent de base des altérations sur son courant I_{CaL} elle n'influence en aucun cas son PA de base. Des mécanismes de compensation

ont pu être mis en place pour pallier cette dysfonction et surtout l'absence de modifications des courants potassiques permet de masquer cette altération.

Les modifications de PA observés sur les modèles PMI peuvent être imputées aux modifications de leurs courants calciques mais ne sont pas l'origine du déclenchement d'arythmies. Seuls les KO ont une altération de leur courant I_{CaL} . L'augmentation du PA chez les WT PMI ne peut être due ni au courant I_{CaL} ni aux courants potassiques. D'autres mécanismes peuvent intervenir dans le prolongement du PA : l'activité de SERCA2a. Son inhibition par des molécules pharmacologiques prolonge le PA (Noble et al (2014)). L'inhibition de NCX par des agents pharmacologiques a les mêmes effets (Bourgonje et al. (2013)). Dans notre cas, cette augmentation de la durée du PA, par la diminution de l'activité de SERCA2a et/ou NCX est insuffisante pour observer le déclenchement chez les WT PIM. Les KO PMI doivent avoir d'autres dysfonctions additionnées au prolongement du PA pour déclencher des arythmies. En effet, ce modèle possède un potentiel de membrane au repos plus élevée. Ce potentiel de membrane au repos dépend de la composition ionique intracellulaire. Nous observons une plus grande quantité de Ca^{2+} entrant dans la cellule des KO PMI à des potentiels de membrane inférieurs à 40mV. Cette augmentation de la concentration calcique intracellulaire pourrait contribuer à l'augmentation de notre potentiel de membrane (Crocini et al (2014) ; Noble et al (2013)). Il est également admis dans la littérature que la survenue de sparks intervient dans le contrôle de ce potentiel de membrane au repos comme dans la survenue d'arythmies (Crocini et al. (2014) ; Bers (2014)).

Nous avons donc étudié dans le modèle KO du Dr. Isabelle Marty la survenue des sparks (Chang et al. (1993)). Nos résultats caractérisent un défaut d'activité de RyR2 par un défaut de survenue des sparks. Des modifications des propriétés intrinsèques de RyR2 peuvent en être à l'origine. En effet, une mauvaise orientation du complexe (Oddoux et al. (2012)) comme un défaut de sensibilité au Ca^{2+} par l'absence d'une de ses protéines régulatrices (Kucerova et al. (2012)) peut affecter la probabilité d'ouverture de RyR2. Le mécanisme peut être amplifié chez les KO PIM avec la détubulation des cardiomyocytes caractéristique des modèles insuffisants (C. Zhang et al. (2014)). Cette altération de la structure des tubules-T comme le défaut d'activité de RyR2 peut également contribuer à l'allongement de l'inactivation du courant I_{CaL} du modèle KO du Dr. Isabelle Marty. Les propriétés de RyR2 sont fortement affectées par le Ca^{2+} présent dans le RS. La mesure de cette charge par le

système Ionoptix va nous permettre de préciser l'homéostasie calcique dans nos modèles pour identifier les origines de la dysfonction de RyR2, canal clé du CEC et du maintien de la fonction cardiaque.

Toutes les particularités découvertes dans nos modèles KO PMI durant nos travaux pourraient les rendre plus sensibles à la genèse des arythmies.

Si les KO PMI déclenchent des arythmies au contraire des KO d'autres éléments peuvent intervenir indépendamment du Ca^{2+} : la fibrose (Burstein et al. (2009)). Une modification de la connexine 43, caractéristique du remodelage post-IM, est également un facteur de survenue d'arythmies (O'Quinn et al. (2011)). Ces éléments restent à étudier pour déterminer pourquoi les KO PMI déclenchent des arythmies au contraire des KO et ainsi on établira que la présence de la triadine a un rôle bénéfique dans le remodelage post-IM.

L'observation du remodelage électrophysiologique des courants ioniques, nous a permis de mettre en évidence une absence de modifications des courants potassiques dans les cardiomyocytes d'un cœur post-IM. Ce n'est pas habituel car il est établi que l'IM a des conséquences sur ces courants (Kaprielian et al., 2002 ; Huang et al., 2000 ; Aimond et al., 1999) ou l'IC (Beuckelmann et al., 1993 ; Pogwizd et al., 2001). Ces modifications sont absentes car l'IM est fait assez bas et serait donc trop petit pour provoquer une altération des canaux potassiques. Il peut être également envisagée que notre modèle n'est pas assez avancé vers l'IC pour voir des modifications de ce type. Cette absence de modifications de ces canaux nous indiquent qu'ils n'ont aucun rôle dans nos modèles PMI dans l'allongement du PA et dans le modèle KO PMI pour la survenue d'arythmies (Salama, Baker, Wolk, Barhanin, and London (2009) ; Sims et al. (2008)).

Nous ne pouvons pas à l'heure actuelle trancher sur le rôle de la triadine dans le remodelage post-IM, même si nos résultats le laissent présager ainsi que les données bibliographiques. En effet, RyR2 a un rôle dans le remodelage hypertrophique post-IM par les fuites du calcium du RS en diastole (Fauconnier et al. (2010)). Il ne faut pas occulter le rôle du Ca^{2+} des LTCC, dont l'activité est altérée dans le modèle KO du Dr. Isabelle Marty, qui active des voies hypertrophiques comme la voie CaN/NFAT (Makarewich et al. (2012)). Grâce à nos travaux nous établissons pour la première fois la survenue d'arythmies cardiaques dans l'IM lors de la stimulation β -adrénergique en l'absence de la triadine.

Perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire indiquent que la triadine est une protéine essentielle à la réponse adaptative du cœur à un stress. En effet, lors d'une surcharge de pression (TAC) ou d'une diffusion de catécholamines en mini-pompes en sous-cutanée comme une insuffisance cardiaque chronique (IM), sa présence prévient un remodelage délétère du cœur.

Ainsi, on peut envisager au vu de nos résultats, l'utilisation de l'adénovirus AAV9 CT1 du Dr. Isabelle Marty, comme dans le cas de SERCA2a, en thérapie génique pour rétablir l'expression de la protéine lors de l'IC pour améliorer le remodelage et la fonction cardiaque.

Pour confirmer totalement le rôle anti-trophique de la triadine, il conviendrait d'utiliser des cultures primaires de cardiomyocytes de rats nouveau-nés ou des cardiomyocytes adultes infectés par un adénovirus triadine exprimant ou inhibant la triadine. Afin d'identifier plus précisément son influence dans la réponse cardiaque à un facteur mécanique comme dans nos modèles de TAC et IM, on pourrait utiliser le système Flexcell avec les mêmes modèles cellulaires cités précédemment.

L'équipe de Knollmann, qui a étudié également le modèle de KO Trd de Pérez, remarque qu'avec le vieillissement le modèle développe une cardiomyopathie dilatée caractérisée par une bradycardie, le déclenchement d'arythmies sous catécholamines,... Il serait intéressant de savoir si comme dans le cas de l'IC, l'expression de la triadine diminue avec l'âge. Notre modèle pourrait alors être étudié pour déterminer les mécanismes de détérioration de la fonction cardiaque au cours du vieillissement.

La délétion du gène TRDN étant présente dans l'ensemble du modèle KO Trd du Dr. Isabelle Marty, il pourrait être utilisé dans d'autres domaines que le cardio-vasculaire et le musculaire. En effet, elle se trouverait également exprimée dans l'hippocampe du cerveau murin (Li C. et al. (2011)). En étant une protéine partenaire du récepteur de la ryanodine, canal ubiquitaire, il est envisageable de l'identifier dans d'autres tissus.

Aussi, d'après des études préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire ainsi que d'après des observations rapportées par le Docteur Isabelle Marty, la triadine pourrait également intervenir dans la réponse métabolique de l'organisme. Cela montrerait pour la première fois l'implication d'une autre protéine du cycle calcique dans cette réponse même

si la junctine, sa protéine homologue, est évoquée pour son intervention dans le développement de la cardiomyopathie diabétique (Yildirim SS. et al. (2013)).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi-Akahane, S., Cleemann, L., & Morad, M. (1996). Cross-signaling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*, *108*(5), 435-454.
- Aggarwal, R., & Boyden, P. A. (1996). Altered pharmacologic responsiveness of reduced L-type calcium currents in myocytes surviving in the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*, *7*(1), 20-35.
- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res*, *97*(12), 1314-1322. doi: 10.1161/01.res.0000194329.41863.89
- Aiba, T., & Tomaselli, G. F. (2010). Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol*, *25*(1), 29-36. doi: 10.1097/HCO.0b013e328333d3d6
- Akhter, S. A., Luttrell, L. M., Rockman, H. A., Iaccarino, G., Lefkowitz, R. J., & Koch, W. J. (1998). Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*, *280*(5363), 574-577.
- Antos, C. L., McKinsey, T. A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J. M., . . . Olson, E. N. (2002). Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(2), 907-912. doi: 10.1073/pnas.231619298
- Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., . . . Wolpert, C. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*, *115*(4), 442-449. doi: 10.1161/circulationaha.106.668392
- Anversa, P., Ricci, R., & Olivetti, G. (1986). Coronary capillaries during normal and pathological growth. *Can J Cardiol*, *2*(2), 104-113.
- Arai, M., Matsui, H., & Periasamy, M. (1994). Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, *74*(4), 555-564.
- Arai, M., Suzuki, T., & Nagai, R. (1996). Sarcoplasmic reticulum genes are upregulated in mild cardiac hypertrophy but downregulated in severe cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*, *28*(8), 1583-1590. doi: 10.1006/jmcc.1996.0149
- Aramburu, J., Heitman, J., & Crabtree, G. R. (2004). Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep*, *5*(4), 343-348. doi: 10.1038/sj.embor.7400133
- Arber, S., Hunter, J. J., Ross, J., Jr., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., . . . Caroni, P. (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, *88*(3), 393-403.
- Armoundas, A. A., Wu, R., Juang, G., Marban, E., & Tomaselli, G. F. (2001). Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacol Ther*, *92*(2-3), 213-230.
- Arvanitis, D. A., Sanoudou, D., Kolokathis, F., Vafiadaki, E., Papalouka, V., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., . . . Kranias, E. G. (2008). The Ser96Ala variant in histidine-rich calcium-binding protein is associated with life-threatening ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, *29*(20), 2514-2525. doi: 10.1093/eurheartj/ehn328
- Arvanitis, D. A., Vafiadaki, E., Fan, G. C., Mitton, B. A., Gregory, K. N., Del Monte, F., . . . Kranias, E. G. (2007). Histidine-rich Ca-binding protein interacts with sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *293*(3), H1581-1589. doi: 10.1152/ajpheart.00278.2007

- Arvanitis, D. A., Vafiadaki, E., Sanoudou, D., & Kranias, E. G. (2011). Histidine-rich calcium binding protein: the new regulator of sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *J Mol Cell Cardiol*, *50*(1), 43-49. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.08.021
- Ashpole, N. M., Herren, A. W., Ginsburg, K. S., Brogan, J. D., Johnson, D. E., Cummins, T. R., . . . Hudmon, A. (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *J Biol Chem*, *287*(24), 19856-19869. doi: 10.1074/jbc.M111.322537
- Ather, S., Wang, W., Wang, Q., Li, N., Anderson, M. E., & Wehrens, X. H. (2013). Inhibition of CaMKII phosphorylation of RyR2 prevents inducible ventricular arrhythmias in mice with Duchenne muscular dystrophy. *Heart Rhythm*, *10*(4), 592-599. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.12.016
- Babiker, F. A., De Windt, L. J., van Eickels, M., Thijssen, V., Bronsauer, R. J., Grohe, C., . . . Doevendans, P. A. (2004). 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation*, *109*(2), 269-276. doi: 10.1161/01.cir.0000105682.85732.bd
- Badorff, C., Ruetten, H., Mueller, S., Stahmer, M., Gehring, D., Jung, F., . . . Dimmeler, S. (2002). Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest*, *109*(3), 373-381. doi: 10.1172/jci13779
- Bahlouli, S., Hamdache, F., & Riane, H. (2008). Modelisation of the contribution of the Na/Ca exchanger to cell membrane potential and intracellular ion concentrations. *Gen Physiol Biophys*, *27*(3), 194-202.
- Baker, K. M., Booz, G. W., & Dostal, D. E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*, *54*, 227-241. doi: 10.1146/annurev.ph.54.030192.001303
- Bal, N. C., Sharon, A., Gupta, S. C., Jena, N., Shaikh, S., Gyorke, S., & Periasamy, M. (2010). The catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation R33Q disrupts the N-terminal structural motif that regulates reversible calsequestrin polymerization. *J Biol Chem*, *285*(22), 17188-17196. doi: 10.1074/jbc.M109.096354
- Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Hall, D. D., Hell, J. W., & Kamp, T. J. (2006). Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(19), 7500-7505. doi: 10.1073/pnas.0503465103
- Baltas, L. G., Karczewski, P., & Krause, E. G. (1995). The cardiac sarcoplasmic reticulum phospholamban kinase is a distinct delta-CaM kinase isozyme. *FEBS Lett*, *373*(1), 71-75.
- Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., . . . Hare, J. M. (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, *416*(6878), 337-339. doi: 10.1038/416005a
- Barth, W., Deten, A., Bauer, M., Reinohs, M., Leicht, M., & Zimmer, H. G. (2000). Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. *J Mol Cell Cardiol*, *32*(2), 273-284. doi: 10.1006/jmcc.1999.1075
- Bauce, B., Rampazzo, A., Basso, C., Bagattin, A., Daliento, L., Tiso, N., . . . Nava, A. (2002). Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: early diagnosis of asymptomatic carriers. *J Am Coll Cardiol*, *40*(2), 341-349.

- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., & Crabtree, G. R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, 275(5308), 1930-1934.
- Belevych, A. E., Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., . . . Gyorke, S. (2009). Redox modification of ryanodine receptors underlies calcium alternans in a canine model of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res*, 84(3), 387-395. doi: 10.1093/cvr/cvp246
- Benitah, J. P., Alvarez, J. L., & Gomez, A. M. (2010). L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 48(1), 26-36. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.07.026
- Berni, R., Savi, M., Bocchi, L., Delucchi, F., Musso, E., Chaponnier, C., . . . Stilli, D. (2009). Modulation of actin isoform expression before the transition from experimental compensated pressure-overload cardiac hypertrophy to decompensation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296(5), H1625-1632. doi: 10.1152/ajpheart.01057.2008
- Bers, D. M. (2002a). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205. doi: 10.1038/415198a
- Bers, D. M. (2002b). Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci*, 7, d1697-1711.
- Bers, D. M. (2004). Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*, 37(2), 417-429. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.026
- Bers, D. M. (2012). Ryanodine receptor S2808 phosphorylation in heart failure: smoking gun or red herring. *Circ Res*, 110(6), 796-799. doi: 10.1161/circresaha.112.265579
- Bers, D. M. (2014). Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol*, 76, 107-127. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153308
- Bers, D. M., & Guo, T. (2005). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1047, 86-98. doi: 10.1196/annals.1341.008
- Bers, D. M., & Perez-Reyes, E. (1999). Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res*, 42(2), 339-360.
- Bers, D. M., Pogwizd, S. M., & Schlotthauer, K. (2002). Upregulated Na/Ca exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure. *Basic Res Cardiol*, 97 Suppl 1, I36-42.
- Besnier, M., Galaup, A., Nicol, L., Henry, J. P., Coquerel, D., Gueret, A., . . . Ouvrard-Pascaud, A. (2014). Enhanced angiogenesis and increased cardiac perfusion after myocardial infarction in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Faseb j*, 28(8), 3351-3361. doi: 10.1096/fj.13-245753
- Bezprozvanny, I., Watras, J., & Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351(6329), 751-754. doi: 10.1038/351751a0
- Bijur, G. N., & Jope, R. S. (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem*, 276(40), 37436-37442. doi: 10.1074/jbc.M105725200
- Bito, V., Biesmans, L., Gellen, B., Antoons, G., Macquaide, N., Rouet-Benzineb, P., . . . Sipido, K. R. (2013). FKBP12.6 overexpression does not protect against remodelling after myocardial infarction. *Exp Physiol*, 98(1), 134-148. doi: 10.1113/expphysiol.2011.064089
- Boateng, S. Y., Naqvi, R. U., Koban, M. U., Yacoub, M. H., MacLeod, K. T., & Boheler, K. R. (2001). Low-dose ramipril treatment improves relaxation and calcium cycling after established cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(3), H1029-1038.

- Bodor, G. S., Oakeley, A. E., Allen, P. D., Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., & Anderson, P. A. (1997). Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation*, *96*(5), 1495-1500.
- Bohm, M. (1995). Alterations of beta-adrenoceptor-G-protein-regulated adenylyl cyclase in heart failure. *Mol Cell Biochem*, *147*(1-2), 147-160.
- Bohm, M., Beuckelmann, D., Brown, L., Feiler, G., Lorenz, B., Nabauer, M., . . . Erdmann, E. (1988). Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium. *Eur Heart J*, *9*(8), 844-852.
- Bohm, M., Gierschik, P., Jakobs, K. H., Pieske, B., Schnabel, P., Ungerer, M., & Erdmann, E. (1990). Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, *82*(4), 1249-1265.
- Boknik, P., Heinroth-Hoffmann, I., Kirchhefer, U., Knapp, J., Linck, B., Luss, H., . . . Neumann, J. (2001). Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. *Cardiovasc Res*, *51*(4), 717-728.
- Boluyt, M. O., O'Neill, L., Meredith, A. L., Bing, O. H., Brooks, W. W., Conrad, C. H., . . . Lakatta, E. G. (1994). Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res*, *75*(1), 23-32.
- Boncompagni, S., Thomas, M., Lopez, J. R., Allen, P. D., Yuan, Q., Kranias, E. G., . . . Perez, C. F. (2012). Triadin/Junctin double null mouse reveals a differential role for Triadin and Junctin in anchoring CASQ to the jSR and regulating Ca(2+) homeostasis. *PLoS ONE*, *7*(7), e39962. doi: 10.1371/journal.pone.0039962
- Bourgonje, V. J., Vos, M. A., Ozdemir, S., Doisne, N., Acsai, K., Varro, A., . . . Antoons, G. (2013). Combined Na(+)/Ca(2+) exchanger and L-type calcium channel block as a potential strategy to suppress arrhythmias and maintain ventricular function. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, *6*(2), 371-379. doi: 10.1161/circep.113.000322
- Bournat, J. C., Brown, A. M., & Soler, A. P. (2000). Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappaB in PC12 cells. *J Neurosci Res*, *61*(1), 21-32.
- Brandt, N. R., Caswell, A. H., Carl, S. A., Ferguson, D. G., Brandt, T., Brunschwig, J. P., & Bassett, A. L. (1993). Detection and localization of triadin in rat ventricular muscle. *J Membr Biol*, *131*(3), 219-228.
- Brette, F., & Orchard, C. (2003). T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res*, *92*(11), 1182-1192. doi: 10.1161/01.res.0000074908.17214.f6
- Brette, F., Salle, L., & Orchard, C. H. (2004). Differential modulation of L-type Ca²⁺ current by SR Ca²⁺ release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, *95*(1), e1-7. doi: 10.1161/01.res.0000135547.53927.f6
- Briest, W., Holzl, A., Rassler, B., Deten, A., Leicht, M., Baba, H. A., & Zimmer, H. G. (2001). Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res*, *52*(2), 265-273.
- Brillantes, A. M., Allen, P., Takahashi, T., Izumo, S., & Marks, A. R. (1992). Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, *71*(1), 18-26.
- Bristow, M. R., Minobe, W. A., Reynolds, M. V., Port, J. D., Rasmussen, R., Ray, P. E., & Feldman, A. M. (1993). Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest*, *92*(6), 2737-2745. doi: 10.1172/jci116891
- Brochet, D. X., Xie, W., Yang, D., Cheng, H., & Lederer, W. J. (2011). Quarky calcium release in the heart. *Circ Res*, *108*(2), 210-218. doi: 10.1161/circresaha.110.231258
- Brodde, O. E. (1991). Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev*, *43*(2), 203-242.

- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., . . . Molkentin, J. D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo j*, *19*(23), 6341-6350. doi: 10.1093/emboj/19.23.6341
- Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., & Molkentin, J. D. (2002). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(7), 4586-4591. doi: 10.1073/pnas.072647999
- Buitrago, M., Lorenz, K., Maass, A. H., Oberdorf-Maass, S., Keller, U., Schmitteckert, E. M., . . . Engelhardt, S. (2005). The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med*, *11*(8), 837-844. doi: 10.1038/nm1272
- Burashnikov, A., & Antzelevitch, C. (1998). Acceleration-induced action potential prolongation and early afterdepolarizations. *J Cardiovasc Electrophysiol*, *9*(9), 934-948.
- Burashnikov, A., & Antzelevitch, C. (2000). Block of I(Ks) does not induce early afterdepolarization activity but promotes beta-adrenergic agonist-induced delayed afterdepolarization activity. *J Cardiovasc Electrophysiol*, *11*(4), 458-465.
- Burashnikov, A., & Antzelevitch, C. (2006). Late-phase 3 EAD. A unique mechanism contributing to initiation of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol*, *29*(3), 290-295. doi: 10.1111/j.1540-8159.2006.00336.x
- Burstein, B., Comtois, P., Michael, G., Nishida, K., Villeneuve, L., Yeh, Y. H., & Nattel, S. (2009). Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res*, *105*(12), 1213-1222. doi: 10.1161/circresaha.108.183400
- Byrne, M. J., Power, J. M., Prevolos, A., Mariani, J. A., Hajjar, R. J., & Kaye, D. M. (2008). Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther*, *15*(23), 1550-1557. doi: 10.1038/gt.2008.120
- Cai, W. F., Pritchard, T., Florea, S., Lam, C. K., Han, P., Zhou, X., . . . Kranias, E. G. (2012). Ablation of junctin or triadin is associated with increased cardiac injury following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*, *94*(2), 333-341. doi: 10.1093/cvr/cvs119
- Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L., & Colucci, W. S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest*, *101*(4), 812-818. doi: 10.1172/jci119883
- Caswell, A. H., Brandt, N. R., Brunschwig, J. P., & Purkerson, S. (1991). Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry*, *30*(30), 7507-7513.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *16*, 521-555. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- Cerrone, M., Colombi, B., Santoro, M., di Barletta, M. R., Scelsi, M., Villani, L., . . . Priori, S. G. (2005). Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res*, *96*(10), e77-82. doi: 10.1161/01.res.0000169067.51055.72
- Charpentier, F., Drouin, E., Gauthier, C., & Le Marec, H. (1993). Early after/depolarizations and triggered activity: mechanisms and autonomic regulation. *Fundam Clin Pharmacol*, *7*(1), 39-49.

- Chelu, M. G., Sarma, S., Sood, S., Wang, S., van Oort, R. J., Skapura, D. G., . . . Wehrens, X. H. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest*, *119*(7), 1940-1951.
- Chen, S. R., Zhang, L., & MacLennan, D. H. (1994). Asymmetrical blockade of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by 12-kDa FK506 binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(25), 11953-11957.
- Chen, W., Wang, R., Chen, B., Zhong, X., Kong, H., Bai, Y., . . . Chen, S. R. (2014). The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias. *Nat Med*, *20*(2), 184-192. doi: 10.1038/nm.3440
- Chen, Z., Higashiyama, A., Yaku, H., Bell, S., Fabian, J., Watkins, M. W., . . . LeWinter, M. M. (1997). Altered expression of troponin T isoforms in mild left ventricular hypertrophy in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(9), 2345-2354. doi: 10.1006/jmcc.1997.0468
- Cheng, H., & Lederer, W. J. (2008). Calcium sparks. *Physiol Rev*, *88*(4), 1491-1545. doi: 10.1152/physrev.00030.2007
- Cheng, H., Lederer, W. J., & Cannell, M. B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, *262*(5134), 740-744.
- Cheng, Y. S., Dai, D. Z., & Dai, Y. (2009). Stress-induced cardiac insufficiency relating to abnormal leptin and FKBP12.6 is ameliorated by CPU0213, an endothelin receptor antagonist, which is not affected by the CYP3A suppressing effect of erythromycin. *J Pharm Pharmacol*, *61*(5), 569-576. doi: 10.1211/jpp/61.05.0004
- Cherry, E. M., Fenton, F. H., & Gilmour, R. F., Jr. (2012). Mechanisms of ventricular arrhythmias: a dynamical systems-based perspective. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *302*(12), H2451-2463. doi: 10.1152/ajpheart.00770.2011
- Chien, A. J., Zhao, X., Shirokov, R. E., Puri, T. S., Chang, C. F., Sun, D., . . . Hosey, M. M. (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, *270*(50), 30036-30044.
- Chien, K. R. (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell*, *98*(5), 555-558.
- Chopra, N., Yang, T., Asghari, P., Moore, E. D., Huke, S., Akin, B., . . . Knollmann, B. C. (2009). Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(18), 7636-7641. doi: 10.1073/pnas.0902919106
- Clauser, E. (1998). [Molecular structure and function of angiotensin ii receptors]. *Nephrologie*, *19*(7), 403-410.
- Clerk, A., & Sugden, P. H. (1999). Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am J Cardiol*, *83*(12a), 64h-69h.
- Coghlan, V. M., Perrino, B. A., Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M., & Scott, J. D. (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*, *267*(5194), 108-111.
- Collis, L. P., Meyers, M. B., Zhang, J., Phoon, C. K., Sobie, E. A., Coetzee, W. A., & Fishman, G. I. (2007). Expression of a sorcin missense mutation in the heart modulates excitation-contraction coupling. *Faseb j*, *21*(2), 475-487. doi: 10.1096/fj.06-6292com
- Colomer, J. M., Mao, L., Rockman, H. A., & Means, A. R. (2003). Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol*, *17*(2), 183-192. doi: 10.1210/me.2002-0350

- Colomer, J. M., & Means, A. R. (2000). Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol*, *14*(8), 1125-1136. doi: 10.1210/mend.14.8.0496
- Copeland, O., Nowak, K. J., Laing, N. G., Ravenscroft, G., Messer, A. E., Bayliss, C. R., & Marston, S. B. (2010). Investigation of changes in skeletal muscle alpha-actin expression in normal and pathological human and mouse hearts. *J Muscle Res Cell Motil*, *31*(3), 207-214. doi: 10.1007/s10974-010-9224-7
- Copello, J. A., Barg, S., Onoue, H., & Fleischer, S. (1997). Heterogeneity of Ca²⁺ gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys J*, *73*(1), 141-156. doi: 10.1016/s0006-3495(97)78055-x
- Coraboeuf, E., & Nargeot, J. (1993). Electrophysiology of human cardiac cells. *Cardiovasc Res*, *27*(10), 1713-1725.
- Condeelis, P. S., Mebazaa, A., Gandolfini, M. P., Fitting, C., Marotte, F., Peynet, J., . . . Samuel, J. L. (1997). Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res*, *81*(5), 679-687.
- Crocini, C., Coppini, R., Ferrantini, C., Yan, P., Loew, L. M., Tesi, C., . . . Sacconi, L. (2014). Defects in T-tubular electrical activity underlie local alterations of calcium release in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1411557111
- D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B., & Dorn, G. W., 2nd. (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(15), 8121-8126.
- Dai, S., Klugbauer, N., Zong, X., Seisenberger, C., & Hofmann, F. (1999). The role of subunit composition on prepulse facilitation of the cardiac L-type calcium channel. *FEBS Lett*, *442*(1), 70-74.
- Damiani, E., Picello, E., Saggin, L., & Margreth, A. (1995). Identification of triadin and of histidine-rich Ca(2+)-binding protein as substrates of 60 kDa calmodulin-dependent protein kinase in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of rabbit fast muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, *209*(2), 457-465. doi: 10.1006/bbrc.1995.1524
- Davis, F. J., Gupta, M., Camoretti-Mercado, B., Schwartz, R. J., & Gupta, M. P. (2003). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *J Biol Chem*, *278*(22), 20047-20058. doi: 10.1074/jbc.M209998200
- de Meeus, A., Stephan, E., Debrus, S., Jean, M. K., Loiselet, J., Weissenbach, J., . . . Bouvagnet, P. (1995). An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res*, *77*(4), 735-740.
- de Tombe, P. P. (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech*, *36*(5), 721-730.
- Defer, N., Best-Belpomme, M., & Hanoune, J. (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol*, *279*(3), F400-416.
- Dell'Italia, L. J., Meng, Q. C., Balcells, E., Wei, C. C., Palmer, R., Hageman, G. R., . . . Oparil, S. (1997). Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J Clin Invest*, *100*(2), 253-258. doi: 10.1172/jci119529

- Denegri, M., Avelino-Cruz, J. E., Boncompagni, S., De Simone, S. A., Auricchio, A., Villani, L., . . . Priori, S. G. (2012). Viral gene transfer rescues arrhythmogenic phenotype and ultrastructural abnormalities in adult caldesmon-null mice with inherited arrhythmias. *Circ Res*, *110*(5), 663-668. doi: 10.1161/circresaha.111.263939
- Denegri, M., Bongianino, R., Lodola, F., Boncompagni, S., De Giusti, V. C., Avelino-Cruz, J. E., . . . Priori, S. G. (2014). A Single Delivery of an Adeno-Associated Viral Construct to Transfer the CASQ2 Gene to Knock-In Mice Affected by Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia is Able to Cure the Disease from Birth to Advanced Age. *Circulation*. doi: 10.1161/circulationaha.113.006901
- Dessauer, C. W. (2009). Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol*, *76*(5), 935-941. doi: 10.1124/mol.109.059345
- di Barletta, M. R., Viatchenko-Karpinski, S., Nori, A., Memmi, M., Terentyev, D., Turcato, F., . . . Priori, S. G. (2006). Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, *114*(10), 1012-1019. doi: 10.1161/circulationaha.106.623793
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, *12*(22), 3499-3511.
- Dipla, K., Mattiello, J. A., Margulies, K. B., Jeevanandam, V., & Houser, S. R. (1999). The sarcoplasmic reticulum and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger both contribute to the Ca²⁺ transient of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*, *84*(4), 435-444.
- Dolphin, A. C. (2013). The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta*, *1828*(7), 1541-1549. doi: 10.1016/j.bbame.2012.11.019
- Dorn, G. W., 2nd, Robbins, J., & Sugden, P. H. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, *92*(11), 1171-1175. doi: 10.1161/01.res.0000077012.11088.bc
- Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R. J., Balser, J. R., & Anderson, M. E. (2000). Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol*, *2*(3), 173-177. doi: 10.1038/35004052
- Edman, C. F., & Schulman, H. (1994). Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta*, *1221*(1), 89-101.
- Eghbali, M., Tomek, R., Sukhatme, V. P., Woods, C., & Bhambi, B. (1991). Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res*, *69*(2), 483-490.
- El-Armouche, A., Pamminger, T., Ditz, D., Zolk, O., & Eschenhagen, T. (2004). Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, *61*(1), 87-93.
- Eltit, J. M., Feng, W., Lopez, J. R., Padilla, I. T., Pessah, I. N., Molinski, T. F., . . . Perez, C. F. (2010). Ablation of skeletal muscle triadin impairs FKBP12/RyR1 channel interactions essential for maintaining resting cytoplasmic Ca²⁺. *J Biol Chem*, *285*(49), 38453-38462. doi: 10.1074/jbc.M110.164525
- Eltit, J. M., Szpyt, J., Li, H., Allen, P. D., & Perez, C. F. (2011). Reduced gain of excitation-contraction coupling in triadin-null myotubes is mediated by the disruption of FKBP12/RyR1 interaction. *Cell Calcium*, *49*(2), 128-135. doi: 10.1016/j.ceca.2011.01.005

- Endoh, M. (2004). Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol*, *500*(1-3), 73-86. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.013
- Erickson, J. R., He, B. J., Grumbach, I. M., & Anderson, M. E. (2011). CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev*, *91*(3), 889-915. doi: 10.1152/physrev.00018.2010
- Errami, M., Galindo, C. L., Tassa, A. T., Dimaio, J. M., Hill, J. A., & Garner, H. R. (2008). Doxycycline attenuates isoproterenol- and transverse aortic banding-induced cardiac hypertrophy in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, *324*(3), 1196-1203. doi: 10.1124/jpet.107.133975
- Fan, G. C., Gregory, K. N., Zhao, W., Park, W. J., & Kranias, E. G. (2004). Regulation of myocardial function by histidine-rich, calcium-binding protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *287*(4), H1705-1711. doi: 10.1152/ajpheart.01211.2003
- Fan, H., Brandt, N. R., & Caswell, A. H. (1995). Disulfide bonds, N-glycosylation and transmembrane topology of skeletal muscle triadin. *Biochemistry*, *34*(45), 14902-14908.
- Fargnoli, A. S., Katz, M. G., Yarnall, C., Isidro, A., Petrov, M., Steuerwald, N., . . . Bridges, C. R. (2013). Cardiac surgical delivery of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase rescues myocytes in ischemic heart failure. *Ann Thorac Surg*, *96*(2), 586-595. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.021
- Fauconnier, J., Lacampagne, A., Rauzier, J. M., Fontanaud, P., Frapier, J. M., Sejersted, O. M., . . . Richard, S. (2005). Frequency-dependent and proarrhythmogenic effects of FK-506 in rat ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *288*(2), H778-786. doi: 10.1152/ajpheart.00542.2004
- Fauconnier, J., Pasquie, J. L., Bideaux, P., Lacampagne, A., & Richard, S. (2010). Cardiomyocytes hypertrophic status after myocardial infarction determines distinct types of arrhythmia: role of the ryanodine receptor. *Prog Biophys Mol Biol*, *103*(1), 71-80. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.01.002
- Feng, Y., Tang, X. Y., Dai, D. Z., & Dai, Y. (2007). Reversal of isoproterenol-induced downregulation of phospholamban and FKBP12.6 by CPU0213-mediated antagonism of endothelin receptors. *Acta Pharmacol Sin*, *28*(11), 1746-1754. doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00650.x
- Fiedler, B., Lohmann, S. M., Smolenski, A., Linnemuller, S., Pieske, B., Schroder, F., . . . Wollert, K. C. (2002). Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(17), 11363-11368. doi: 10.1073/pnas.162100799
- Fiol, C. J., Williams, J. S., Chou, C. H., Wang, Q. M., Roach, P. J., & Andrisani, O. M. (1994). A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem*, *269*(51), 32187-32193.
- Fischer, T. H., Herting, J., Tirilomis, T., Renner, A., Neef, S., Toischer, K., . . . Sossalla, S. (2013). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation*, *128*(9), 970-981. doi: 10.1161/circulationaha.113.001746
- Fisher, S. A., & Absher, M. (1995). Norepinephrine and ANG II stimulate secretion of TGF-beta by neonatal rat cardiac fibroblasts in vitro. *Am J Physiol*, *268*(4 Pt 1), C910-917.
- Flanagan, M. F., Fujii, A. M., Colan, S. D., Flanagan, R. G., & Lock, J. E. (1991). Myocardial angiogenesis and coronary perfusion in left ventricular pressure-overload hypertrophy

- in the young lamb. Evidence for inhibition with chronic protamine administration. *Circ Res*, 68(5), 1458-1470.
- Flesch, M., Schwinger, R. H., Schiffer, F., Frank, K., Sudkamp, M., Kuhn-Regnier, F., . . . Bohm, M. (1996). Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circulation*, 94(5), 992-1002.
- Fodor, J., Gonczi, M., Sztretye, M., Dienes, B., Olah, T., Szabo, L., . . . Csernoch, L. (2008). Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca²⁺ release events and global Ca²⁺ signals in skeletal muscle cells in culture. *J Physiol*, 586(Pt 23), 5803-5818. doi: 10.1113/jphysiol.2008.160457
- Fourest-Lieuvin, A., Rendu, J., Ossenli, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S., . . . Faure, J. (2012). Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci*, 125(Pt 14), 3443-3453. doi: 10.1242/jcs.100958
- Fowler, M. R., Colotti, G., Chiancone, E., Smith, G. L., & Fearon, I. M. (2008). Sorcin modulates cardiac L-type Ca²⁺ current by functional interaction with the alpha1C subunit in rabbits. *Exp Physiol*, 93(12), 1233-1238. doi: 10.1113/expphysiol.2008.043497
- Frampton, J. E., Harrison, S. M., Boyett, M. R., & Orchard, C. H. (1991). Ca²⁺ and Na⁺ in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am J Physiol*, 261(5 Pt 1), C739-750.
- Francis, G. S., Benedict, C., Johnstone, D. E., Kirlin, P. C., Nicklas, J., Liang, C. S., . . . Yusuf, S. (1990). Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*, 82(5), 1724-1729.
- Franco, V., Chen, Y. F., Oparil, S., Feng, J. A., Wang, D., Hage, F., & Perry, G. (2004). Atrial natriuretic peptide dose-dependently inhibits pressure overload-induced cardiac remodeling. *Hypertension*, 44(5), 746-750. doi: 10.1161/01.HYP.0000144801.09557.4c
- Frey, N., McKinsey, T. A., & Olson, E. N. (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med*, 6(11), 1221-1227. doi: 10.1038/81321
- Fuchs, F., & Martyn, D. A. (2005). Length-dependent Ca²⁺ activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J Muscle Res Cell Motil*, 26(4-5), 199-212. doi: 10.1007/s10974-005-9011-z
- Garrington, T. P., & Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2), 211-218.
- Gaughan, J. P., Furukawa, S., Jeevanandam, V., Hefner, C. A., Kubo, H., Margulies, K. B., . . . Houser, S. R. (1999). Sodium/calcium exchange contributes to contraction and relaxation in failed human ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 2), H714-724.
- Gellen, B., Fernandez-Velasco, M., Briec, F., Vinet, L., LeQuang, K., Rouet-Benzineb, P., . . . Mercadier, J. J. (2008). Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling. *Circulation*, 117(14), 1778-1786. doi: 10.1161/circulationaha.107.731893
- Gergs, U., Berndt, T., Buskase, J., Jones, L. R., Kirchhefer, U., Muller, F. U., . . . Neumann, J. (2007). On the role of junctin in cardiac Ca²⁺ handling, contractility, and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(1), H728-734. doi: 10.1152/ajpheart.01187.2006
- Godecke, A., Heinicke, T., Kamkin, A., Kiseleva, I., Strasser, R. H., Decking, U. K., . . . Schrader, J. (2001). Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J Physiol*, 532(Pt 1), 195-204.

- Goldspink, P. H., McKinney, R. D., Kimball, V. A., Geenen, D. L., & Buttrick, P. M. (2001). Angiotensin II induced cardiac hypertrophy in vivo is inhibited by cyclosporin A in adult rats. *Mol Cell Biochem*, 226(1-2), 83-88.
- Gomez, A. M., Guatimosim, S., Dilly, K. W., Vassort, G., & Lederer, W. J. (2001). Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation*, 104(6), 688-693.
- Gomez, A. M., Valdivia, H. H., Cheng, H., Lederer, M. R., Santana, L. F., Cannell, M. B., . . . Lederer, W. J. (1997). Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 276(5313), 800-806.
- Gonzalez, D. R., Beigi, F., Treuer, A. V., & Hare, J. M. (2007). Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20612-20617. doi: 10.1073/pnas.0706796104
- Gonzalez, D. R., Treuer, A. V., Castellanos, J., Dulce, R. A., & Hare, J. M. (2010). Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure. *J Biol Chem*, 285(37), 28938-28945. doi: 10.1074/jbc.M110.154948
- Goonasekera, S. A., Beard, N. A., Groom, L., Kimura, T., Lyfenko, A. D., Rosenfeld, A., . . . Dirksen, R. T. (2007). Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol*, 130(4), 365-378. doi: 10.1085/jgp.200709790
- Graef, I. A., Mermelstein, P. G., Stankunas, K., Neilson, J. R., Deisseroth, K., Tsien, R. W., & Crabtree, G. R. (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, 401(6754), 703-708. doi: 10.1038/44378
- Grant, A. O. (2001). Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med*, 110(4), 296-305.
- Gregory, K. N., Ginsburg, K. S., Bodi, I., Hahn, H., Marreez, Y. M., Song, Q., . . . Kranias, E. G. (2006). Histidine-rich Ca binding protein: a regulator of sarcoplasmic reticulum calcium sequestration and cardiac function. *J Mol Cell Cardiol*, 40(5), 653-665. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.02.003
- Grimes, C. A., & Jope, R. S. (2001a). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem*, 78(6), 1219-1232.
- Grimes, C. A., & Jope, R. S. (2001b). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, 65(4), 391-426.
- Grueter, C. E., Abiria, S. A., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A. J., Mohler, P. J., . . . Colbran, R. J. (2006). L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell*, 23(5), 641-650. doi: 10.1016/j.molcel.2006.07.006
- Guo, A., Zhang, C., Wei, S., Chen, B., & Song, L. S. (2013). Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure. *Cardiovasc Res*, 98(2), 204-215. doi: 10.1093/cvr/cvt020
- Guo, T., Zhang, T., Ginsburg, K. S., Mishra, S., Brown, J. H., & Bers, D. M. (2012). CaMKII δ slows [Ca]_i decline in cardiac myocytes by promoting Ca sparks. *Biophys J*, 102(11), 2461-2470. doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.015
- Guo, W., & Campbell, K. P. (1995). Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 270(16), 9027-9030.
- Gupta, R. C., Mishra, S., Rastogi, S., Wang, M., Rousso, B., Mika, Y., . . . Sabbah, H. N. (2009). Ca(2+)-binding proteins in dogs with heart failure: effects of cardiac contractility modulation electrical signals. *Clin Transl Sci*, 2(3), 211-215. doi: 10.1111/j.1752-8062.2009.00097.x

- Gyorke, I., Hester, N., Jones, L. R., & Gyorke, S. (2004). The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J*, *86*(4), 2121-2128. doi: 10.1016/s0006-3495(04)74271-x
- Gyorke, S., & Terentyev, D. (2008). Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res*, *77*(2), 245-255. doi: 10.1093/cvr/cvm038
- Hagemann, D., Hoch, B., Krause, E. G., & Karczewski, P. (1999). Developmental changes in isoform expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit in rat heart. *J Cell Biochem*, *74*(2), 202-210.
- Haghighi, K., Kolokathis, F., Pater, L., Lynch, R. A., Asahi, M., Gramolini, A. O., . . . Kranias, E. G. (2003). Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest*, *111*(6), 869-876. doi: 10.1172/jci17892
- Hagiwara, N., Irisawa, H., & Kameyama, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*, *395*, 233-253.
- Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Fleischer, S., & Schindler, H. (1995). Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*, *270*(5), 2074-2081.
- Hainsey, T., Csiszar, A., Sun, S., & Edwards, J. G. (2002). Cyclosporin A does not block exercise-induced cardiac hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc*, *34*(8), 1249-1254.
- Hajjar, R. J., Schwinger, R. H., Schmidt, U., Kim, C. S., Lebeche, D., Doye, A. A., & Gwathmey, J. K. (2000). Myofilament calcium regulation in human myocardium. *Circulation*, *101*(14), 1679-1685.
- Hajjar, R. J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., . . . Jessup, M. (2008). Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J Card Fail*, *14*(5), 355-367. doi: 10.1016/j.cardfail.2008.02.005
- Han, P., Cai, W., Wang, Y., Lam, C. K., Arvanitis, D. A., Singh, V. P., . . . Kranias, E. G. (2011). Catecholaminergic-induced arrhythmias in failing cardiomyocytes associated with human HRCS96A variant overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *301*(4), H1588-1595. doi: 10.1152/ajpheart.01153.2010
- Handrock, R., Schroder, F., Hirt, S., Haverich, A., Mittmann, C., & Herzig, S. (1998). Single-channel properties of L-type calcium channels from failing human ventricle. *Cardiovasc Res*, *37*(2), 445-455.
- Hardt, S. E., & Sadoshima, J. (2002). Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res*, *90*(10), 1055-1063.
- Harvey, R. D., & Hell, J. W. (2013). CaV1.2 signaling complexes in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, *58*, 143-152. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.12.006
- Harwood, A. J. (2001). Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell*, *105*(7), 821-824.
- Hasenfuss, G., Mulieri, L. A., Blanchard, E. M., Holubarsch, C., Leavitt, B. J., Ittleman, F., & Alpert, N. R. (1991). Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium. Comparison with animal species. *Circ Res*, *68*(3), 836-846.
- Hasenfuss, G., & Pieske, B. (2002). Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, *34*(8), 951-969.
- Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., . . . Drexler, H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic

- reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 75(3), 434-442.
- Hasenfuss, G., Schillinger, W., Lehnart, S. E., Preuss, M., Pieske, B., Maier, L. S., . . . Just, H. (1999). Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*, 99(5), 641-648.
- He, H., Shi, M., Yang, J., Zeng, X., Qiao, H., Wu, L., & Li, L. (2008). The correlation between angiogenesis and abnormal expression of SERCA2a, phospholamban and the endothelin pathway in heart failure, and improvement by puerarin. *Phytother Res*, 22(7), 948-956. doi: 10.1002/ptr.2437
- He, Q., & LaPointe, M. C. (2000). Interleukin-1beta regulates the human brain natriuretic peptide promoter via Ca(2+)-dependent protein kinase pathways. *Hypertension*, 35(1 Pt 2), 292-296.
- Hein, L., Stevens, M. E., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Kobilka, B. K., & Dzau, V. J. (1997). Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6391-6396.
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 589-600. doi: 10.1038/nrm1983
- Heineke, J., Ruetten, H., Willenbockel, C., Gross, S. C., Naguib, M., Schaefer, A., . . . Wollert, K. C. (2005). Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1655-1660. doi: 10.1073/pnas.0405488102
- Helmes, M., Trombitas, K., & Granzier, H. (1996). Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 79(3), 619-626.
- Hempel, P., Hoch, B., Bartel, S., & Karczewski, P. (2002). Hypertrophic phenotype of cardiac calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is reversed by angiotensin converting enzyme inhibition. *Basic Res Cardiol*, 97 Suppl 1, I96-101.
- Henry, S. P., & Killilea, S. D. (1994). Purification and characterization of bovine heart glycogen synthase kinase-3. *Prep Biochem*, 24(3-4), 263-277.
- Hess, P., Lansman, J. B., & Tsien, R. W. (1984). Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature*, 311(5986), 538-544.
- Hirota, S., Zhai, P., Tomita, H., Galeotti, J., Marquez, J. P., Gao, S., . . . Sadoshima, J. (2007). Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ Res*, 101(11), 1164-1174. doi: 10.1161/circresaha.107.160614
- Ho, N., Gullberg, M., & Chatila, T. (1996). Activation protein 1-dependent transcriptional activation of interleukin 2 gene by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr. *J Exp Med*, 184(1), 101-112.
- Hobai, I. A., & O'Rourke, B. (2000). Enhanced Ca(2+)-activated Na(+)-Ca(2+) exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res*, 87(8), 690-698.
- Hobai, I. A., & O'Rourke, B. (2001). Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation*, 103(11), 1577-1584.
- Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E. G., & Karczewski, P. (1999). Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 84(6), 713-721.
- Hoffman, B. F., & Rosen, M. R. (1981). Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circ Res*, 49(1), 1-15.

- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, *17*(18), 2205-2232. doi: 10.1101/gad.1102703
- Hong, C. S., Cho, M. C., Kwak, Y. G., Song, C. H., Lee, Y. H., Lim, J. S., . . . Kim, D. H. (2002). Cardiac remodeling and atrial fibrillation in transgenic mice overexpressing junctin. *Faseb j*, *16*(10), 1310-1312. doi: 10.1096/fj.01-0908fje
- Hong, T. T., Smyth, J. W., Chu, K. Y., Vogan, J. M., Fong, T. S., Jensen, B. C., . . . Shaw, R. M. (2012). BIN1 is reduced and Cav1.2 trafficking is impaired in human failing cardiomyocytes. *Heart Rhythm*, *9*(5), 812-820. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.11.055
- Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., & Kangawa, K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*, *35*(1 Pt 1), 19-24.
- Hou, J., & Kang, Y. J. (2012). Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. *Pharmacol Ther*, *135*(3), 337-354. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.06.006
- Houser, S. R., Piacentino, V., 3rd, & Weisser, J. (2000). Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol*, *32*(9), 1595-1607.
- Hu, S. T., Liu, G. S., Shen, Y. F., Wang, Y. L., Tang, Y., & Yang, Y. J. (2011). Defective Ca(2+) handling proteins regulation during heart failure. *Physiol Res*, *60*(1), 27-37.
- Huang, Y., Hickey, R. P., Yeh, J. L., Liu, D., Dadak, A., Young, L. H., . . . Giordano, F. J. (2004). Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *Faseb j*, *18*(10), 1138-1140. doi: 10.1096/fj.04-1510fje
- Huang, Y., Liu, H., & Li, Y. (2001). Alterations in myosin heavy chain isoform gene expression during the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in rats. *Chin Med J (Engl)*, *114*(2), 183-185.
- Hudlicka, O., Brown, M., & Egginton, S. (1992). Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev*, *72*(2), 369-417.
- Hudmon, A., & Schulman, H. (2002a). Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem*, *71*, 473-510. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135410
- Hudmon, A., & Schulman, H. (2002b). Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*, *364*(Pt 3), 593-611. doi: 10.1042/bj20020228
- Huikuri, H. V., Castellanos, A., & Myerburg, R. J. (2001). Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med*, *345*(20), 1473-1482. doi: 10.1056/NEJMra000650
- Huke, S., & Bers, D. M. (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, *376*(1), 80-85. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.084
- Hunt, D. J., Jones, P. P., Wang, R., Chen, W., Bolstad, J., Chen, K., . . . Chen, S. R. (2007). K201 (JTV519) suppresses spontaneous Ca²⁺ release and [3H]ryanodine binding to RyR2 irrespective of FKBP12.6 association. *Biochem J*, *404*(3), 431-438. doi: 10.1042/bj20070135
- Huo, Y., Linares, C. O., & Kassab, G. S. (2007). Capillary perfusion and wall shear stress are restored in the coronary circulation of hypertrophic right ventricle. *Circ Res*, *100*(2), 273-283. doi: 10.1161/01.res.0000257777.83431.13
- Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M. H., & Terracciano, C. M. (2011). The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proc Biol Sci*, *278*(1719), 2714-2723. doi: 10.1098/rspb.2011.0624
- Ichinose, F., Bloch, K. D., Wu, J. C., Hataishi, R., Aretz, H. T., Picard, M. H., & Scherrer-Crosbie, M. (2004). Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in

- mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(3), H1070-1075. doi: 10.1152/ajpheart.00940.2003
- Imahori, K., & Uchida, T. (1997). Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem*, 121(2), 179-188.
- Insel, P. A., Head, B. P., Ostrom, R. S., Patel, H. H., Swaney, J. S., Tang, C. M., & Roth, D. M. (2005). Caveolae and lipid rafts: G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1047, 166-172. doi: 10.1196/annals.1341.015
- Jacob, S., Sleiman, N. H., Kern, S., Jones, L. R., Sala-Mercado, J. A., McFarland, T. P., . . . Cala, S. E. (2013). Altered calsequestrin glycan processing is common to diverse models of canine heart failure. *Mol Cell Biochem*, 377(1-2), 11-21. doi: 10.1007/s11010-013-1560-7
- Jaehnig, E. J., Heidt, A. B., Greene, S. B., Cornelissen, I., & Black, B. L. (2006). Increased susceptibility to isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and impaired weight gain in mice lacking the histidine-rich calcium-binding protein. *Mol Cell Biol*, 26(24), 9315-9326. doi: 10.1128/mcb.00482-06
- James, A. F. (2007). Inhibition of SR Ca²⁺ uptake: a novel action of the RyR2-FKBP12.6 antagonist K201. *Cardiovasc Res*, 76(2), 199-201. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.08.013
- Jansen, J. A., Noorman, M., Musa, H., Stein, M., de Jong, S., van der Nagel, R., . . . van Rijen, H. V. (2012). Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm*, 9(4), 600-607. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.11.025
- Jansen, J. A., van Veen, T. A., de Jong, S., van der Nagel, R., van Stuijvenberg, L., Driessen, H., . . . van Rijen, H. V. (2012). Reduced Cx43 expression triggers increased fibrosis due to enhanced fibroblast activity. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5(2), 380-390. doi: 10.1161/circep.111.966580
- Janssen, P. M., & Periasamy, M. (2007). Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 43(5), 523-531. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.08.012
- Jaski, B. E., Jessup, M. L., Mancini, D. M., Cappola, T. P., Pauly, D. F., Greenberg, B., . . . Hajjar, R. J. (2009). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail*, 15(3), 171-181. doi: 10.1016/j.cardfail.2009.01.013
- Jessup, M., & Brozena, S. (2003). Heart failure. *N Engl J Med*, 348(20), 2007-2018. doi: 10.1056/NEJMra021498
- Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D. F., Jaski, B., . . . Hajjar, R. J. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*, 124(3), 304-313. doi: 10.1161/circulationaha.111.022889
- Jones, L. R., Suzuki, Y. J., Wang, W., Kobayashi, Y. M., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C., . . . Morad, M. (1998). Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest*, 101(7), 1385-1393. doi: 10.1172/jci1362
- Jones, L. R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A. O., & Kelley, J. (1995). Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 270(51), 30787-30796.

- Kamp, T. J., & Hell, J. W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*, 87(12), 1095-1102.
- Kamp, T. J., Perez-Garcia, M. T., & Marban, E. (1996). Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line. *J Physiol*, 492 (Pt 1), 89-96.
- Kannankeril, P. J., Mitchell, B. M., Goonasekera, S. A., Chelu, M. G., Zhang, W., Sood, S., . . . Hamilton, S. L. (2006). Mice with the R176Q cardiac ryanodine receptor mutation exhibit catecholamine-induced ventricular tachycardia and cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 12179-12184. doi: 10.1073/pnas.0600268103
- Kao, H. Y., Verdel, A., Tsai, C. C., Simon, C., Juguilon, H., & Khochbin, S. (2001). Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem*, 276(50), 47496-47507. doi: 10.1074/jbc.M107631200
- Karch, R., Neumann, F., Ullrich, R., Neumuller, J., Podesser, B. K., Neumann, M., & Schreiner, W. (2005). The spatial pattern of coronary capillaries in patients with dilated, ischemic, or inflammatory cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol*, 14(3), 135-144. doi: 10.1016/j.carpath.2005.03.003
- Kasneci, A., Kemeny-Suss, N. M., Komarova, S. V., & Chalifour, L. E. (2009). Egr-1 negatively regulates calsequestrin expression and calcium dynamics in ventricular cells. *Cardiovasc Res*, 81(4), 695-702. doi: 10.1093/cvr/cvn357
- Kassab, G. S. (2000). The coronary vasculature and its reconstruction. *Ann Biomed Eng*, 28(8), 903-915.
- Kassab, G. S., Imoto, K., White, F. C., Rider, C. A., Fung, Y. C., & Bloor, C. M. (1993). Coronary arterial tree remodeling in right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol*, 265(1 Pt 2), H366-375.
- Kato, T., Sano, M., Miyoshi, S., Sato, T., Hakuno, D., Ishida, H., . . . Ogawa, S. (2000). Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res*, 87(10), 937-945.
- Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*, 104(4), 569-580.
- Kempf, T., & Wollert, K. C. (2004). Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays*, 26(6), 608-615. doi: 10.1002/bies.20049
- Kent, R. L., Rozich, J. D., McCollam, P. L., McDermott, D. E., Thacker, U. F., Menick, D. R., . . . Cooper, G. t. (1993). Rapid expression of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in response to cardiac pressure overload. *Am J Physiol*, 265(3 Pt 2), H1024-1029.
- Kiarash, A., Kelly, C. E., Phinney, B. S., Valdivia, H. H., Abrams, J., & Cala, S. E. (2004). Defective glycosylation of calsequestrin in heart failure. *Cardiovasc Res*, 63(2), 264-272. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.04.001
- Kim, J. J., Nemeč, J., Papp, R., Strongin, R., Abramson, J. J., & Salama, G. (2013). Bradycardia alters Ca²⁺ dynamics enhancing dispersion of repolarization and arrhythmia risk. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304(6), H848-860. doi: 10.1152/ajpheart.00787.2012
- Kim, T., Lee, J., & Im, W. (2009). Molecular dynamics studies on structure and dynamics of phospholamban monomer and pentamer in membranes. *Proteins*, 76(1), 86-98. doi: 10.1002/prot.22322
- Kirchhefer, U., Baba, H. A., Kobayashi, Y. M., Jones, L. R., Schmitz, W., & Neumann, J. (2002). Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing triadin 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(4), H1334-1343. doi: 10.1152/ajpheart.00937.2001

- Kirchhefer, U., Hanske, G., Jones, L. R., Justus, I., Kaestner, L., Lipp, P., . . . Neumann, J. (2006). Overexpression of junctin causes adaptive changes in cardiac myocyte Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium*, *39*(2), 131-142. doi: 10.1016/j.ceca.2005.10.004
- Kirchhefer, U., Jones, L. R., Begrow, F., Boknik, P., Hein, L., Lohse, M. J., . . . Neumann, J. (2004). Transgenic triadin 1 overexpression alters SR Ca²⁺ handling and leads to a blunted contractile response to beta-adrenergic agonists. *Cardiovasc Res*, *62*(1), 122-134. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.005
- Kirchhefer, U., Neumann, J., Baba, H. A., Begrow, F., Kobayashi, Y. M., Reinke, U., . . . Jones, L. R. (2001). Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem*, *276*(6), 4142-4149. doi: 10.1074/jbc.M006443200
- Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., & Neumann, J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res*, *42*(1), 254-261.
- Kirchhefer, U., Wehrmeister, D., Postma, A. V., Pohlentz, G., Mormann, M., Kucerova, D., . . . Neumann, J. (2010). The human CASQ2 mutation K206N is associated with hyperglycosylation and altered cellular calcium handling. *J Mol Cell Cardiol*, *49*(1), 95-105. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.03.006
- Kirk, J. A., Zhang, P., Murphy, A. M., & Van Eyk, J. E. (2013). Troponin I alterations detected by multiple-reaction monitoring: how might this impact the study of heart failure? *Expert Rev Proteomics*, *10*(1), 5-8. doi: 10.1586/epr.12.77
- Klee, C. B., & Krinks, M. H. (1978). Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry*, *17*(1), 120-126.
- Knoll, R., Hoshijima, M., & Chien, K. R. (2002). Muscle LIM protein in heart failure. *Exp Clin Cardiol*, *7*(2-3), 104-105.
- Knollmann, B. C. (2009). New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. *J Physiol*, *587*(Pt 13), 3081-3087. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172098
- Knollmann, B. C., Chopra, N., Hlaing, T., Akin, B., Yang, T., Etensohn, K., . . . Pfeifer, K. (2006). Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest*, *116*(9), 2510-2520. doi: 10.1172/jci29128
- Knott, A., Purcell, I., & Marston, S. (2002). In vitro motility analysis of thin filaments from failing and non-failing human heart: troponin from failing human hearts induces slower filament sliding and higher Ca²⁺ sensitivity. *J Mol Cell Cardiol*, *34*(4), 469-482. doi: 10.1006/jmcc.2002.1528
- Kobayashi, Y. M., Alseikhan, B. A., & Jones, L. R. (2000). Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem*, *275*(23), 17639-17646. doi: 10.1074/jbc.M002091200
- Kohno, M., Yano, M., Kobayashi, S., Doi, M., Oda, T., Tokuhisa, T., . . . Matsuzaki, M. (2003). A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *284*(3), H1035-1042. doi: 10.1152/ajpheart.00722.2002
- Kolodziejczyk, S. M., Wang, L., Balazsi, K., DeRepentigny, Y., Kothary, R., & Megeney, L. A. (1999). MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Current Biology*, *9*(20), 1203-1206. doi: 10.1016/s0960-9822(00)80027-5

- Kostin, S., Scholz, D., Shimada, T., Maeno, Y., Mollnau, H., Hein, S., & Schaper, J. (1998). The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res*, *294*(3), 449-460.
- Koval, O. M., Guan, X., Wu, Y., Joiner, M. L., Gao, Z., Chen, B., . . . Anderson, M. E. (2010). CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(11), 4996-5000. doi: 10.1073/pnas.0913760107
- Kranias, E. G., & Hajjar, R. J. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res*, *110*(12), 1646-1660. doi: 10.1161/circresaha.111.259754
- Kubalova, Z. (2003). Inactivation of L-type calcium channels in cardiomyocytes. Experimental and theoretical approaches. *Gen Physiol Biophys*, *22*(4), 441-454.
- Kubo, H., Margulies, K. B., Piacentino, V., 3rd, Gaughan, J. P., & Houser, S. R. (2001). Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation*, *104*(9), 1012-1018.
- Kucerova, D., Baba, H. A., Boknik, P., Fabritz, L., Heinick, A., Mat'us, M., . . . Kirchhefer, U. (2012). Modulation of SR Ca²⁺ release by the triadin-to-calsequestrin ratio in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *302*(10), H2008-2017. doi: 10.1152/ajpheart.00457.2011
- Kudej, R. K., Iwase, M., Uechi, M., Vatner, D. E., Oka, N., Ishikawa, Y., . . . Vatner, S. F. (1997). Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(10), 2735-2746. doi: 10.1006/jmcc.1997.0508
- Kushnir, A., & Marks, A. R. (2010). The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv Pharmacol*, *59*, 1-30. doi: 10.1016/s1054-3589(10)59001-x
- Kushnir, A., Shan, J., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., & Marks, A. R. (2010). Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(22), 10274-10279. doi: 10.1073/pnas.1005843107
- Kyrychenko, S., Polakova, E., Kang, C., Pocsai, K., Ullrich, N. D., Niggli, E., & Shirokova, N. (2013). Hierarchical accumulation of RyR post-translational modifications drives disease progression in dystrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, *97*(4), 666-675. doi: 10.1093/cvr/cvs425
- Lacampagne, A., Fauconnier, J., & Richard, S. (2008). [Ryanodine receptor and heart disease]. *Med Sci (Paris)*, *24*(4), 399-405. doi: 10.1051/medsci/2008244399
- Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S., & Snyder, S. H. (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem*, *273*(29), 18325-18331.
- Lai, M. M., Luo, H. R., Burnett, P. E., Hong, J. J., & Snyder, S. H. (2000). The calcineurin-binding protein cain is a negative regulator of synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem*, *275*(44), 34017-34020. doi: 10.1074/jbc.C000429200
- Lakatta, E. G. (1993). Myocardial adaptations in advanced age. *Basic Res Cardiol*, *88 Suppl 2*, 125-133.
- Lakatta, E. G., Vinogradova, T. M., & Bogdanov, K. Y. (2002). Beta-adrenergic stimulation modulation of heart rate via synchronization of ryanodine receptor Ca²⁺ release. *J Card Surg*, *17*(5), 451-461.
- Lamberts, R. R., Hamdani, N., Soekhoe, T. W., Boontje, N. M., Zaremba, R., Walker, L. A., . . . Stienen, G. J. (2007). Frequency-dependent myofilament Ca²⁺ desensitization in failing rat myocardium. *J Physiol*, *582*(Pt 2), 695-709. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134486

- LaMorte, V. J., Thorburn, J., Absher, D., Spiegel, A., Brown, J. H., Chien, K. R., . . . Knowlton, K. U. (1994). Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem*, *269*(18), 13490-13496.
- Landstrom, A. P., & Ackerman, M. J. (2012). Beyond the cardiac myofilament: hypertrophic cardiomyopathy- associated mutations in genes that encode calcium-handling proteins. *Curr Mol Med*, *12*(5), 507-518.
- Le Peuch, C. J., Haiech, J., & Demaille, J. G. (1979). Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry*, *18*(23), 5150-5157.
- Lee, H. G., Kang, H., Kim, D. H., & Park, W. J. (2001). Interaction of HRC (histidine-rich Ca(2+)-binding protein) and triadin in the lumen of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *276*(43), 39533-39538. doi: 10.1074/jbc.M010664200
- Leenhardt, A., Lucet, V., Denjoy, I., Grau, F., Ngoc, D. D., & Coumel, P. (1995). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation*, *91*(5), 1512-1519.
- Lefroy, D. C., de Silva, R., Choudhury, L., Uren, N. G., Crake, T., Rhodes, C. G., . . . et al. (1993). Diffuse reduction of myocardial beta-adrenoceptors in hypertrophic cardiomyopathy: a study with positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*, *22*(6), 1653-1660.
- Lehnart, S. E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X. H., Song, L. S., Tillman, E. J., . . . Marks, A. R. (2006). Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7906-7910. doi: 10.1073/pnas.0602133103
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Kushnir, A., & Marks, A. R. (2004). Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease. *Ann N Y Acad Sci*, *1015*, 144-159.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., & Marks, A. R. (2005). Defective ryanodine receptor interdomain interactions may contribute to intracellular Ca²⁺ leak: a novel therapeutic target in heart failure. *Circulation*, *111*(25), 3342-3346. doi: 10.1161/circulationaha.105.551861
- Lenaerts, I., Bito, V., Heinzl, F. R., Driesen, R. B., Holemans, P., D'Hooge, J., . . . Willems, R. (2009). Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ Res*, *105*(9), 876-885. doi: 10.1161/circresaha.109.206276
- Li, C., Dong, S., Wang, H., & Hu, Y. (2011). Microarray analysis of gene expression changes in the brains of NR2B-induced memory-enhanced mice. *Neuroscience*, *197*, 121-131. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.031
- Li, G. R., Lau, C. P., Ducharme, A., Tardif, J. C., & Nattel, S. (2002). Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(3), H1031-1041. doi: 10.1152/ajpheart.00105.2002
- Li, P., Wang, D., Lucas, J., Oparil, S., Xing, D., Cao, X., . . . Chen, Y. F. (2008). Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res*, *102*(2), 185-192. doi: 10.1161/circresaha.107.157677
- Li, X. M., Ma, Y. T., Yang, Y. N., Liu, F., Chen, B. D., Han, W., . . . Gao, X. M. (2009). Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *36*(11), 1054-1061. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05243.x

- Liao, P., Georgakopoulos, D., Kovacs, A., Zheng, M., Lerner, D., Pu, H., . . . Wang, Y. (2001). The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12283-12288. doi: 10.1073/pnas.211086598
- Lijnen, P. J., Petrov, V. V., & Fagard, R. H. (2001). Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2(2), 117-122. doi: 10.3317/jraas.2001.012
- Lim, H. W., De Windt, L. J., Mante, J., Kimball, T. R., Witt, S. A., Sussman, M. A., & Molkentin, J. D. (2000). Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J Mol Cell Cardiol*, 32(4), 697-709. doi: 10.1006/jmcc.2000.1113
- Limas, C. J., Olivari, M. T., Goldenberg, I. F., Levine, T. B., Benditt, D. G., & Simon, A. (1987). Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 21(8), 601-605.
- Linck, B., Boknik, P., Huke, S., Kirchhefer, U., Knapp, J., Luss, H., . . . Schmitz, W. (2000). Functional properties of transgenic mouse hearts overexpressing both calsequestrin and the Na(+)-Ca(2+) exchanger. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(2), 648-657.
- Lipp, P., & Niggli, E. (1998). Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in Guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol*, 508 (Pt 3), 801-809.
- Lipskaia, L., & Lompre, A. M. (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell*, 96(1), 55-68. doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.001
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., . . . Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*, 126(1), 111-126.
- Liu, N., Rizzi, N., Boveri, L., & Priori, S. G. (2009). Ryanodine receptor and calsequestrin in arrhythmogenesis: what we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 46(2), 149-159. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.10.012
- Liu, N., Ruan, Y., & Priori, S. G. (2008). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis*, 51(1), 23-30. doi: 10.1016/j.pcad.2007.10.005
- Liu, Y., Kimlicka, L., Hiess, F., Tian, X., Wang, R., Zhang, L., . . . Chen, S. R. (2013). The CPVT-associated RyR2 mutation G230C enhances store overload-induced Ca²⁺ release and destabilizes the N-terminal domains. *Biochem J*, 454(1), 123-131. doi: 10.1042/bj20130594
- Lompre, A. M., Hajjar, R. J., Harding, S. E., Kranias, E. G., Lohse, M. J., & Marks, A. R. (2010). Ca²⁺ cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation*, 121(6), 822-830. doi: 10.1161/circulationaha.109.890954
- Lompre, A. M., Schwartz, K., d'Albis, A., Lacombe, G., Van Thiem, N., & Swynghedauw, B. (1979). Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature*, 282(5734), 105-107.
- Lorell, B. H., & Carabello, B. A. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, 102(4), 470-479.
- Lorenzon, N. M., & Beam, K. G. (2008). Disease causing mutations of calcium channels. *Channels (Austin)*, 2(3), 163-179.
- Louch, W. E., Sejersted, O. M., & Swift, F. (2010). There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca²⁺ handling. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 503906. doi: 10.1155/2010/503906

- Loyer, X., Gomez, A. M., Milliez, P., Fernandez-Velasco, M., Vangheluwe, P., Vinet, L., . . . Heymes, C. (2008). Cardiomyocyte overexpression of neuronal nitric oxide synthase delays transition toward heart failure in response to pressure overload by preserving calcium cycling. *Circulation*, *117*(25), 3187-3198. doi: 10.1161/circulationaha.107.741702
- Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L., & Olson, E. N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(8), 4070-4075.
- Luo, M., & Anderson, M. E. (2013). Mechanisms of altered Ca²⁺(+) handling in heart failure. *Circ Res*, *113*(6), 690-708. doi: 10.1161/circresaha.113.301651
- Luo, W., Grupp, I. L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J. J., . . . Kranias, E. G. (1994). Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*, *75*(3), 401-409.
- Luther, P. K. (2009). The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil*, *30*(5-6), 171-185. doi: 10.1007/s10974-009-9189-6
- Lymperopoulos, A., Rengo, G., & Koch, W. J. (2013). Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*, *113*(6), 739-753. doi: 10.1161/circresaha.113.300308
- Macabasco-O'Connell, A., & Miller, P. S. (2006). Biomarkers for heart failure. *Prog Cardiovasc Nurs*, *21*(4), 215-218.
- MacKenna, D. A., Dolfi, F., Vuori, K., & Ruoslahti, E. (1998). Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest*, *101*(2), 301-310. doi: 10.1172/jci1026
- MacLennan, D. H., & Chen, S. R. (2009). Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J Physiol*, *587*(Pt 13), 3113-3115. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172155
- Makarewich, C. A., Correll, R. N., Gao, H., Zhang, H., Yang, B., Berretta, R. M., . . . Houser, S. R. (2012). A caveolae-targeted L-type Ca²⁺ channel antagonist inhibits hypertrophic signaling without reducing cardiac contractility. *Circ Res*, *110*(5), 669-674. doi: 10.1161/circresaha.111.264028
- Malik, M., & Camm, A. J. (1993). Heart rate variability: from facts to fancies. *J Am Coll Cardiol*, *22*(2), 566-568.
- Mancini, M., & Toker, A. (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, *9*(11), 810-820. doi: 10.1038/nrc2735
- Marks, A. R. (2002). Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. *Front Biosci*, *7*, d970-977.
- Maron, B. J., Ferrans, V. J., & Roberts, W. C. (1975). Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy. *Am J Pathol*, *79*(3), 387-434.
- Marty, I., Faure, J., Fourest-Lieuvin, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S., & Brocard, J. (2009). Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol*, *587*(Pt 13), 3117-3121. doi: 10.1113/jphysiol.2009.171892
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., & Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, *101*(4), 365-376.

- Masaki, H., Sako, H., Kadambi, V. J., Sato, Y., Kranias, E. G., & Yatani, A. (1998). Overexpression of phospholamban alters inactivation kinetics of L-type Ca²⁺ channel currents in mouse atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, *30*(2), 317-325. doi: 10.1006/jmcc.1997.0594
- Masumiya, H., Wang, R., Zhang, J., Xiao, B., & Chen, S. R. (2003). Localization of the 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6) binding site to the NH₂-terminal domain of the cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem*, *278*(6), 3786-3792. doi: 10.1074/jbc.M210962200
- Matkovich, S. J., Diwan, A., Klanke, J. L., Hammer, D. J., Marreez, Y., Odley, A. M., . . . Dorn, G. W., 2nd. (2006). Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circ Res*, *99*(9), 996-1003. doi: 10.1161/01.RES.0000247932.71270.2c
- Matsubara, H. (1998). Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*, *83*(12), 1182-1191.
- Mattiazzi, A., & Kranias, E. G. (2014). The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol*, *5*, 5. doi: 10.3389/fphar.2014.00005
- Mattiello, J. A., Margulies, K. B., Jeevanandam, V., & Houser, S. R. (1998). Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, *37*(2), 424-431.
- McConnell, B. K., Moravec, C. S., & Bond, M. (1998). Troponin I phosphorylation and myofilament calcium sensitivity during decompensated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*, *274*(2 Pt 2), H385-396.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2000). Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(26), 14400-14405. doi: 10.1073/pnas.260501497
- McNutt, N. S. (1975). Ultrastructure of the myocardial sarcolemma. *Circ Res*, *37*(1), 1-13.
- Medeiros-Domingo, A., Bhuiyan, Z. A., Tester, D. J., Hofman, N., Bikker, H., van Tintelen, J. P., . . . Ackerman, M. J. (2009). The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol*, *54*(22), 2065-2074. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.022
- Meguro, T., Hong, C., Asai, K., Takagi, G., McKinsey, T. A., Olson, E. N., & Vatner, S. F. (1999). Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res*, *84*(6), 735-740.
- Meng, X., Xiao, B., Cai, S., Huang, X., Li, F., Bolstad, J., . . . Liu, Z. (2007). Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem*, *282*(35), 25929-25939. doi: 10.1074/jbc.M704474200
- Menon, B., Johnson, J. N., Ross, R. S., Singh, M., & Singh, K. (2007). Glycogen synthase kinase-3beta plays a pro-apoptotic role in beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: Role of beta1 integrins. *J Mol Cell Cardiol*, *42*(3), 653-661. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.12.011
- Mercadier, J. J., Lompre, A. M., Wisniewsky, C., Samuel, J. L., Bercovici, J., Swynghedauw, B., & Schwartz, K. (1981). Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res*, *49*(2), 525-532.

- Metzger, J. M., Wahr, P. A., Michele, D. E., Albayya, F., & Westfall, M. V. (1999). Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca²⁺-activated tension development in single adult cardiac myocytes. *Circ Res*, *84*(11), 1310-1317.
- Michael, A., Haq, S., Chen, X., Hsieh, E., Cui, L., Walters, B., . . . Force, T. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem*, *279*(20), 21383-21393. doi: 10.1074/jbc.M401413200
- Milano, C. A., Dolber, P. C., Rockman, H. A., Bond, R. A., Venable, M. E., Allen, L. F., & Lefkowitz, R. J. (1994). Myocardial expression of a constitutively active α 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(21), 10109-10113.
- Milliez, P., Deangelis, N., Rucker-Martin, C., Leenhardt, A., Vicaut, E., Robidel, E., . . . Hatem, S. N. (2005). Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J*, *26*(20), 2193-2199. doi: 10.1093/eurheartj/ehi478
- Minamisawa, S., Hoshijima, M., Chu, G., Ward, C. A., Frank, K., Gu, Y., . . . Chien, K. R. (1999). Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*, *99*(3), 313-322.
- Miska, E. A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S. J., Pines, J., & Kouzarides, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *Embo j*, *18*(18), 5099-5107. doi: 10.1093/emboj/18.18.5099
- Misra, R. P., Bonni, A., Miranti, C. K., Rivera, V. M., Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1994). L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem*, *269*(41), 25483-25493.
- Mitarai, S., Reed, T. D., & Yatani, A. (2000). Changes in ionic currents and β -adrenergic receptor signaling in hypertrophied myocytes overexpressing G α (q). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *279*(1), H139-148.
- Mitchell, R. D., Simmerman, H. K., & Jones, L. R. (1988). Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem*, *263*(3), 1376-1381.
- Moalic, J. M., Bourgeois, F., Mansier, P., Machida, C. A., Carre, F., Chevalier, B., . . . Swynghedauw, B. (1993). β 1 adrenergic receptor and G α s mRNAs in rat heart as a function of mechanical load and thyroxine intoxication. *Cardiovasc Res*, *27*(2), 231-237.
- Molkentin, J. D. (2000). Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res*, *87*(9), 731-738.
- Molkentin, J. D. (2003). A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest*, *111*(9), 1275-1277. doi: 10.1172/jci18389
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., . . . Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, *93*(2), 215-228.
- Morano, I., Hadicke, K., Haase, H., Bohm, M., Erdmann, E., & Schaub, M. C. (1997). Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(4), 1177-1187. doi: 10.1006/jmcc.1996.0353
- Moreau, A., Krahn, A. D., Gosselin-Badaroudine, P., Klein, G. J., Christe, G., Vincent, Y., . . . Chahine, M. (2013). Sodium overload due to a persistent current that attenuates the arrhythmogenic potential of a novel LQT3 mutation. *Front Pharmacol*, *4*, 126. doi: 10.3389/fphar.2013.00126

- Mori, T., Chen, Y. F., Feng, J. A., Hayashi, T., Oparil, S., & Perry, G. J. (2004). Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res*, *61*(4), 771-779. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.005
- Morisco, C., Seta, K., Hardt, S. E., Lee, Y., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2001). Glycogen synthase kinase 3 β regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, *276*(30), 28586-28597. doi: 10.1074/jbc.M103166200
- Mukherjee, R., & Spinale, F. G. (1998). L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J Mol Cell Cardiol*, *30*(10), 1899-1916. doi: 10.1006/jmcc.1998.0755
- Muller, M. R., & Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*, *10*(9), 645-656. doi: 10.1038/nri2818
- Munch, G., Bolck, B., Karczewski, P., & Schwinger, R. H. (2002). Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, *34*(3), 321-334. doi: 10.1006/jmcc.2001.1515
- Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., & Numa, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett*, *271*(1-2), 169-177.
- Namgaladze, D., Hofer, H. W., & Ullrich, V. (2002). Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *J Biol Chem*, *277*(8), 5962-5969. doi: 10.1074/jbc.M111268200
- Naudin, V., Oliviero, P., Rannou, F., Sainte Beuve, C., & Charlemagne, D. (1991). The density of ryanodine receptors decreases with pressure overload-induced rat cardiac hypertrophy. *FEBS Lett*, *285*(1), 135-138.
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, *85*(4), 1205-1253. doi: 10.1152/physrev.00002.2005
- Neumann, J., Eschenhagen, T., Jones, L. R., Linck, B., Schmitz, W., Scholz, H., & Zimmermann, N. (1997). Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(1), 265-272. doi: 10.1006/jmcc.1996.0271
- Nicolaou, P., Rodriguez, P., Ren, X., Zhou, X., Qian, J., Sadayappan, S., . . . Kranias, E. G. (2009). Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, *104*(8), 1012-1020. doi: 10.1161/circresaha.108.189811
- Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., & Holstein-Rathlou, N. H. (2012). Gap junctions. *Compr Physiol*, *2*(3), 1981-2035. doi: 10.1002/cphy.c110051
- Nilius, B., Hess, P., Lansman, J. B., & Tsien, R. W. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature*, *316*(6027), 443-446.
- Nirdlinger, E. L., & Bramante, P. O. (1974). Subcellular myocardial ionic shifts and mitochondrial alterations in the course of isoproterenol-induced cardiopathy of the rat. *J Mol Cell Cardiol*, *6*(1), 49-60.
- Noble, D., Borysova, L., Wray, S., & Burdyga, T. (2014). Store-operated Ca(2+) entry and depolarization explain the anomalous behaviour of myometrial SR: Effects of SERCA inhibition on electrical activity, Ca(2+) and force. *Cell Calcium*, *56*(3), 188-194. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.003
- Noguchi, T., Hunlich, M., Camp, P. C., Begin, K. J., El-Zaru, M., Patten, R., . . . VanBuren, P. (2004). Thin-filament-based modulation of contractile performance in human heart failure. *Circulation*, *110*(8), 982-987. doi: 10.1161/01.cir.0000139334.43109.f9

- O'Quinn, M. P., Palatinus, J. A., Harris, B. S., Hewett, K. W., & Gourdie, R. G. (2011). A peptide mimetic of the connexin43 carboxyl terminus reduces gap junction remodeling and induced arrhythmia following ventricular injury. *Circ Res*, *108*(6), 704-715. doi: 10.1161/circresaha.110.235747
- Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, J., . . . Marty, I. (2009). Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem*, *284*(50), 34918-34929. doi: 10.1074/jbc.M109.022442
- Ohkura, M., Furukawa, K., Fujimori, H., Kuruma, A., Kawano, S., Hiraoka, M., . . . Ohizumi, Y. (1998). Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin. *Biochemistry*, *37*(37), 12987-12993. doi: 10.1021/bi972803d
- Oka, N., Asai, K., Kudej, R. K., Edwards, J. G., Toya, Y., Schwencke, C., . . . Ishikawa, Y. (1997). Downregulation of caveolin by chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *Am J Physiol*, *273*(6 Pt 1), C1957-1962.
- Oka, T., Akazawa, H., Naito, A. T., & Komuro, I. (2014). Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res*, *114*(3), 565-571. doi: 10.1161/circresaha.114.300507
- Ono, K., Yano, M., Ohkusa, T., Kohno, M., Hisaoka, T., Tanigawa, T., . . . Matsuzaki, M. (2000). Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) release in heart failure. *Cardiovasc Res*, *48*(2), 323-331.
- Osadchii, O., Woodiwiss, A., Alves, N., & Norton, G. (2005). Mechanisms of preserved baseline cardiac systolic function in rats with adrenergic inotropic downregulation. *Life Sci*, *78*(4), 366-375. doi: 10.1016/j.lfs.2005.04.047
- Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M., & MacLennan, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *265*(23), 13472-13483.
- Oyama, M. A., Chittur, S. V., & Reynolds, C. A. (2009). Decreased triadin and increased calstabin2 expression in Great Danes with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*, *23*(5), 1014-1019. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0360.x
- Pagani, E. D., Alousi, A. A., Grant, A. M., Older, T. M., Dziuban, S. W., Jr., & Allen, P. D. (1988). Changes in myofibrillar content and Mg-ATPase activity in ventricular tissues from patients with heart failure caused by coronary artery disease, cardiomyopathy, or mitral valve insufficiency. *Circ Res*, *63*(2), 380-385.
- Park, C. S., Chen, S., Lee, H., Cha, H., Oh, J. G., Hong, S., . . . Kim do, H. (2013). Targeted ablation of the histidine-rich Ca(2+)-binding protein (HRC) gene is associated with abnormal SR Ca(2+)-cycling and severe pathology under pressure-overload stress. *Basic Res Cardiol*, *108*(3), 344. doi: 10.1007/s00395-013-0344-2
- Park, H., Park, I. Y., Kim, E., Youn, B., Fields, K., Dunker, A. K., & Kang, C. (2004). Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem*, *279*(17), 18026-18033. doi: 10.1074/jbc.M311553200
- Parker, P. J., Caudwell, F. B., & Cohen, P. (1983). Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem*, *130*(1), 227-234.
- Parker, T. G., & Schneider, M. D. (1991). Growth factors, proto-oncogenes, and plasticity of the cardiac phenotype. *Annu Rev Physiol*, *53*, 179-200. doi: 10.1146/annurev.ph.53.030191.001143
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., . . . Olson, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*, *105*(10), 1395-1406. doi: 10.1172/jci8551

- Patel, M. B., Stewart, J. M., Loud, A. V., Anversa, P., Wang, J., Fiegel, L., & Hintze, T. H. (1991). Altered function and structure of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine. *Circulation*, *84*(5), 2091-2100.
- Patterson, E., Scherlag, B. J., Szabo, B., & Lazzara, R. (1997). Facilitation of epinephrine-induced afterdepolarizations by class III antiarrhythmic drugs. *J Electrocardiol*, *30*(3), 217-224.
- Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., & Levin, E. R. (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem*, *280*(28), 26339-26348. doi: 10.1074/jbc.M414409200
- Peng, M., Fan, H., Kirley, T. L., Caswell, A. H., & Schwartz, A. (1994). Structural diversity of triadin in skeletal muscle and evidence of its existence in heart. *FEBS Lett*, *348*(1), 17-20.
- Perez, C. F. (2011). On the footsteps of Triadin and its role in skeletal muscle. *World J Biol Chem*, *2*(8), 177-183. doi: 10.4331/wjbc.v2.i8.177
- Philipson, K. D., & Nicoll, D. A. (2000). Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol*, *62*, 111-133. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.111
- Piacentino, V., 3rd, Weber, C. R., Chen, X., Weisser-Thomas, J., Margulies, K. B., Bers, D. M., & Houser, S. R. (2003). Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*, *92*(6), 651-658. doi: 10.1161/01.res.0000062469.83985.9b
- Picht, E., Zima, A. V., Blatter, L. A., & Bers, D. M. (2007). SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol*, *293*(3), C1073-1081. doi: 10.1152/ajpcell.00586.2006
- Pieske, B., Maier, L. S., Piacentino, V., 3rd, Weisser, J., Hasenfuss, G., & Houser, S. (2002). Rate dependence of $[Na^+]_i$ and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation*, *106*(4), 447-453.
- Pogwizd, S. M., Qi, M., Yuan, W., Samarel, A. M., & Bers, D. M. (1999). Upregulation of Na^+/Ca^{2+} exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res*, *85*(11), 1009-1019.
- Pourrier, M., & Nattel, S. (2004). [Anchoring proteins and cardiac sudden death: how and why?]. *Med Sci (Paris)*, *20*(4), 437-441. doi: 10.1051/medsci/2004204437
- Qin, D., Zhang, Z. H., Caref, E. B., Boutjdir, M., Jain, P., & el-Sherif, N. (1996). Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res*, *79*(3), 461-473.
- Qu, J., Volpicelli, F. M., Garcia, L. I., Sandeep, N., Zhang, J., Marquez-Rosado, L., . . . Fishman, G. I. (2009). Gap junction remodeling and spironolactone-dependent reverse remodeling in the hypertrophied heart. *Circ Res*, *104*(3), 365-371. doi: 10.1161/circresaha.108.184044
- Ramirez, M. T., Zhao, X. L., Schulman, H., & Brown, J. H. (1997). The nuclear deltaB isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem*, *272*(49), 31203-31208.
- Ran, Y., Chen, J., Li, N., Zhang, W., Feng, L., Wang, R., . . . Pu, J. (2010). Common RyR2 variants associate with ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in chronic heart failure. *Clin Sci (Lond)*, *119*(5), 215-223. doi: 10.1042/cs20090656
- Rannou, F., Sainte-Beuve, C., Oliviero, P., Do, E., Trouve, P., & Charlemagne, D. (1995). The effects of compensated cardiac hypertrophy on dihydropyridine and ryanodine receptors in rat, ferret and guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol*, *27*(5), 1225-1234.
- Reiken, S., Gaburjakova, M., Guatimosim, S., Gomez, A. M., D'Armiento, J., Burkhoff, D., . . . Marks, A. R. (2003). Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release

- channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem*, 278(1), 444-453. doi: 10.1074/jbc.M207028200
- Ren, X., & Philipson, K. D. (2013). The topology of the cardiac Na(+)/Ca(2)(+) exchanger, NCX1. *J Mol Cell Cardiol*, 57, 68-71. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.010
- Respress, J. L., van Oort, R. J., Li, N., Rolim, N., Dixit, S. S., deAlmeida, A., . . . Wehrens, X. H. (2012). Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res*, 110(11), 1474-1483. doi: 10.1161/circresaha.112.268094
- Rezgui, S. S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., Platel, J. C., Bouron, A., Arnoult, C., . . . Marty, I. (2005). Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem*, 280(47), 39302-39308. doi: 10.1074/jbc.M506566200
- Rhoads, R. E. (1999). Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J Biol Chem*, 274(43), 30337-30340.
- Roehrl, M. H., Wang, J. Y., & Wagner, G. (2004). Discovery of small-molecule inhibitors of the NFAT--calcineurin interaction by competitive high-throughput fluorescence polarization screening. *Biochemistry*, 43(51), 16067-16075. doi: 10.1021/bi048232o
- Rona, G., Chappel, C. I., Balazs, T., & Gaudry, R. (1959). An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol*, 67(4), 443-455.
- Rose, J., Armoundas, A. A., Tian, Y., DiSilvestre, D., Burysek, M., Halperin, V., . . . Tomaselli, G. F. (2005). Molecular correlates of altered expression of potassium currents in failing rabbit myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(5), H2077-2087. doi: 10.1152/ajpheart.00526.2003
- Rosenkranz, A. C., Hood, S. G., Woods, R. L., Dusting, G. J., & Ritchie, R. H. (2002). Acute antihypertrophic actions of bradykinin in the rat heart: importance of cyclic GMP. *Hypertension*, 40(4), 498-503.
- Rosenkranz, S. (2004). TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 63(3), 423-432. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.04.030
- Ross, R. S., Pham, C., Shai, S. Y., Goldhaber, J. I., Fenczik, C., Glembotski, C. C., . . . Loftus, J. C. (1998). Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 82(11), 1160-1172.
- Rossner, K. L. (1991). Calcium current in congestive heart failure of hamster cardiomyopathy. *Am J Physiol*, 260(4 Pt 2), H1179-1186.
- Rothermel, B., Vega, R. B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R., & Williams, R. S. (2000). A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem*, 275(12), 8719-8725.
- Rothermel, B. A., McKinsey, T. A., Vega, R. B., Nicol, R. L., Mammen, P., Yang, J., . . . Williams, R. S. (2001). Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3328-3333. doi: 10.1073/pnas.041614798
- Rougier, O., Vassort, G., Garnier, D., Gargouil, Y. M., & Coraboeuf, E. (1969). Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflugers Arch*, 308(2), 91-110.
- Roux-Buisson, N., Cacheux, M., Fourest-Lieuvain, A., Fauconnier, J., Brocard, J., Denjoy, I., . . . Marty, I. (2012). Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet*, 21(12), 2759-2767. doi: 10.1093/hmg/dds104
- Roux-Buisson, N., Gandjbakhch, E., Donal, E., Probst, V., Deharo, J. C., Chevalier, P., . . . Charron, P. (2014). Prevalence and Significance of Rare Ryr2 Variants in

- Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Results of a Systematic Screening. *Heart Rhythm*. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.07.020
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, 80(4), 1483-1521.
- Ruwhof, C., & van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*, 47(1), 23-37.
- Saadane, N., Rouyer-Fessard, P., Villeval, J. L., Blumenfeld-Charbit, N., Henri, A., Leroy-Viard, K., . . . et al. (1993). [Physiopathologic and therapeutic importance of animal models of hemoglobinopathies]. *Nouv Rev Fr Hematol*, 35(3), 301-302.
- Sabbah, H. N., Sharov, V. G., Lesch, M., & Goldstein, S. (1995). Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem*, 147(1-2), 29-34.
- Sacchetto, R., Damiani, E., Turcato, F., Nori, A., & Margreth, A. (2001). Ca(2+)-dependent interaction of triadin with histidine-rich Ca(2+)-binding protein carboxyl-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(5), 1125-1134. doi: 10.1006/bbrc.2001.6126
- Sadoshima, J., & Izumo, S. (1993). Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*, 73(3), 413-423.
- Salama, G., Baker, L., Wolk, R., Barhanin, J., & London, B. (2009). Arrhythmia phenotype in mouse models of human long QT. *J Interv Card Electrophysiol*, 24(2), 77-87. doi: 10.1007/s10840-008-9339-6
- Sanna, B., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Wilkins, B. J., & Molkenkin, J. D. (2005). Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol*, 25(3), 865-878. doi: 10.1128/mcb.25.3.865-878.2005
- Sato, Y., Ferguson, D. G., Sako, H., Dorn, G. W., 2nd, Kadambi, V. J., Yatani, A., . . . Kranias, E. G. (1998). Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem*, 273(43), 28470-28477.
- Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., . . . Bleese, N. (1991). Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 83(2), 504-514.
- Schelling, P., Fischer, H., Hutchinson, J., & Ganten, D. (1975). Proceedings: Influence of angiotensin II and angiotensin II antagonist (P 113) in vitro on cell growth in 3T3 and virus transformed SV40 3T3 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 287 Suppl, R51.
- Schellings, M. W., Pinto, Y. M., & Heymans, S. (2004). Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res*, 64(1), 24-31. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.06.006
- Schillinger, W., Fiolet, J. W., Schlotthauer, K., & Hasenfuss, G. (2003). Relevance of Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart failure. *Cardiovasc Res*, 57(4), 921-933.
- Schillinger, W., Janssen, P. M., Emami, S., Henderson, S. A., Ross, R. S., Teucher, N., . . . Hasenfuss, G. (2000). Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger. *Circ Res*, 87(7), 581-587.
- Schmidt, U., Hajjar, R. J., Kim, C. S., Lebeche, D., Doye, A. A., & Gwathmey, J. K. (1999). Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca⁽²⁺⁾-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 2), H474-480.

- Schmitt, J. P., Kamisago, M., Asahi, M., Li, G. H., Ahmad, F., Mende, U., . . . Seidman, C. E. (2003). Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*, 299(5611), 1410-1413. doi: 10.1126/science.1081578
- Schotten, U., Filzmaier, K., Borghardt, B., Kulka, S., Schoendube, F., Schumacher, C., & Hanrath, P. (2000). Changes of beta-adrenergic signaling in compensated human cardiac hypertrophy depend on the underlying disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(6), H2076-2083.
- Schroder, F., Handrock, R., Beuckelmann, D. J., Hirt, S., Hullin, R., Priebe, L., . . . Herzig, S. (1998). Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation*, 98(10), 969-976.
- Schulz, E. M., Correll, R. N., Sheikh, H. N., Lofrano-Alves, M. S., Engel, P. L., Newman, G., . . . Wieczorek, D. F. (2012). Tropomyosin dephosphorylation results in compensated cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*, 287(53), 44478-44489. doi: 10.1074/jbc.M112.402040
- Schulz, E. M., Wilder, T., Chowdhury, S. A., Sheikh, H. N., Wolska, B. M., Solaro, R. J., & Wieczorek, D. F. (2013). Decreasing tropomyosin phosphorylation rescues tropomyosin-induced familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem*, 288(40), 28925-28935. doi: 10.1074/jbc.M113.466466
- Schumacher, C., Becker, H., Conrads, R., Schotten, U., Pott, S., Kellinghaus, M., . . . et al. (1995). Hypertrophic cardiomyopathy: a desensitized cardiac beta-adrenergic system in the presence of normal plasma catecholamine concentrations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 351(4), 398-407.
- Schunkert, H., Dzau, V. J., Tang, S. S., Hirsch, A. T., Apstein, C. S., & Lorell, B. H. (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*, 86(6), 1913-1920. doi: 10.1172/jci114924
- Schwartz, K., de la Bastie, D., Bouveret, P., Oliviero, P., Alonso, S., & Buckingham, M. (1986). Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res*, 59(5), 551-555.
- Schwinger, R. H., Munch, G., Bolck, B., Karczewski, P., Krause, E. G., & Erdmann, E. (1999). Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 31(3), 479-491.
- Schwinger, R. H., Wang, J., Frank, K., Muller-Ehmsen, J., Brixius, K., McDonough, A. A., & Erdmann, E. (1999). Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity but unchanged Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation*, 99(16), 2105-2112.
- Scimia, M. C., Gumpert, A. M., & Koch, W. J. (2014). Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction. *Expert Opin Biol Ther*, 14(2), 183-195. doi: 10.1517/14712598.2014.866085
- Sei, C. A., Irons, C. E., Sprengle, A. B., McDonough, P. M., Brown, J. H., & Glembotski, C. C. (1991). The alpha-adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways. *J Biol Chem*, 266(24), 15910-15916.
- Shan, J., Kushnir, A., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Li, J., Lehnart, S. E., . . . Marks, A. R. (2010). Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest*, 120(12), 4388-4398. doi: 10.1172/jci32726
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J. R., Jones, L. R., Kobayashi, Y. M., Wang, Y., . . . Perez, C. F. (2007). Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not

- essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 282(52), 37864-37874. doi: 10.1074/jbc.M705702200
- Sheng, M., Thompson, M. A., & Greenberg, M. E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 252(5011), 1427-1430.
- Shimamatsu, M., & Toshima, H. (1987). Impaired coronary vasodilatory capacity after dipyridamole administration in hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Heart J*, 28(3), 387-401.
- Shin, D. W., Ma, J., & Kim, D. H. (2000). The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca(2+) and interacts with triadin. *FEBS Lett*, 486(2), 178-182.
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofe, S., Ito, M., Liao, R., . . . Walsh, K. (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*, 115(8), 2108-2118. doi: 10.1172/jci24682
- Shizukuda, Y., Buttrick, P. M., Geenen, D. L., Borczuk, A. C., Kitsis, R. N., & Sonnenblick, E. H. (1998). beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol*, 275(3 Pt 2), H961-968.
- Silvestre, J. S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J. M., . . . Delcayre, C. (1998). Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*, 273(9), 4883-4891.
- Simmerman, H. K., Collins, J. H., Theibert, J. L., Wegener, A. D., & Jones, L. R. (1986). Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem*, 261(28), 13333-13341.
- Sims, C., Reisenweber, S., Viswanathan, P. C., Choi, B. R., Walker, W. H., & Salama, G. (2008). Sex, age, and regional differences in L-type calcium current are important determinants of arrhythmia phenotype in rabbit hearts with drug-induced long QT type 2. *Circ Res*, 102(9), e86-100. doi: 10.1161/circresaha.108.173740
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., & Dascal, N. (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, 253(5027), 1553-1557.
- Sipido, K. R., Stankovicova, T., Flameng, W., Vanhaecke, J., & Verdonck, F. (1998). Frequency dependence of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in human ventricular myocytes from end-stage heart failure. *Cardiovasc Res*, 37(2), 478-488.
- Sipido, K. R., Volders, P. G., de Groot, S. H., Verdonck, F., Van de Werf, F., Wellens, H. J., & Vos, M. A. (2000). Enhanced Ca(2+) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation*, 102(17), 2137-2144.
- Smith, J. S., Coronado, R., & Meissner, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca²⁺ and ATP and modulation by Mg²⁺. *J Gen Physiol*, 88(5), 573-588.
- Song, L. S., Guatimosim, S., Gomez-Viquez, L., Sobie, E. A., Ziman, A., Hartmann, H., & Lederer, W. J. (2005). Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Ann N Y Acad Sci*, 1047, 99-111. doi: 10.1196/annals.1341.009
- Song, L. S., Sobie, E. A., McCulle, S., Lederer, W. J., Balke, C. W., & Cheng, H. (2006). Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4305-4310. doi: 10.1073/pnas.0509324103
- Spinale, F. G. (2002a). Bioactive peptide signaling within the myocardial interstitium and the matrix metalloproteinases. *Circ Res*, 91(12), 1082-1084.
- Spinale, F. G. (2002b). Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*, 90(5), 520-530.

- Spinale, F. G., Gunasinghe, H., Sprunger, P. D., Baskin, J. M., & Bradham, W. C. (2002). Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure. *J Card Fail*, 8(6 Suppl), S332-338. doi: 10.1054/jcaf.2002.129259
- Srinivasan, M., Edman, C. F., & Schulman, H. (1994). Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol*, 126(4), 839-852.
- Steinle, J. J., Cappocia, F. C., Jr., & Jiang, Y. (2008). Beta-adrenergic receptor regulation of growth factor protein levels in human choroidal endothelial cells. *Growth Factors*, 26(6), 325-330. doi: 10.1080/08977190802442070
- Studer, R., Reinecke, H., Bilger, J., Eschenhagen, T., Bohm, M., Hasenfuss, G., . . . Drexler, H. (1994). Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res*, 75(3), 443-453.
- Studer, R., Reinecke, H., Muller, B., Holtz, J., Just, H., & Drexler, H. (1994). Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J Clin Invest*, 94(1), 301-310. doi: 10.1172/jci117322
- Sun, L., Youn, H. D., Loh, C., Stolow, M., He, W., & Liu, J. O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*, 8(6), 703-711.
- Sun, P., Lou, L., & Maurer, R. A. (1996). Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J Biol Chem*, 271(6), 3066-3073.
- Sun, Y. L., Hu, S. J., Wang, L. H., Hu, Y., & Zhou, J. Y. (2005). Effect of beta-blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. *Chest*, 128(3), 1812-1821. doi: 10.1378/chest.128.3.1812
- Sussman, M. A., Lim, H. W., Gude, N., Taigen, T., Olson, E. N., Robbins, J., . . . Molkentin, J. D. (1998). Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*, 281(5383), 1690-1693.
- Suurmeijer, A. J., Clement, S., Francesconi, A., Bocchi, L., Angelini, A., Van Veldhuisen, D. J., . . . Orlandi, A. (2003). Alpha-actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J Pathol*, 199(3), 387-397. doi: 10.1002/path.1311
- Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M., & Inada, M. (1993). Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res*, 73(3), 439-447.
- Swift, F., Birkeland, J. A., Tovsrud, N., Enger, U. H., Aronsen, J. M., Louch, W. E., . . . Sejersted, O. M. (2008). Altered Na⁺/Ca²⁺-exchanger activity due to downregulation of Na⁺/K⁺-ATPase alpha2-isoform in heart failure. *Cardiovasc Res*, 78(1), 71-78. doi: 10.1093/cvr/cvn013
- Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, 79(1), 215-262.
- Swynghedauw, B., & Baillard, C. (2000). Biology of hypertensive cardiopathy. *Curr Opin Cardiol*, 15(4), 247-253.
- Szabo, B., Sweidan, R., Rajagopalan, C. V., & Lazzara, R. (1994). Role of Na⁺:Ca²⁺ exchange current in Cs(+)-induced early afterdepolarizations in Purkinje fibers. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 5(11), 933-944.
- Takahashi, T., Allen, P. D., & Izumo, S. (1992). Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res*, 71(1), 9-17.

- Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., & Iino, M. (1998). Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *Embo j*, *17*(12), 3309-3316. doi: 10.1093/emboj/17.12.3309
- Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Ren, S., Rodriguez, E. R., Tavazzi, B., . . . Kass, D. A. (2005). Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest*, *115*(5), 1221-1231. doi: 10.1172/jci21968
- Takimoto, E., Soergel, D. G., Janssen, P. M., Stull, L. B., Kass, D. A., & Murphy, A. M. (2004). Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo by troponin I with constitutively active protein kinase A phosphorylation sites. *Circ Res*, *94*(4), 496-504. doi: 10.1161/01.res.0000117307.57798.f5
- Tang, W. H., Kravtsov, G. M., Sauert, M., Tong, X. Y., Hou, X. Y., Wong, T. M., . . . Man Chung, S. S. (2010). Polyol pathway impairs the function of SERCA and RyR in ischemic-reperfused rat hearts by increasing oxidative modifications of these proteins. *J Mol Cell Cardiol*, *49*(1), 58-69. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.12.003
- Teerlink, J. R., Pfeffer, J. M., & Pfeffer, M. A. (1994). Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res*, *75*(1), 105-113.
- Terentyev, D., Cala, S. E., Houle, T. D., Viatchenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Terentyeva, R., . . . Gyorke, S. (2005). Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular arrhythmia in cardiac myocytes. *Circ Res*, *96*(6), 651-658. doi: 10.1161/01.res.0000160609.98948.25
- Terentyev, D., Gyorke, I., Belevych, A. E., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., . . . Gyorke, S. (2008). Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circ Res*, *103*(12), 1466-1472. doi: 10.1161/circresaha.108.184457
- Terentyev, D., Nori, A., Santoro, M., Viatchenko-Karpinski, S., Kubalova, Z., Gyorke, I., . . . Gyorke, S. (2006). Abnormal interactions of calsequestrin with the ryanodine receptor calcium release channel complex linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Circ Res*, *98*(9), 1151-1158. doi: 10.1161/01.res.0000220647.93982.08
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Volpe, P., Williams, S. C., & Gyorke, S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11759-11764. doi: 10.1073/pnas.1932318100
- Tester, D. J., Dura, M., Carturan, E., Reiken, S., Wronska, A., Marks, A. R., & Ackerman, M. J. (2007). A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm*, *4*(6), 733-739. doi: 10.1016/j.hrthm.2007.02.026
- Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Beatriz Romero, N., . . . Marty, I. (2003). Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun*, *303*(2), 669-675.
- Thomas, N. L., George, C. H., & Lai, F. A. (2004). Functional heterogeneity of ryanodine receptor mutations associated with sudden cardiac death. *Cardiovasc Res*, *64*(1), 52-60. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.06.009
- Tiso, N., Stephan, D. A., Nava, A., Bagattin, A., Devaney, J. M., Stanchi, F., . . . Rampazzo, A. (2001). Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*, *10*(3), 189-194.

- Tobimatsu, T., & Fujisawa, H. (1989). Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem*, 264(30), 17907-17912.
- Tokudome, T., Horio, T., Kishimoto, I., Soeki, T., Mori, K., Kawano, Y., . . . Kangawa, K. (2005). Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation*, 111(23), 3095-3104. doi: 10.1161/circulationaha.104.510594
- Toyofuku, T., Curotto Kurzydowski, K., Narayanan, N., & MacLennan, D. H. (1994). Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase that is phosphorylated by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 269(42), 26492-26496.
- Treves, S., Feriotto, G., Moccagatta, L., Gambari, R., & Zorzato, F. (2000). Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 275(50), 39555-39568. doi: 10.1074/jbc.M005473200
- Trinkley, K. E., Page, R. L., 2nd, Lien, H., Yamanouye, K., & Tisdale, J. E. (2013). QT interval prolongation and the risk of torsades de pointes: essentials for clinicians. *Curr Med Res Opin*, 29(12), 1719-1726. doi: 10.1185/03007995.2013.840568
- Tsuchida, S., Matsusaka, T., Chen, X., Okubo, S., Niimura, F., Nishimura, H., . . . Ichikawa, I. (1998). Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest*, 101(4), 755-760. doi: 10.1172/jci1899
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E., & Lohse, M. J. (1993). Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, 87(2), 454-463.
- Valdivia, H. H. (2012). Ryanodine receptor phosphorylation and heart failure: phasing out S2808 and "criminalizing" S2814. *Circ Res*, 110(11), 1398-1402. doi: 10.1161/circresaha.112.270876
- Valle, G., Boncompagni, S., Sacchetto, R., Protasi, F., & Volpe, P. (2014). Post-natal heart adaptation in a knock-in mouse model of calsequestrin 2-linked recessive catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Exp Cell Res*, 321(2), 178-189. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.014
- van der Velden, J., Papp, Z., Boontje, N. M., Zaremba, R., de Jong, J. W., Janssen, P. M., . . . Stienen, G. J. (2003). Myosin light chain composition in non-failing donor and end-stage failing human ventricular myocardium. *Adv Exp Med Biol*, 538, 3-15.
- van der Velden, J., Papp, Z., Zaremba, R., Boontje, N. M., de Jong, J. W., Owen, V. J., . . . Stienen, G. J. (2003). Increased Ca2+-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res*, 57(1), 37-47.
- van Oort, R. J., Garbino, A., Wang, W., Dixit, S. S., Landstrom, A. P., Gaur, N., . . . Wehrens, X. H. (2011). Disrupted junctional membrane complexes and hyperactive ryanodine receptors after acute junctophilin knockdown in mice. *Circulation*, 123(9), 979-988. doi: 10.1161/circulationaha.110.006437
- van Rooij, E., Doevendans, P. A., de Theije, C. C., Babiker, F. A., Molkenin, J. D., & de Windt, L. J. (2002). Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, 277(50), 48617-48626. doi: 10.1074/jbc.M206532200
- Vassilopoulos, S., Oddoux, S., Groh, S., Cacheux, M., Faure, J., Brocard, J., . . . Marty, I. (2010). Caveolin 3 is associated with the calcium release complex and is modified via

- in vivo triadin modification. *Biochemistry*, 49(29), 6130-6135. doi: 10.1021/bi100796v
- Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S. S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., . . . Marty, I. (2005). Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 280(31), 28601-28609. doi: 10.1074/jbc.M501484200
- Vassort, G., Talavera, K., & Alvarez, J. L. (2006). Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium*, 40(2), 205-220. doi: 10.1016/j.ceca.2006.04.025
- Viatchenko-Karpinski, S., Terentyev, D., Gyorke, I., Terentyeva, R., Volpe, P., Priori, S. G., . . . Gyorke, S. (2004). Abnormal calcium signaling and sudden cardiac death associated with mutation of calsequestrin. *Circ Res*, 94(4), 471-477. doi: 10.1161/01.res.0000115944.10681.eb
- Vlahos, C. J., McDowell, S. A., & Clerk, A. (2003). Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat Rev Drug Discov*, 2(2), 99-113. doi: 10.1038/nrd1009
- Volders, P. G., Vos, M. A., Szabo, B., Sipido, K. R., de Groot, S. H., Gorgels, A. P., . . . Lazzara, R. (2000). Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. *Cardiovasc Res*, 46(3), 376-392.
- Wang, S., Trumble, W. R., Liao, H., Wesson, C. R., Dunker, A. K., & Kang, C. H. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol*, 5(6), 476-483.
- Wang, W., Cleemann, L., Jones, L. R., & Morad, M. (2000). Modulation of focal and global Ca²⁺ release in calsequestrin-overexpressing mouse cardiomyocytes. *J Physiol*, 524 Pt 2, 399-414.
- Wang, X., Culotta, V. C., & Klee, C. B. (1996). Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature*, 383(6599), 434-437. doi: 10.1038/383434a0
- Wang, Y., Li, X., Duan, H., Fulton, T. R., Eu, J. P., & Meissner, G. (2009). Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium*, 45(1), 29-37. doi: 10.1016/j.ceca.2008.05.006
- Wang, Z., Nolan, B., Kutschke, W., & Hill, J. A. (2001). Na⁺-Ca²⁺ exchanger remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*, 276(21), 17706-17711. doi: 10.1074/jbc.M100544200
- Warrier, S., Belevych, A. E., Ruse, M., Eckert, R. L., Zaccolo, M., Pozzan, T., & Harvey, R. D. (2005). Beta-adrenergic- and muscarinic receptor-induced changes in cAMP activity in adult cardiac myocytes detected with FRET-based biosensor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(2), C455-461. doi: 10.1152/ajpcell.00058.2005
- Weber, K. T. (1997). Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*, 96(11), 4065-4082.
- Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S., van der Nagel, R., Morales, R., Sun, J., . . . Marks, A. R. (2005). Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9607-9612. doi: 10.1073/pnas.0500353102
- Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., Deng, S. X., Vest, J. A., Cervantes, D., . . . Marks, A. R. (2004). Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science*, 304(5668), 292-296. doi: 10.1126/science.1094301
- Wehrens, X. H., & Marks, A. R. (2004). Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nat Rev Drug Discov*, 3(7), 565-573.

- Wei, S., Guo, A., Chen, B., Kutschke, W., Xie, Y. P., Zimmerman, K., . . . Song, L. S. (2010). T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res*, *107*(4), 520-531. doi: 10.1161/circresaha.109.212324
- Weiss, S., Oz, S., Benmocha, A., & Dascal, N. (2013). Regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channel CaV1.2 via the beta-adrenergic-cAMP-protein kinase A pathway: old dogmas, advances, and new uncertainties. *Circ Res*, *113*(5), 617-631. doi: 10.1161/circresaha.113.301781
- Welsh, G. I., Miller, C. M., Loughlin, A. J., Price, N. T., & Proud, C. G. (1998). Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett*, *421*(2), 125-130.
- Wickenden, A. D., Kaprielian, R., Kassiri, Z., Tsoporis, J. N., Tsushima, R., Fishman, G. I., & Backx, P. H. (1998). The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res*, *37*(2), 312-323.
- Wilkins, B. J., De Windt, L. J., Bueno, O. F., Braz, J. C., Glascock, B. J., Kimball, T. F., & Molkentin, J. D. (2002). Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol*, *22*(21), 7603-7613.
- Winegrad, S., Wisniewsky, C., & Schwartz, K. (1990). Effect of thyroid hormone on the accumulation of mRNA for skeletal and cardiac alpha-actin in hearts from normal and hypophysectomized rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(7), 2456-2460.
- Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., & Jones, L. R. (1991). Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*, *266*(17), 11144-11152.
- Wolff, M. R., Buck, S. H., Stoker, S. W., Greaser, M. L., & Mentzer, R. M. (1996). Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest*, *98*(1), 167-176. doi: 10.1172/jci118762
- Wollert, K. C., Fiedler, B., Gambaryan, S., Smolenski, A., Heineke, J., Butt, E., . . . Drexler, H. (2002). Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. *Hypertension*, *39*(1), 87-92.
- Wu, Y., Dzhura, I., Colbran, R. J., & Anderson, M. E. (2001). Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism. *J Physiol*, *535*(Pt 3), 679-687.
- Wu, Y., Luczak, E. D., Lee, E. J., Hidalgo, C., Yang, J., Gao, Z., . . . Anderson, M. E. (2012). CaMKII effects on inotropic but not lusitropic force frequency responses require phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*, *53*(3), 429-436. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.06.019
- Wu, Y., MacMillan, L. B., McNeill, R. B., Colbran, R. J., & Anderson, M. E. (1999). CaM kinase augments cardiac L-type Ca²⁺ current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am J Physiol*, *276*(6 Pt 2), H2168-2178.
- Wu, Y., Temple, J., Zhang, R., Dzhura, I., Zhang, W., Trimble, R., . . . Anderson, M. E. (2002). Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*, *106*(10), 1288-1293.
- Xiao, L., Xiao, J., Luo, X., Lin, H., Wang, Z., & Nattel, S. (2008). Feedback remodeling of cardiac potassium current expression: a novel potential mechanism for control of repolarization reserve. *Circulation*, *118*(10), 983-992. doi: 10.1161/circulationaha.107.758672

- Xu, X., Yano, M., Uchinoumi, H., Hino, A., Suetomi, T., Ono, M., . . . Matsuzaki, M. (2010). Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, *394*(3), 660-666. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.046
- Yamamoto, T., Yano, M., Xu, X., Uchinoumi, H., Tateishi, H., Mochizuki, M., . . . Matsuzaki, M. (2008). Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation*, *117*(6), 762-772. doi: 10.1161/circulationaha.107.718957
- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., . . . et al. (1995). Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, *96*(1), 438-446. doi: 10.1172/jci118054
- Yang, J., Rothermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., . . . Williams, R. S. (2000). Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*, *87*(12), E61-68.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S. I., Morrow, J. P., Rybin, V. O., Steinberg, S. F., & Marx, S. O. (2005). Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*, *280*(1), 207-214. doi: 10.1074/jbc.M410509200
- Yano, M., Ikeda, Y., & Matsuzaki, M. (2005). Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest*, *115*(3), 556-564. doi: 10.1172/jci24159
- Yano, M., Ono, K., Ohkusa, T., Suetsugu, M., Kohno, M., Hisaoka, T., . . . Matsuzaki, M. (2000). Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*, *102*(17), 2131-2136.
- Yao, A., Su, Z., Nonaka, A., Zubair, I., Spitzer, K. W., Bridge, J. H., . . . Barry, W. H. (1998). Abnormal myocyte Ca²⁺ homeostasis in rabbits with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol*, *275*(4 Pt 2), H1441-1448.
- Yildirim, S. S., Akman, D., Catalucci, D., & Turan, B. (2013). Relationship between downregulation of miRNAs and increase of oxidative stress in the development of diabetic cardiac dysfunction: junctin as a target protein of miR-1. *Cell Biochem Biophys*, *67*(3), 1397-1408. doi: 10.1007/s12013-013-9672-y
- Young, M., Head, G., & Funder, J. (1995). Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol*, *269*(4 Pt 1), E657-662.
- Yuan, Q., Fan, G. C., Dong, M., Altschafli, B., Diwan, A., Ren, X., . . . Kranias, E. G. (2007). Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation*, *115*(3), 300-309. doi: 10.1161/circulationaha.106.654699
- Yue, D. T., Herzig, S., & Marban, E. (1990). Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(2), 753-757.
- Zakhary, D. R., Moravec, C. S., Stewart, R. W., & Bond, M. (1999). Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation*, *99*(4), 505-510.
- Zalvidea, S., Andre, L., Loyer, X., Cassan, C., Sainte-Marie, Y., Thireau, J., . . . Richard, S. (2012). ACE inhibition prevents diastolic Ca²⁺ overload and loss of myofilament Ca²⁺ sensitivity after myocardial infarction. *Curr Mol Med*, *12*(2), 206-217.
- Zarain-Herzberg, A., Estrada-Aviles, R., & Frago-Medina, J. (2012). Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin gene expression in the heart. *Can J Physiol Pharmacol*, *90*(8), 1017-1028. doi: 10.1139/y2012-057

- Zarain-Herzberg, A., Fragoso-Medina, J., & Estrada-Aviles, R. (2011). Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life*, 63(10), 847-855. doi: 10.1002/iub.545
- Zechner, D., Thuerauf, D. J., Hanford, D. S., McDonough, P. M., & Glembotski, C. C. (1997). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol*, 139(1), 115-127.
- Zhai, P., Gao, S., Holle, E., Yu, X., Yatani, A., Wagner, T., & Sadoshima, J. (2007). Glycogen synthase kinase-3 α reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*, 282(45), 33181-33191. doi: 10.1074/jbc.M705133200
- Zhang, C., Chen, B., Guo, A., Zhu, Y., Miller, J. D., Gao, S., . . . Song, L. S. (2014). Microtubule-mediated defects in junctophilin-2 trafficking contribute to myocyte transverse-tubule remodeling and Ca²⁺ handling dysfunction in heart failure. *Circulation*, 129(17), 1742-1750. doi: 10.1161/circulationaha.113.008452
- Zhang, G. X., Ohmori, K., Nagai, Y., Fujisawa, Y., Nishiyama, A., Abe, Y., & Kimura, S. (2007). Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 42(4), 804-811. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.01.012
- Zhang, H., Makarewich, C. A., Kubo, H., Wang, W., Duran, J. M., Li, Y., . . . Houser, S. R. (2012). Hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808 is not involved in cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res*, 110(6), 831-840. doi: 10.1161/circresaha.111.255158
- Zhang, L., Franzini-Armstrong, C., Ramesh, V., & Jones, L. R. (2001). Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol*, 33(2), 233-247. doi: 10.1006/jmcc.2000.1295
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., & Jones, L. R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 272(37), 23389-23397.
- Zhang, T., Maier, L. S., Dalton, N. D., Miyamoto, S., Ross, J., Jr., Bers, D. M., & Brown, J. H. (2003). The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*, 92(8), 912-919. doi: 10.1161/01.res.0000069686.31472.c5
- Zhang, Y., Fraser, J. A., Jeevaratnam, K., Hao, X., Hothi, S. S., Grace, A. A., . . . Huang, C. L. (2011). Acute atrial arrhythmogenicity and altered Ca(2+) homeostasis in murine RyR2-P2328S hearts. *Cardiovasc Res*, 89(4), 794-804. doi: 10.1093/cvr/cvq229
- Zhang, Y., Matthews, G. D., Lei, M., & Huang, C. L. (2013). Abnormal Ca(2+) homeostasis, atrial arrhythmogenesis, and sinus node dysfunction in murine hearts modeling RyR2 modification. *Front Physiol*, 4, 150. doi: 10.3389/fphys.2013.00150
- Zhou, X., Fan, G. C., Ren, X., Waggoner, J. R., Gregory, K. N., Chen, G., . . . Kranias, E. G. (2007). Overexpression of histidine-rich Ca-binding protein protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Cardiovasc Res*, 75(3), 487-497. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.04.005
- Zhu, W., Zou, Y., Shiojima, I., Kudoh, S., Aikawa, R., Hayashi, D., . . . Komuro, I. (2000). Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, 275(20), 15239-15245.
- Zimanyi, I., & Pessah, I. N. (1991). Comparison of [³H]ryanodine receptors and Ca⁺⁺ release from rat cardiac and rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther*, 256(3), 938-946.

- Zissimopoulos, S., & Lai, F. A. (2005). Central domain of the human cardiac muscle ryanodine receptor does not mediate interaction with FKBP12.6. *Cell Biochem Biophys*, 43(2), 203-219. doi: 10.1385/cbb:43:2:203
- Zou, Y., Liang, Y., Gong, H., Zhou, N., Ma, H., Guan, A., . . . Ge, J. (2011). Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 58(6), 1099-1110. doi: 10.1161/hypertensionaha.111.173500
- Zygmunt, A. C., Goodrow, R. J., & Antzelevitch, C. (2000). I(NaCa) contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(5), H1671-1678.

ANNEXE

Circulation Research

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Ephrin-B1 Is a Novel Specific Component of the Lateral Membrane of the Cardiomyocyte and Is Essential for the Stability of Cardiac Tissue Architecture Cohesion

Gaël Genet, Céline Guilbeau-Frugier, Benjamin Honton, Etienne Dague, Michael D. Schneider, Christelle Coatrieux, Denis Calise, Christelle Cardin, Cécile Nieto, Bruno Payré, Caroline Dubroca, Pauline Marck, Christophe Heymes, Alexandre Dubrac, Dina Arvanitis, Fabien Despas, Marie-Françoise Altié, Marie-Hélène Seguelas, Marie-Bernadette Delisle, Alice Davy, Jean-Michel Sénard, Atul Pathak and Céline Galés

Circ Res. 2012;110:688-700; originally published online February 2, 2012;

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.262451

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/content/110/5/688>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2012/02/02/CIRCRESAHA.111.262451.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation Research* is online at:
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Ephrin-B1 Is a Novel Specific Component of the Lateral Membrane of the Cardiomyocyte and Is Essential for the Stability of Cardiac Tissue Architecture Cohesion

Gaël Genet,* Céline Guilbeau-Frugier,* Benjamin Honton, Etienne Dague, Michael D. Schneider, Christelle Coatrieux, Denis Calise, Christelle Cardin, Cécile Nieto, Bruno Payré, Caroline Dubroca, Pauline Marck, Christophe Heymes, Alexandre Dubrac, Dina Arvanitis, Fabien Despas, Marie-Françoise Altié, Marie-Hélène Seguelas, Marie-Bernadette Delisle, Alice Davy, Jean-Michel Sénard, Atul Pathak, Céline Galés

Rationale: Cardiac tissue cohesion relying on highly ordered cardiomyocytes (CM) interactions is critical because most cardiomyopathies are associated with tissue remodeling and architecture alterations.

Objective: Eph/ephrin system constitutes a ubiquitous system coordinating cellular communications which recently emerged as a major regulator in adult organs. We examined if eph/ephrin could participate in cardiac tissue cyto-organization.

Methods and Results: We reported the expression of cardiac ephrin-B1 in both endothelial cells and for the first time in CMs where ephrin-B1 localized specifically at the lateral membrane. Ephrin-B1 knock-out (KO) mice progressively developed cardiac tissue disorganization with loss of adult CM rod-shape and sarcomeric and intercalated disk structural disorganization confirmed in CM-specific ephrin-B1 KO mice. CMs lateral membrane exhibited abnormal structure by electron microscopy and notably increased stiffness by atomic force microscopy. In wild-type CMs, ephrin-B1 interacted with claudin-5/ZO-1 complex at the lateral membrane, whereas the complex disappeared in KO/CM-specific ephrin-B1 KO mice. Ephrin-B1 deficiency resulted in decreased mRNA expression of CM basement membrane components and disorganized fibrillar collagen matrix, independently of classical integrin/dystroglycan system. KO/CM-specific ephrin-B1 KO mice exhibited increased left ventricle diameter and delayed atrioventricular conduction. Under pressure overload stress, KO mice were prone to death and exhibited striking tissue disorganization. Finally, failing CMs displayed downregulated ephrin-B1/claudin-5 gene expression linearly related to the ejection fraction.

Conclusions: Ephrin-B1 is necessary for cardiac tissue architecture cohesion by stabilizing the adult CM morphology through regulation of its lateral membrane. Because decreased ephrin-B1 is associated with molecular/functional cardiac defects, it could represent a new actor in the transition toward heart failure. (*Circ Res.* 2012;110:688-700.)

Key Words: cardiomyocyte ■ extracellular matrix ■ lateral membrane ■ cardiac tissue ■ architecture ■ heart failure

The heart constitutes a particular compact organ relying on strong tissue architecture cohesion and tight cellular interactions that ensure both mechanical and electrochemical coupling. Thus, most cardiopathies are associated with cardiac tissue remodeling and with alterations in architecture involved in disease progression toward heart failure (HF).

Despite considerable advances in the field and development of effective drugs, HF still remains a prevalent condition associated with high morbidity and mortality rates. This could be in part explained by still imperfect knowledge of molecular basis at the origin of HF. In fact, to date, most research has focused on cardiomyocyte (CM) contractile dysfunction

Original received December 15, 2011; revision received January 16, 2012; accepted January 25, 2012. In December 2011, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 14.29 days.

From the Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 1048 (G.G., B.H., C.C., F.D., M.F.A., M.H.S., J.M.S., A.P., C.G., A.D., D.C., C.D., P.M., C.H.), Department of Histopathology (C.G.F., M.B.D.) and of Clinical Pharmacology (F.D., J.M.S., A.P.), Toulouse University Hospital, CNRS; LAAS, ITAV-UMS3039 (E.D.), Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, Ranguel Medical Faculty (C.N., B.P.), Development biology center, CNRS, UMR 5547 (D.A., A.D.), Paul Sabatier University Toulouse III, France. National Heart and Lung Institute, British Heart Foundation Centre of Research Excellence, Imperial College London, London, UK (M.D.S.).

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.262451/-/DC1>.

Correspondence to Galés Céline, Inserm U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, I2MC, 1, avenue Jean-Poulhès BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. E-mail celine.gales@inserm.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.262451

but has essentially ignored the importance of modifications in CM interactions with their environment in the cardiac tissue. Thus, a thorough analysis of CM interactions involved in the stability of cardiac tissue architecture may help in the identification of new potential therapeutic targets for prevention and treatment of cardiac remodeling leading to HF.

Functional adult CMs are organized within the tissue through both cell–cell interactions involving end-to-end contacts via the intercalated disk (ID) and cell–matrix interactions through receptors localized along the sarcolemma. Together, these structures control connections of contractile myofilaments to the plasma membrane of the CM and have garnered attention due to their involvement in cardiac diseases.^{1,2} Despite numerous junctions present at the ID have been well characterized,³ little is known regarding the molecular nature of lateral membrane components. To date, only integrin and sarcoglycan systems specifically connecting contractile apparatus of the CM to the extracellular matrix (ECM) have been described.^{4,5}

Eph receptor tyrosine kinases and their membrane-bound ligands ephrins form an essential intercellular communication system associated with cytoskeleton regulations.⁶ In the last few years, the role of Eph/ephrin system has been extensively investigated mainly in developing tissues, including the central nervous and vascular systems. Eph/ephrins have been implicated in various processes including neuronal network formation, guidance of migrating cells, and axonal pathfinding but also in the regulation of angiogenesis.^{7,8} More recently, Eph/ephrins have been shown to be major actors in the pathophysiology of cancer.⁹ So far, little is known regarding their putative roles in adult tissue but they have been reported to participate in modulation of bone remodeling¹⁰ and insulin secretion.¹¹ Finally, their role in the control of cell–cell interactions has been underlined in kidney¹² and crystalline lens¹³ emphasizing the importance of ephrin system in maintaining tissue architecture.

A role for EphA3 receptor has been identified in heart development and morphogenesis at the embryonic stage.¹⁴ Only a descriptive study reported the Eph/ephrin system expression in adult mouse heart ventricles and investigated the role of EphB4 on the contraction synchronization in fetal CMs.¹⁵ Mutations in the ephrin-B1 gene in humans have been associated with cranio frontonasal syndrome, which is characterized by craniofacial dysmorphies with some of the mutations associated also with cardiomyopathy.¹⁶ Moreover, several studies have reported specific ephrin-B1 regulation of cellular junctions such as gap junctions,¹⁷ tight junctions,¹⁸ and also ECM receptors.^{19,20} All of these junctions are important regulators for cell and tissue cohesion and are altered in different models of cardiomyopathy. Thus, we decided to explore the potential cardiac role of ephrin-B1.

In the present study, using an ephrin-B1 knock-out (KO) mouse model (*efnb1*^{-/-}), we identified ephrin-B1 as a new structural protein specific for the lateral membrane of the CM involved in adult cardiac tissue architecture stabilization. Using a wide array of approaches from light and electron microscopy, atomic force microscopy, and biochemical measurements to in vivo functional assays, we show that the lack

Non-standard Abbreviations and Acronyms

AAB	ascendant aortic banding
CM	cardiomyocyte
EC	endothelial cell
ECM	extracellular matrix
HF	heart failure
I-B4	isolectine-B4
ID	intercalated disk
KO	knock-out
WGA	wheat germ agglutinin
WT	wild-type

of ephrin-B1 leads to cardiac tissue alterations that may predispose to pathological responses under cardiac stress.

Methods

An expanded Methods section is provided in the Online Supplement.

Statistical Analysis

All data represent the mean ± SEM of 3 to 10 independent experiments as indicated. Statistical significance of the data were assessed using unpaired 2-tailed Student *t*-test (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, nonsignificant). In some cases, Chi square test was used instead (Kaplan-Meier curves).

Results

Ephrin-B1 Is Largely Expressed in Cardiac Muscle and Is Specific of the Endothelial Cell and the Lateral Membrane of the Mature Adult CM

We first assessed the expression of ephrin-B1 in adult heart from wild-type (WT) mice. Western blot analysis revealed abundant and specific expression of ephrin-B1 in whole cardiac tissue extracts (Figure 1A). Fluorescence imaging of heart cryosections revealed that ephrin-B1 was expressed in all heart compartments (left and right ventricles, septum; not shown). Cell membrane wheat germ agglutinin (WGA) costaining showed that the protein was specifically expressed at the lateral membrane of CMs with no expression in the ID (Figure 1B and 1C). Similar pattern of ephrin-B1 expression was obtained in CMs from adult rat cardiac tissue (Online Figure 1A). Beside CM staining, ephrin-B1 was also detected in endothelial cells (ECs) as previously described,¹⁵ from both micro and macrovasculature as demonstrated by colocalization with isolectin-B4, a specific EC marker (Figure 1B-C). Both CM and EC staining were completely lost in KO mice demonstrating the specificity for ephrin-B1 cardiac expression and localization (Figure 1B). Compartmentalizations of ephrin-B1 at both lateral membrane of CMs and ECs were further confirmed by immunogold electron microscopy (Figure 1D). Interestingly, ephrin-B1 localization in the CM was regulated during postnatal myocardial maturation period (3 weeks). Indeed, ephrin-B1 was totally absent from the lateral membrane of the CM the first postnatal days when it was only expressed in the nucleus (Online Figure 1A), whereas its expression at the lateral membrane correlated with the final adult CM maturation step, most likely indicat-

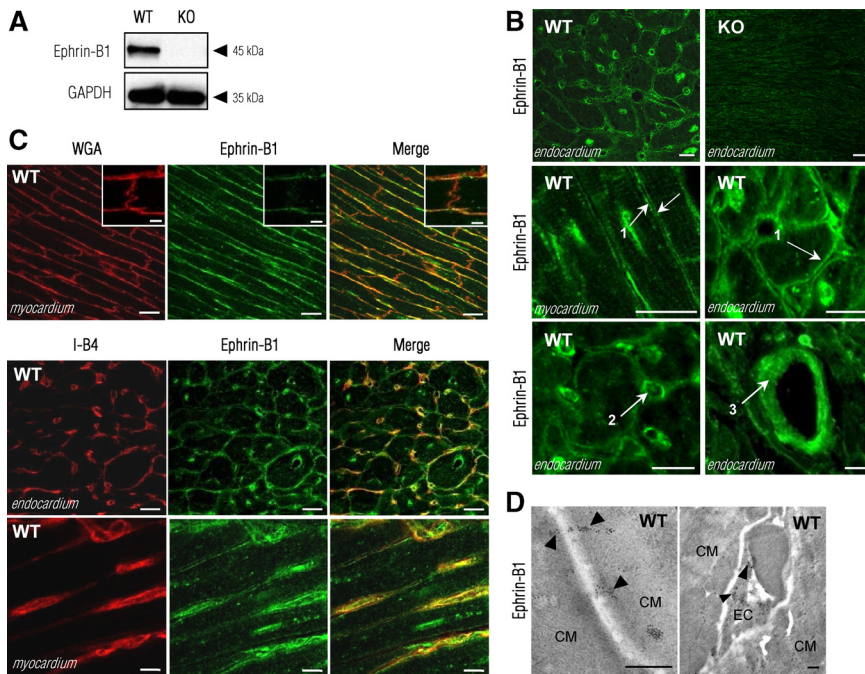


Figure 1. Localization of ephrin-B1 in the wild-type (WT) mouse heart. **A**, Western blot analysis of ephrin-B1 protein levels in cardiac tissue from 2-month-old WT mice. Ephrin-B1 cannot be detected in ephrin-B1 knock-out (KO) mice. GAPDH expression was used as reference. **B**, Immunofluorescence (IF) localization of ephrin-B1 in hearts from 2-month-old WT and KO mice at the plasma membrane of (1) cardiomyocytes (CMs) and (2) micro- and (3) macrovasculature. Specific ephrin-B1 staining is lost in KO mice. **C**, IF colocalization of ephrin-B1 with CMs lateral membrane and with endothelial cells (ECs) as shown by wheat germ agglutinin (WGA) (**C, upper**) and Isolectin-B4 (I-B4) (**C, lower**) staining respectively in WT mice. Ephrin-B1 is absent from the intercalated disk (**C, upper, inset**). **D**, Ephrin-B1 immunogold labeling confirmed its localization all along the CM lateral membrane (**left**) and in EC (**right**). Bars: 20 μm (**B** and **C**), 5 μm (**C, upper, inset**), 1 μm (**D**).

ing a specific role of this protein after birth in the lateral membrane of the mature CM. By opposition, ephrin-B1 expression/localization in adult ECs was already detected in ECs immediately after birth (Online Figure IB).

Ephrin-B1 Knockdown Disrupts Cardiac Tissue Architecture Cohesion and CM Morphology

To understand the role of ephrin-B1 in the mature CM, we analyzed the cardiac phenotype of the general ephrin-B1 KO mice that were previously described.²¹ We first undertook a histological analysis using H&E staining of cardiac tissue from WT and KO mice at different development stages (3 weeks and 2 months). Three weeks after birth, there was no evidence for cardiac tissue modification in KO mice compared with WT (Figure 2A, upper). However, at 2 months of age, in contrast to WT hearts characterized by a tight and strong cohesion between CMs, disorganization of CMs with a “wavy” aspect could be visualized randomly in all heart compartments (septum, right and left ventricle) from KO mice (Figure 2A, middle) with some CMs exhibiting whorled appearance (Figure 2A, lower). These changes were detected in all KO mice but presented focal distribution within the tissue. Thus, ephrin-B1 KO mice developed progressive alteration of the cardiac tissue architecture that correlated with the timing of ephrin-B1 lateral membrane expression in the mature adult CM from WT animals. Morphometric analysis of cell membranes by WGA-staining further confirmed modification of CMs morphology that lost their hallmark rod-shape (Figure 2B). Quantification studies demonstrated significant decrease in cross-sectional area of CMs from KO mice in fixated cardiac tissue (Figure 2C) with no difference in cell density (WT: 10.6 ± 0.7 CMs per mm^2 ; KO: 11.3 ± 1.1 CMs cells per mm^2). In agreement with tissue observations, isolated adult KO CMs displayed a significantly reduced short axis while increasing their long axis compared with WT (Figure 2D). Even though KO mice displayed CMs

morphology abnormalities, this was not correlated with development of cardiac fibrosis (Online Figure IIA). Aberrant cell differentiation during heart development could not account for morphological CM changes in KO mice, because all 3-week-old mice exhibited mature rod-shape CMs and tissue alterations were evident only 2 months after birth. It is noteworthy that despite broad expression of ephrin-B1 in the cardiac capillary network, 2-month-old KO mice showed no changes in capillary density as quantified by isolectin-B4 ECs-staining (Online Figure IIB) nor evidence for myocardial necrosis or inflammation as visualized on H&E staining, thus demonstrating integrity and functionality of the cardiac vasculature. Altogether, these results supported a role for ephrin-B1 in the maintenance of adult cardiac tissue architecture essentially by controlling CMs morphology.

Ephrin-B1 Regulates Lateral Membrane Structure, Nanomechanical Properties, and Molecular Composition of the Cardiomyocyte

Given the specific expression of ephrin-B1 at the lateral membrane of the CM, we questioned whether disturbance of the lateral membrane accounted for the abnormal CM morphology in KO mice. Electron microscopy revealed significant structural alterations of the lateral junction characterized by an abnormal nonlinear appearance compared with WT mice (Figure 3A). To rule out contribution of other cardiac cell types in the CM phenotype, we generated a CM-specific ephrin-B1 KO mice (cKO) (Online Figure III). In cKO mice, we confirmed lateral membrane disorganization of the CM (Online Figure IVA). In correlation with the alteration of the CM lateral membrane structure, atomic force microscopy study revealed a significant 3-fold increase of young modulus (elasticity) in CMs from KO mice ranging from 35.5 ± 6.4 kPa to 62.4 ± 13.1 kPa compared with 12.5 ± 1.3 kPa to 21.3 ± 3.6 kPa in WT mice (Figure 3B), thus indicating that the lack of ephrin-B1 in the CM increased the stiffness of the

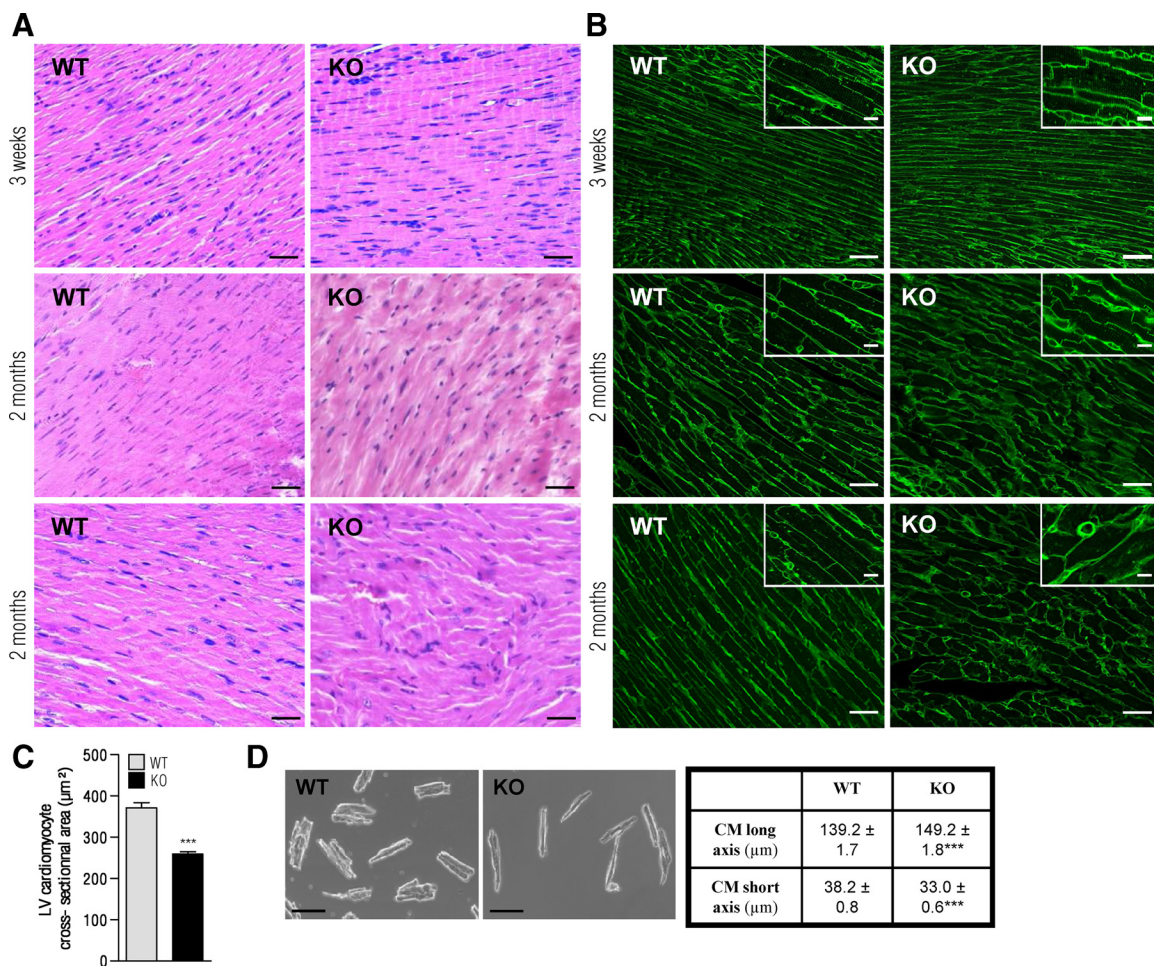


Figure 2. Progressive cardiac tissue architecture disarray and adult cardiomyocyte (CM) morphology alteration in ephrin-B1 knock-out (KO) mice. **A**, H&E staining of cardiac tissue from 3-week- and 2-month-old mice showed cardiac tissue disarray in KO mice starting at 2 months of age. **B**, Wheat germ agglutinin (WGA)-immunofluorescence (IF) staining highlighted loss of rod-shape morphology of CMs in KO mice at 2 months of age. **C**, CMs area from 2-month-old mice were measured on WGA-stained heart sections and showed significant decrease of cross-sectional area of CMs from KO mice ($n=3-5$ per mice lineage group, 50–60 CMs per mouse). **D**, CMs isolated from 2-month-old KO mice displayed a long axis increase and short axis decrease. ($n=2$ mice per lineage group, 150–180 CMs per mouse.) Scale bars: 50 μm (**A** and **B**), 15 μm (**B**, insets), 100 μm (**D**). LV indicates left ventricular; WT, wild-type.

lateral membrane. It must be noticed that the repartition of young modulus was very homogeneous throughout the lateral membrane of WT CMs, although it showed high heterogeneity in KO CMs as represented by the larger distribution of young modulus frequency (Figure 3B, lower panels), most probably reflecting different levels of morphology modifications at the lateral membrane surface.

To understand the molecular basis accounting for this phenotype and given the interaction of the lateral membrane of the CM with the ECM, CM–matrix interactions predominantly regulated by integrin- and dystroglycan-based complexes were first analyzed. We found that localization (Online Figure VA) and expression (Online Figure VB) of both $\beta 1$ -integrin and β -sarcoglycan/ α -dystroglycan (glycosylation) complex along the plasma membrane were unchanged in hearts from KO mice compared to WT as shown by immunofluorescence and immunoblot staining respectively, thus demonstrating regular and functional CM–matrix junction complexes in the absence of ephrin-B1. We looked then at the tight junction transmembrane protein claudin-5, a

specific endothelial cell tight junction component, which was previously localized at the lateral membrane of the CM and whose downregulation correlated with similar modification of lateral membrane structure in mice models of cardiomyopathy to that observed in ephrin-B1 KO mice.²² We confirmed the presence of claudin-5 in the microcirculation and along the lateral membrane of CMs in control hearts (Figure 3C; Online Figure IVB) and did not detect any labeling in the ID. Specific expression of claudin-5 at the lateral membrane of the CM was more readily detectable in rat heart (Online Figure VC). By contrast, claudin-5 was completely absent from the lateral membrane in both general and conditional ephrin-B1 KO mice (Figure 3C and Online Figure IVB) and showed specific downregulation as revealed by the significant decrease in protein (Figure 3D), and gene expression level (Figure 3E), thus suggesting specific regulation of claudin-5 by ephrin-B1. Similarly, the intracellular scaffolding claudin-associated-protein ZO-1, which was detected at both lateral membrane and ID in CMs from control hearts (Figure 3C, left panel, and Online Figure IVC), disappeared

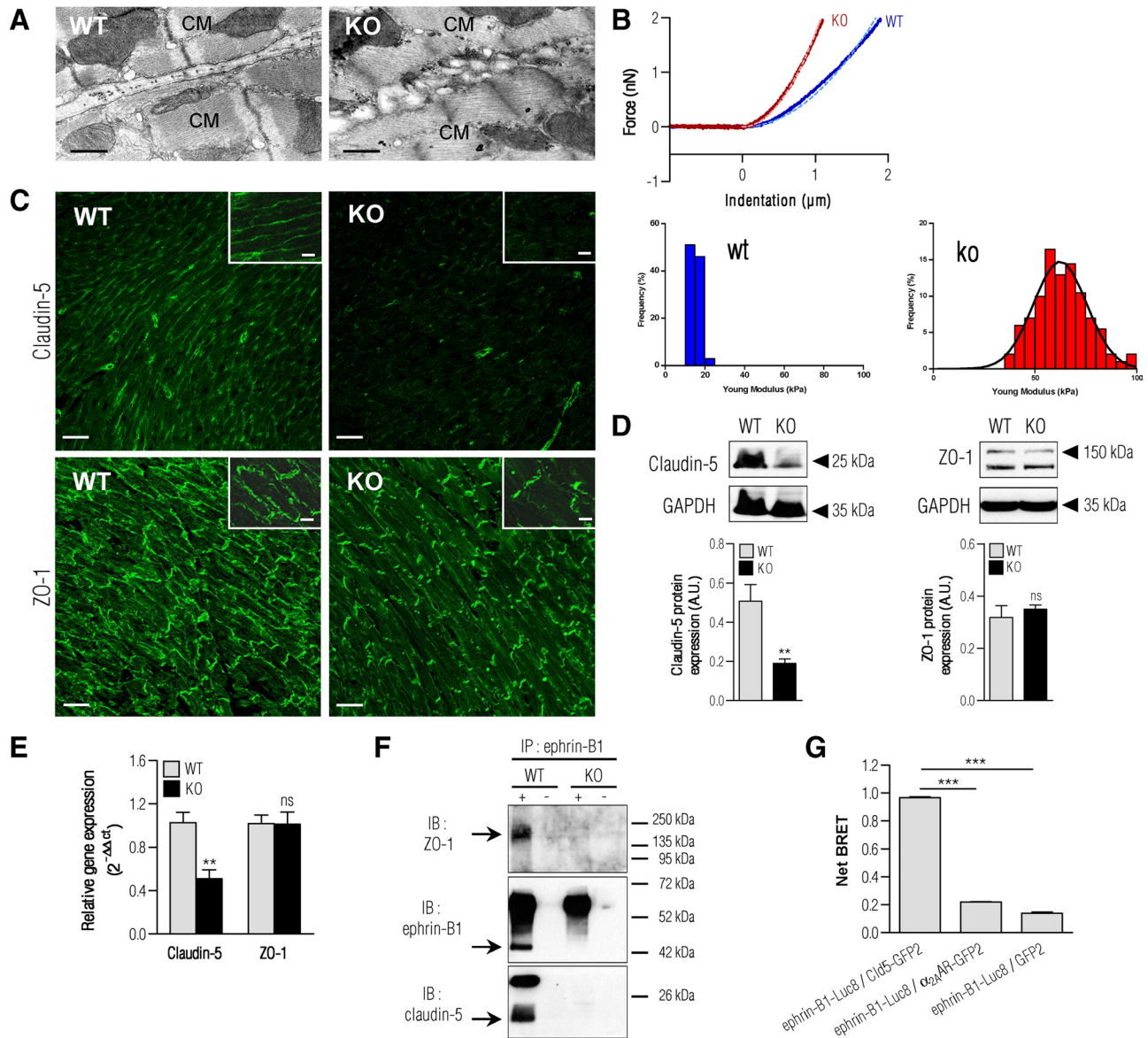


Figure 3. Ephrin-B1 stabilizes the lateral membrane structure, stiffness and molecular composition of the cardiomyocyte (CM). **A**, Electron microscopy shows high disorganization of the lateral membrane in CMs from knock-out (KO) mice. **B**, (Upper panel) Representative single indentation curve (plain line) from atomic force microscopy (AFM) studies performed on wild-type (WT) (blue, $n=3$ mice, 4 CMs per mouse, 470 total curves) or KO (red, $n=3$ mice, 4 CMs per mouse, 528 total curves) living CMs. In both cases, the Hertz model (dotted line) fitted quite well with experiment. (Lower panel) Distribution of the young modulus (elasticity) was homogeneous in WT CMs whereas KO mice exhibited a high standard deviation (larger E distribution). **C**, Immunofluorescence analysis revealed that ephrin-B1 KO mice lost claudin-5 and ZO-1 proteins localization at the lateral membrane of CMs while delocalizing in the ID and showed (D) specific downregulation of claudin-5 protein expression ($n=6-7$ per mice lineage group) and (E) gene expression ($n=6$ per mice lineage group; ns) as assessed by Western blot and qPCR analysis respectively. **F**, Ephrin-B1 immunoprecipitation experiments (IP+) followed by Western blot analysis on isolated CMs demonstrated the existence of complexes between ephrin-B1, claudin-5, and ZO-1 in WT mice as indicated. Note the lack of ephrin-B1, ZO-1, or claudin-5 immunodetection in KO mice. (IP-), control IP experiments performed in the absence of ephrin-B1 antibody. **G**, BRET experiments in HEK-293T cells showed specific direct interaction between ephrin-B1 and claudin-5 compared with controls (soluble GFP2 or α_2A -adrenergic transmembrane receptor) ($n=3$). Scale bars: 1 μ m (A), 50 μ m (C), 25 μ m (C, insets).

from the lateral junction in KO and cKO mice (Figure 3C and Online Figure IVC). However, ZO-1 further accumulated in the ID as evidenced by the significant increase in ZO-1 fluorescent staining (Figure 3C, WT: 112.0 ± 6.2 fluorescence/pixel² KO: 138.3 ± 8.2 fluorescence/pixel², means \pm SEM, $P < 0.05$). Relocalization of ZO-1 was further supported by the lack of modification of ZO-1 protein (Figure 3D) and gene expression (Figure 3E). Altogether, these results supported a role for ephrin-B1 in the stabilization of claudin-5/

ZO-1 junctional complex at the lateral membrane of the CM. The regulation of claudin-5 by ephrin-B1 at the lateral membrane most likely relates to a direct mechanism because both claudin-5 and its ZO-1 partner were found associated with ephrin-B1 in isolated CMs as shown by coimmunoprecipitation (Figure 3F) and claudin-5 could directly interact with ephrin-B1 in BRET experiments (Figure 3G). Specific destabilization of claudin-5/ZO-1 complex in ephrin-B1 KO mice most likely preceded and initiated the lateral membrane

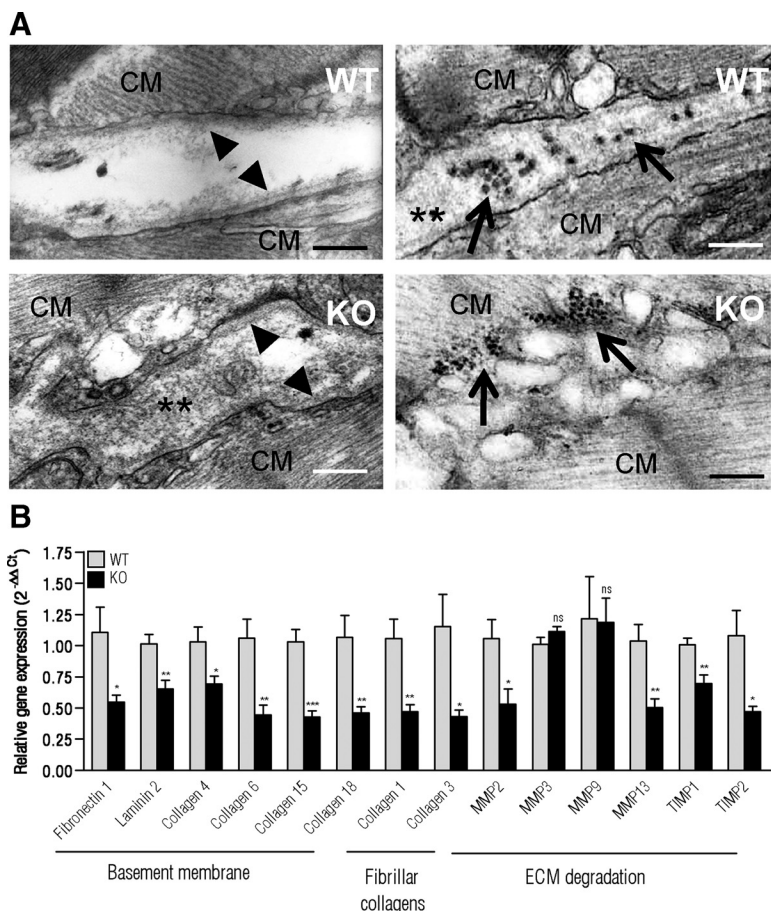


Figure 4. Extracellular matrix defects in ephrin-B1 2-month-old knock-out (KO) mice. **A**, Electron micrographs of interstitial space between lateral membrane of 2 cardiomyocytes (CMs) from wild-type (WT) and KO mice. Note high basement membrane disarray (left, arrowheads) and fibrillar collagens (right, arrows) and nonfibrillar protein deposit (asterisks) disorganization in KO mice. **B**, Comparative qPCR analysis revealed significant decrease of mRNA expression levels of proteins from basement membrane, interstitial extracellular matrix (ECM; fibrillar collagens), and ECM degradation system (matrix metalloproteinases [MMPs]), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in total RNA extracts from isolated CMs from KO mice. (n=6–10 per mice lineage group). Scale bars: 0.2 μ m (A).

disorganization of the CM. Indeed, lack of claudin-5 at the lateral membrane was evident in all CMs from 2-month-old KO mice, whereas modification of their lateral membrane structure was only focal at same age. It follows that ephrin-B1 may regulate the morphology of the CM by controlling lateral membrane structure, probably through its interaction with the specific adhesion protein claudin-5.

Ephrin-B1 Knockdown Impairs Basement Membrane of the CM and Fibrillar Collagens Organization

Because CMs are anchored to the ECM through their lateral membrane and ephrin-B1 KO mice exhibited structural alteration of the lateral membrane, we examined the morphology of cardiac ECM from KO and WT mice by electron microscopy. In contrast to the well-organized pattern in WT, the basement membrane and the fibrillar collagen bundles were highly disorganized in the KO mice (Figure 4A) as well as in cKO mice (Online Figure IVD), most likely indicating destabilization of the overall ECM structure. Interstitial space separating 2 adjacent CMs was irregular in all ephrin-B1 KO/cKO mice (Figure 4A, Online Figure IVD). These modifications correlated well with those of the lateral membrane as they are detectable only in CMs showing high levels of lateral membrane defects. Abnormalities of the ECM structure observed in KO mice most likely related to an impairment of expression of all ECM components/regulators by the CM because their expression levels were all dramati-

cally reduced as measured by quantitative qPCR (Figure 4B). However, the reduced expression of interstitial fibrillar collagens and degradation ECM system by the CM did not impact their expression in the whole cardiac tissue (Online Figure VI). This most probably related to the contribution of the other cardiac cells in the synthesis of the ECM components. In agreement with these observations, we didn't notice any modifications of cardiac collagen I and III levels between WT and KO mice as previously indicated (Online Figure IIA). By contrast, basement membrane components of the CM are specific for the myocyte cell only. Given the importance of the basement membrane in controlling cell morphology, these results suggest that ephrin-B1 maintains lateral membrane morphology of the adult CM by a new mechanism involving regulation of its interaction with the basement membrane. This specific CM–matrix interaction underlies a novel role in the stabilization and organization of the cardiac ECM.

Ephrin-B1 Knockdown Results in Abnormal Intercalated Disk and Sarcomeric Structure

Because lateral membrane of the CM is directly connected at both end to the ID that anchors myofilaments, we next examined whether modifications of the lateral membrane in these mice impacted on the different cell–cell junctions of the ID and the sarcomeric apparatus. In opposition to WT mice characterized by ID-components from adherent junction (N-cadherin), desmosomes (desmoplakin 1/2), and gap junctions

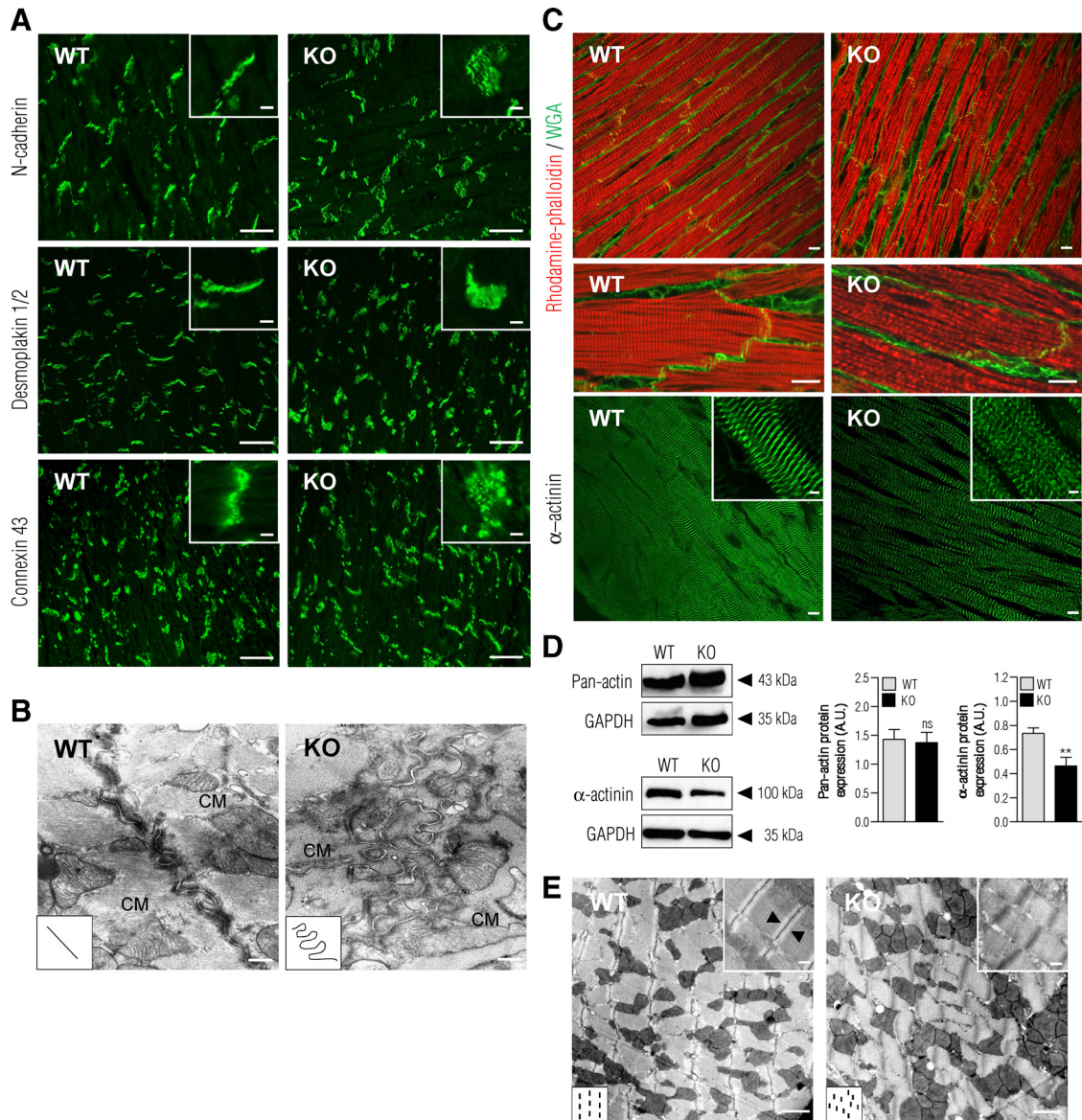


Figure 5. Ephrin-B1 knock-out (KO) mice exhibited disorganized intercalated disk (ID) and sarcomeres. **A**, Immunofluorescence localization of adherent junction (N-cadherin, **upper**), desmosomes (desmoplakin 1/2, **middle**), and gap junction (connexin 43, **lower**) in heart sections from 2-month-old mice revealed an irregular dot-spot localization of the proteins along the ID in KO mice. **B**, Distortion of ID ultrastructure could be observed in KO mice (inset highlights simplistic representation of ID morphology). **C**, Immunofluorescence staining of myofilaments (Rhodamine-phalloidin) or Z-lines (α -actinin) in heart cryosections from 2-month-old mice indicated myofibrils and Z-lines misalignment in KO mice correlating (**D**) with downregulation of α -actinin protein expression as shown by Western blot analysis in whole cardiac tissue extracts. No modification of total actin levels was detected ($n=6-7$ per mice lineage group). **E**, Ultrastructure of sarcomeres showed loss of I band (wild-type [WT], **arrowheads**), misalignment of both myofibrils and sarcomeres in KO mice (inset highlights simplistic representation of Z-lines organization). Scale bars: 30 μm (**A**), 5 μm (**A**, **insets**) 0.5 μm (**B**), 10 μm (**C**), 3 μm (**C**, **inset**), 2 μm (**E**), 0.75 μm (**E** inset). WGA indicates wheat germ agglutinin.

(connexin-43) regularly organized along the ID (Figure 5A), these proteins demonstrated a significant spatial disorganization in the KO mice showing irregular spread dots labeling along a wider ID with no modification of their expression levels (Online Figure VIIA–VIIC). These modifications most likely emanated from ultrastructural alterations of the ID as shown by the higher degree of circumvolution of the ID in electron micrographs from KO hearts (Figure 5B). Beside abnormal ID structure, there was not clear modification of the ID space between CMs from WT and KO mice (Online Figure VIID) nor apparent disorganization in the electron-dense structures associated with the ID or in the myofila-

ments attachments at these locations. Generally, alteration of proteins directly participating in ID structure influences expression of other ID components.²³ Thus, modification of ID morphology without any modulation of associated junctional components most likely indicates an indirect consequence of ephrin-B1 deletion linked to the lateral membrane deconstruction.

Ephrin-B1 deficient CMs displayed misalignment of both their myofibrils as indicated by rhodamine-phalloidin staining (Figure 5C, upper panels) despite no change in the total amount of Pan-actin (Figure 5D). In correlation with myofibrils structure defects, α -actinin staining also revealed Z-lines

misalignment (Figure 5C, lower panels) associated with significant loss of α -actinin expression (Figure 5D). These changes were detected in all 2-month-old KO mice but still exhibited focal localization within the heart tissue most likely reflecting an indirect consequence of ephrin-B1 deletion at the lateral membrane. Similar Z-lines misalignment was reported in mice models with deletion of intermediate filament desmin or desmin-associated proteins.^{24,25} However ephrin-B1 KO phenotype is unlikely to be related to desmin deregulation because desmin expression and attachment to Z-lines was preserved (Online Figure VIIIA and VIIIB). Finally, despite structural changes in the myofilaments in KO mice, we did not observe any modification of microtubule networks as indicated by similar expression and distribution of tubulin in CMs from WT and KO mice (Online Figure VIIIC and VIID). Electron microscopy confirmed structural sarcomeric disorganization that could account for disruption of myofibrillar organization (Figure 5E). Indeed, KO mice exhibited high heterogeneity of their sarcomeres morphology (Online Figure VIIIE–VIIG) together with a lack of actin-enriched I-bands in all sarcomeres (Figure 5E) despite no modification of total actin expression (Figure 5D), most likely indicated relaxed aspect of the sarcomere. Similar ultrastructural abnormalities of sarcomeric apparatus have been observed in the cKO mice (Online Figure IVE). Again, modification of sarcomeric structure of CMs from KO mice without major modification of its integrity more probably related to indirect consequences of the deletion of ephrin-B1 rather than a direct role of this protein in the contractile apparatus per se.

Ephrin-B1 Knockdown Results in Left Ventricle Chamber Dilatation and Cardiac Electric Conduction Impairment

To test whether ephrin-B1 played a role in cardiac physiology, we analyzed the cardiac phenotype of *efnb1*^{-/-} mice. At 2 months of age, ephrin-B1 deficient mice (KO, cKO) displayed no difference in heart-to-body weight ratio compared with respective controls (Table, upper). Interestingly, echocardiography analysis revealed significant intraventricular dilatation in ephrin-B1 KO mice as shown by significant enlargement of the left ventricle at end diastole with no change in left ventricular wall dimensions or gross alterations in systolic contractile performance compared with WT (Table, middle). Enlargement of left ventricle at end diastole was confirmed in cKO mice but with further significant decrease of interventricular septum thickness in diastole and left ventricular wall dimensions (Table, middle). Beside cardiac morphology and contractile function, electric properties of the heart were investigated by electrocardiography. Although depolarization and repolarization of the KO ventricle were normal (QRS complex and QT interval), both *efnb1* KO and cKO mice exhibited significant bradycardia associated with a decrease of the atrioventricular conduction as evidenced by a prolonged PR interval compared with WT mice (Table, lower). Taken together, these data indicated that the specific absence of ephrin-B1 in the CM promoted defects in both heart morphology and conduction.

Table. Morphometry and Cardiac Function of 2-Month-Old Ephrin-B1 WT and KO Mice and of 2-Month-Old Control and cKO Mice

	WT	KO	Control	cKO
Mice morphometry	(n=13)	(n=18)	(n=6)	(n=6)
BW (g)	30.5±4.7	30.0±3.9	25.5±0.2	25.1±0.6
HW (mg)	149±2	152±2	153±4	146±3
HW/BW (mg/g)	4.9±1.0	5.0±0.4	6.0±0.2	5.9±0.2
LW (mg)	188±2	183±2	151±4	143±3
LW/BW (mg/g)	6.2±0.7	6.2±1.2	5.9±0.1	5.7±0.1
Echocardiography	(n=13)	(n=18)	(n=6)	(n=6)
IVSTd (mm)	0.83±0.06	0.85±0.07	0.86±0.02	0.80±0.01*
DPWT (mm)	0.86±0.07	0.84±0.08	0.90±0.02	0.80±0.01**
LVEDD (mm)	3.01±0.29	3.41±0.38**	3.17±0.05	3.48±0.05**
LVESD (mm)	2.01±0.25	2.25±0.37	2.13±0.06	2.28±0.07
FS (%)	33.3±3.9	34.4±5.3	33.9±1.2	34.2±1.7
EF (%)	68.7±5.5	69.7±7.1	69.7±1.3	70.0±2.2
Electrocardiography	(n=20)	(n=17)	(n=8)	(n=9)
RRi (ms)	172±4	191±6***	132±2	144±3*
PR (ms)	35.4±1.3	39.4±1.1***	37.3±0.5	42.4±1.3*
QRS (ms)	11.7±0.4	11.9±0.8	12.4±1.1	12.8±0.6
QTc (ms)	51.6±3.2	48.5±2.1	51.0±1.7	54.7±2.3

WT indicates wild-type; KO, knock-out; cKO, CM-specific ephrin-B1 KO; W, body weight; HW, heart weight; LW, lung weight; IVSTd, interventricular septum thickness in diastole; LVEDD, left ventricle end of diastole diameter; DPWT, diastolic posterior wall thickness; LVESD, left ventricle end-systole diameter; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction; RRi, RR interval duration; PR, atrio-ventricular conduction time; QRS, complex duration; QTc, duration of QT corrected using Bazett formula. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Ephrin-B1 Knockdown Confers Mice Hypersensitivity to Pressure Overload

Given high modifications of cardiac tissue cohesion detected in *efnb1*^{-/-} mice, we assessed its adaptive response to biomechanical stress imposed to the left ventricle under conditions of high blood pressure after ascendant aortic banding (AAB) as previously described.²⁶ Remarkably, 59% of the ephrin-B1 KO mice died 24 hours following AAB, compared with no death in the WT group (Figure 6A). Although we are uncertain why ephrin-B1 KO mice perished, banded mice that survived 30 days of AAB exhibited higher variation of cross-sectional area of myocytes from KO banded (Figure 6B) and higher variations in interventricular septum or left ventricular posterior wall thickness (Online Figure IXA, Online Tables I–III) measured before and after AAB. However, we measured similar fetal reprogramming, development of reparative fibrosis, and heart weight/body weight ratio in KO and WT mice (Online Figure IXB and IXC), thus indicating that increased myocyte size in KO mice most likely related to morphological defect of the CM and not to an increased cardiac hypertrophy. Interestingly, although systolic function was not significantly different 30 days after AAB between WT and KO mice, high ejection fraction variability was noticed exclusively in KO, with some animals showing high ejection fraction reduction (Figure 6C) correlating with left ventricle at end diastole dilatation (Figure 6D). More striking feature of cardiac tissue from KO banded

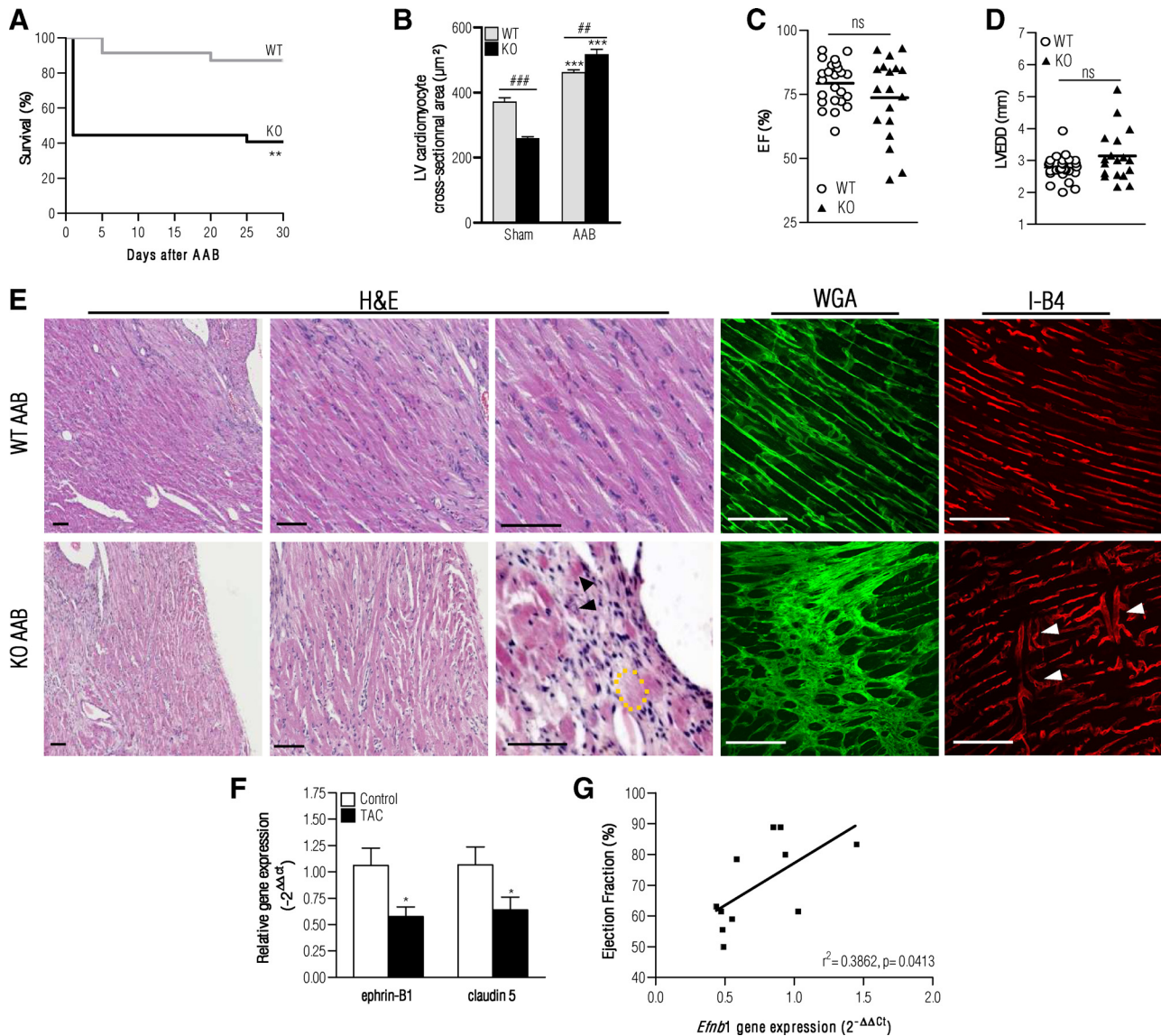


Figure 6. Ephrin-B1 is essential for the cardiac adaptation to pressure overload. Two-month-old wild-type (WT) or ephrin-B1 knockout (KO) mice were subjected to ascending aortic banding (AAB). **A**, Kaplan-Meier survival analysis of WT (n=27) and KO (n=23) mice. **B**, Cardiomyocytes (CMs) area were measured on wheat germ agglutinin (WGA)-stained heart sections and showed significant higher cross-sectional area in KO mice 30 days after AAB (mean±SEM, n=6–12 mice per lineage group; *** P <0.001 vs sham control of the same genotype, ### P <0.01, ### P <0.001 vs WT of the same group, unpaired 2-tailed Student t test). **C**, Echocardiographic measurements of ejection fraction (EF) or **(D)** left ventricle at end diastole (LVEDD) 30 days after AAB showed high heterogeneity in KO mice compared with WT with some mice developing heart failure (mean and experimental points, n=23 WT, n=18 KO). **E**, H&E staining of heart sections from WT or KO banded mice identified high disorganization of cardiac tissue architecture in KO mice. Note intersected and whorled CMs (left, middle) as well as CMs necrosis (right, dot-lines, **arrowheads**). Cell membranes WGA-staining of heart sections confirmed CMs disarray in the myocardium of KO mice. Endothelial cells isolectin-B4 (I-B4) staining of heart sections also identified microcirculation disorganization with some capillaries crossing the myocardium in KO mice (**arrowheads**). **F**, Cardiomyocyte *efnb1* and *claudin5* gene expression (qPCR) in WT mice submitted to transverse aortic banding (TAC) for 15 days (n=6) or in controls (n=5). **G**, Linear regression analysis showing the existence of a relationship between CM *efnb1* gene expression level (qPCR) and EF (echocardiography) in WT mice submitted or not to TAC. Scale bars: 100 μ m (**E**).

animals came from histomorphologic analysis that revealed fundamental tissue disarray with loss of CM integrity that reminisces that of human patients with end-stage HF.²⁷ Myocytes intersect at various angle and showed whorled appearance, thus indicating a lack of CMs stability within the tissue (Figure 6E, H&E). Modifications in interstitial collagens I and III could not account for the instability of CMs because their gene expression levels were similar in both WT and KO cardiac tissue (Online Figure IXD). Myofibrils can

be seen running in different directions (Figure 6E, H&E, left-middle). Cardiac tissue demonstrated signs of CMs necrosis characterized by cellular swelling, disruption of myofibrils, loss of nuclei and cytoplasmic details and inflammatory cells in close contact to cell debris (Figure 6E, H&E, right). Modifications of CMs were largely evident on WGA-heart sections staining (Figure 6E, WGA). Phenotypic changes of cardiac tissue from KO banded mice also included high dilatation and disorganization of the vessels from the

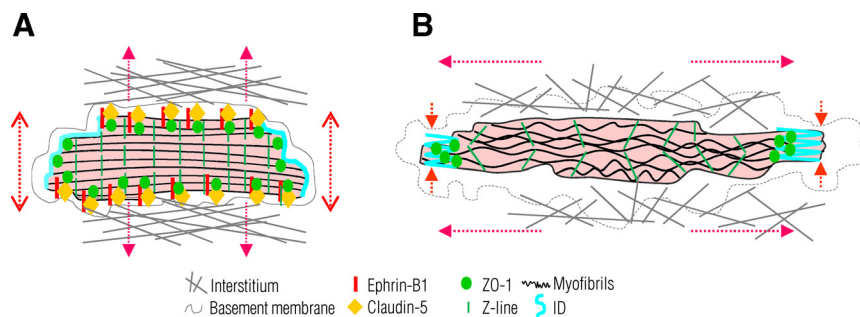


Figure 7. A proposed model for ephrin-B1-mediated stabilization of the adult CM lateral membrane. **A**, In normal adult cardiomyocyte (CM), ephrin-B1 interacts with claudin-5/ZO-1 complex and stabilizes its localization at the lateral membrane and the interaction of the lateral membrane with the extracellular matrix, thus exerting mechanical tension and stretching both the ID and Z-lines (red arrows). This interaction maintains extracellular matrix (ECM) structural integrity. **B**, In the absence of ephrin-B1, claudin-5

disappeared from the lateral membrane while ZO-1 delocalized to the ID and the lateral membrane loses anchorage at the ECM. This leads to morphological modifications of the CM characterized by a long axis increase and short axis decrease (red arrows) which probably accounts for the increased stiffness of the lateral membrane. Altogether, these lateral membrane alterations indirectly impact on ID, Z-lines, basement membrane and interstitial matrix constitution/organization.

microcirculation which were crossing and interrupting orientation of CMs in the myocardium (Figure 6E, isolectin-B4) despite no change in the capillary network density (Online Figure IXE). We found high heterogeneity of these features in all KO mice. Interestingly, morphological cardiac tissue disorganization correlated perfectly with loss of cardiac performance because KO banded mice demonstrating worst shortening fraction exhibited the more dramatic cardiac tissue architecture disarray. In correlation with a putative role of ephrin-B1 in transition toward HF, we found that encoding genes for ephrin-B1 and its cognate claudin-5 partner were significantly reduced in CMs from a mouse model of transverse aortic constriction-induced HF (Figure 6F, Online Table IV) and that ephrin-B1 gene expression positively correlated with ejection fraction (Figure 6G). Thus, cardiac expression of ephrin-B1 is essential for early survival after severe pressure overload and represents a negative regulator of associated cardiac architecture disorganization. Altogether, these results highlighted the importance of ephrin-B1 in the adaptive response to pressure overload.

Discussion

In this study, we identify ephrin-B1 as a novel component of the lateral membrane of the adult CM. General loss of ephrin-B1 leads to a progressive disorganization of cardiac tissue architecture associated with adult CM morphology defects directly related to the absence of ephrin-B1 at CM lateral membrane as demonstrated in the conditional CM-specific ephrin-B1 KO mouse model. Ephrin-B1 controls CM morphology through stabilization of the lateral membrane by a novel mechanism most likely involving its interaction with the ECM independently of the mechanotransduction systems. Cardiac architecture abnormalities are associated with an increased left ventricle diameter and delayed atrio-ventricular conduction. Finally, although the absence of ephrin-B1 did not modify compensatory adaptation to pressure overload stress, it precipitates cardiac tissue disorganization classically observed in human HF. These data clearly indicate that ephrin-B1 is an important regulator of cardiac tissue architecture that could be involved in cardiac pathologies.

Ephrin-B1 deficiency leads to specific morphological and molecular modifications of the lateral membrane of the CM associated with subsequent alterations of the ID and sarcomeric apparatus structure and loss of ECM integrity. We

propose a model whereby ephrin-B1 stabilizes rod-shape adult CM morphology by regulating specific interactions between the lateral membrane and the ECM and thus the tension force distribution at the cell surface (Figure 7). Accordingly, in the absence of ephrin-B1, the CM shrinks and lengthens as a consequence of lateral membrane destabilization thus increasing membrane stiffness as demonstrated by atomic force microscopy studies. In WT mice, the lateral tension generated by the cell-matrix interaction within the CM could play an indirect role in stretching both sarcomeric apparatus and the ID (Figure 7). To date, only ECM receptors localized all along the sarcolemma of the CM acting were identified as direct lateral tensors for sarcomeres.^{1,28–30} Thus, the lack of ephrin-B1 induces detachment of the lateral membrane from the ECM and compresses the ID. As a consequence of ID compaction and because ID structure is known to anchor and stretch myofibrils, CMs exhibit myofibrils misalignment, irregular sarcomere size, and loss of visible actin thin strand I-band. Similar modifications have been observed in transgenic mouse models with modifications of ID structure.²³ Finally, misalignment of Z-lines in CMs from *efnb1*^{-/-} mice despite the lack of modification in desmin filaments also most likely related to the loss of lateral tension at the cell membrane. Thus, the decrease of CM width may probably indirectly relax the desmin network attached to the lateral membrane thus mimicking CM features observed in the absence of desmin.^{24,25}

Previous studies have already suggested a role for ephrin-B1 in the maintenance of cytomorphology of epithelial cells in the adult kidney,¹² as well as for other members from eph/ephrin family in different tissues.^{13,14} However, our data provide first evidence for its importance in stabilization of cardiac tissue architecture independently of cell-cell interaction given the absence of CMs connection through the lateral membrane where it is specifically expressed. Several studies have proposed a role for ephrin-B1 independently of its trans interaction with its cognate Eph receptor,³¹ for instance by directly interacting in cis with claudin proteins core component of the tight junction. Similarly, ephrin-B1 was found to directly interact with claudin-5 in adult CMs to stabilize its localization at the lateral membrane. Unexpectedly, the presence of claudin-5 in the absence of tight junctions at the lateral membrane suggests a new role for claudin-5. The unusual presence of claudin proteins in non-

junctional cell membranes was already reported with some isoforms interacting with unrelated transmembrane receptor.^{32,33} However, the functional significance of claudin proteins apart from the intercellular tight junction is currently unknown. Similar observations have already been described for gap junction core components connexins, another class of adhesion molecules, outside the gap junction, where they exhibit new function.³⁴ The fact that the ephrin-B1/claudin-5 complex was localized all along the plasma membrane could argue for its specific role in directly connecting lateral membrane of the CM to the ECM. However, whether ephrin-B1 or claudin-5 could act as a direct receptor for ECM components has never been shown. Nevertheless, our observations argue for a new role for ephrin-B1 in stabilization of claudin adhesion molecules at the plasma membrane independently of tight junctions.

Ephrin-B1 expression at the lateral membrane of the CM occurs only following the first postnatal days and only during the CM terminal differentiation process (postnatal days 1–20) when it acquires its characteristic rod-shape morphology. Because the lateral membrane of the adult CM is required for maintenance of its characteristic rod-like shape, its modification in the ephrin-B1 KO mice could alter the paving shape of the CM as readily observed. Nevertheless, if ephrin-B1 actively participates in the establishment of the lateral membrane and thus the adult CM morphology, one would have expected that in its absence, CMs would never achieve their characteristic rod shape. This is however unlikely because CMs still achieve their mature rod shape in KO mice as evidenced in 3-week-old animals and show progressive morphological transformation only after 2 months of age, thus highlighting a role for ephrin-B1 independently of CM maturation initiation process. Therefore, ephrin-B1 more likely plays a role in stabilizing the lateral membrane of the CM subsequently to lateral membrane set up. In line with this assumption, alteration of the adult CMs morphology in the absence of ephrin-B1 appears progressively only after 2 months of age correlating with ephrin-B1 late timing set up at the lateral membrane of the adult CM. Thus, adult CMs morphology defects detected in ephrin-B1 KO mice strikingly referred to the role of ephrin-B1 at the lateral membrane of the mature CM.

Our study highlights a new mechanism involved in CM–ECM interaction specific to the lateral membrane but independent from the classical integrin and dystroglycan systems establishing physical connections between the ECM and the intracellular contractile machinery. Accordingly, mice exhibiting defects in one of these 2 systems clearly demonstrate specific cardiac contractility defects.^{35–38} By opposition and in agreement with integrin or dystroglycan independent pathways, contractile function was preserved in ephrin-B1 KO mice, thus correlating with the lack of dramatic changes in sarcomeric apparatus core components. Moreover, integrity/functionality of the integrin system in ephrin-B1 KO mice is further supported by the expected classical adaptation to pressure overload known to be directly sensed by integrins. Finally, the lack of integrin or dystroglycan components did not lead to structural abnormalities of the lateral membrane as observed in ephrin-B1 KO mice.

Also, it appears that this specific CM lateral membrane–ECM interaction supports a new structural role for the cardiac tissue architecture in maintaining overall integrity of both CMs and the ECM. Similar pattern of ECM disorganization has been already described in hearts from mice lacking collagen XV expression, which connects basement membrane of the CM to the fibrillar matrix.³⁹ The fact that *efnb1*^{−/−} mice exhibited considerable downregulation of all the components of the basement membrane of the CM most probably arised from a consequence of the disruption of lateral membrane–ECM interaction rather than a direct role on basement membrane synthesis per se. In agreement with this hypothesis, 3-week-old KO mice show preserved rod-shaped polarized CMs, thus demonstrating the integrity of matrix synthesis at this stage. Similar feedback regulation of laminin synthesis has been already described after disruption of integrin–ECM interaction.⁴⁰ Because cellular basement membrane dictates cell morphology, the progressive defects in basement membrane production in ephrin-B1–deficient CMs most probably drives the progressive modification of their rod shape. The lack of basement membrane components could explain the CMs slippage and thus the tissue architecture disorganization observed following biomechanical stress. Finally, disruption of CM–ECM integrity at the lateral membrane leading to a general lack of cardiac tissue cohesion could account for the increase of the left ventricle diameter measured in KO mice.

One striking feature of *efnb1*^{−/−} mice is their high susceptibility to dazzling death following pressure overload despite higher hypertrophic response, thus suggesting some sort of inadaptation. Although we are not able to determine the exact defect, the observation that KO mice exhibit a delayed atrioventricular conduction together with the morphological modification of the intercalated disk in CMs with abnormal distribution of connexin 43 could indicate increased arrhythmogenic susceptibility in these mice following pressure overload stress. In line with this assumption, a recent study showed the importance of heterogeneous connexin 43 distribution in the development of ventricular arrhythmias.⁴¹ The observation that *efnb1*^{−/−} mice exhibit high heterogeneous responses to pressure overload is also quite intriguing. However, this could be easily explained by the fact that these mice exhibited only focal disorganization of the cardiac tissue at 2 months of age. This is further supported by the histological examination of cardiac tissue from banded KO mice that showed high variations in the degree of cardiac tissue disarray, even if all mice presented these modifications while they were absent in WT mice. Finally, we cannot exclude that disorganization of cardiac vessels detected in KO banded mice is also a contributing factor to death. Further studies using targeted ephrin-B1 deletion will be necessary to explore this hypothesis.

Of interest, our study provided evidence that lack of ephrin-B1 at the CM lateral membrane clearly influences the morphology of the adult CM and its elastic properties. It follows that ephrin-B1 most probably enforces a physical constraint to stabilize the lateral membrane and, in its absence, the CM is more susceptible to external/internal pressures that will directly impact on the CM morphology.

This is perfectly illustrated by morphological changes observed in KO and cKO mice exhibiting ventricle dilatation without any modification of heart weight/body weight ratio, nor reduction in CMs numbers or interstitial ECM. Similarly, this could explain peculiar adaptation of the KO mice during aortic banding with exacerbated increase of CMs area while fetal gene reprogramming and changes in heart weight/body weight are similar to those observed in WT mice.

In summary, we described a previously uncharacterized specific component of the CM lateral membrane, ephrin-B1, which acts as a stabilizer of the CM morphology and the overall cardiac tissue cohesion. Interestingly, ephrin-B1 interacts specifically with claudin-5, which was found to be downregulated in dystrophic mice models or in human end-stage cardiomyopathy.^{22,42} Given our results showing interactions between ephrin-B1 and claudin-5, one might expect similar dysregulation of ephrin-B1 in human cardiomyopathies. In line with this hypothesis, mouse model of DCM associated with claudin-5 downregulation demonstrated similar structural alterations of the lateral membrane as seen in the ephrin-B1 KO mice.²² Moreover, *efnb1* gene is subjected to large number of mutations in patients with craniofrontonasal syndrome with some patients exhibiting cardiomyopathy.¹⁶ However, because the role of ephrin-B1 at the adult stage is still new, no study correlating human *efnb1* mutations and the development of cardiomyopathies have been yet performed. To date, HF candidate genes concentrated on proteins involved in regulation/composition of CM contractile apparatus. Our KO model is characterized by an unusual disorganization of the overall cardiac contractile apparatus without classical features observed in models of contractile dysfunction (ie, loss of contractile components, calcium pathway contractile regulators). Lack of contractile dysfunction in young KO mice suggests the need for future studies in older animal to clarify whether ephrin-B1 is involved in the pathogenesis of cardiomyopathy.

We propose that ephrin-B1 and, more generally, structural components of the CM lateral membrane, could directly be involved in occurrence of HF, thus suggesting a novel pathway that needs to be explored beside the classical hypertrophic/fibrotic one.

Acknowledgments

We thank Dr T. Hébert, J.L. Samuel and B. Swynghedaw for critical reading of the manuscript; Dr R. D'Angelo, J.J. Maoret, and Childerick Severac for advice and technical assistance regarding imaging (Cellular Imaging Facility Rangueil-I2MC, TRI Platform), qPCR (Platform GeT génome et transcriptome du génopole Toulouse), and Atomic Force microscopy experiments (Bionanotechnologies platform, Institut des technologies Avancées en sciences du Vivant [ITAV] UMS 3039), respectively.

Sources of Funding

This work was supported by BQR grant from Toulouse III Paul Sabatier University (France). Michael D. Schneider is supported by the British Heart Foundation Simon Marks Chair in Regenerative Cardiology and BHF Centre of Research Excellence.

Disclosures

None.

References

1. Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2006;70:422–433.
2. Li J, Patel VV, Radice GL. Dysregulation of cell adhesion proteins and cardiac arrhythmogenesis. *Clin Med Res.* 2006;4:42–52.
3. Noorman M, van der Heyden MA, van Veen TA, Cox MG, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac cell–cell junctions in health and disease: electrical versus mechanical coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:23–31.
4. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 2004;94:1023–1031.
5. Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2291–H2301.
6. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:475–486.
7. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph–ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:145–151.
8. Pasquale EB. Eph–ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell.* 2008;133:38–52.
9. Merlos-Suarez A, Batlle E. Eph–ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:194–200.
10. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2–EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006;4:111–121.
11. Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, Meda P, Kucera T, Zarbalis K, Wurst W, Nagamatsu S, Lammert E. EphA–Ephrin-A–mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell.* 2007;129:359–370.
12. Ogawa K, Wada H, Okada N, Harada I, Nakajima T, Pasquale EB, Tsuyama S. EphB2 and ephrin-B1 expressed in the adult kidney regulate the cytoarchitecture of medullary tubule cells through Rho family GTPases. *J Cell Sci.* 2006;119:559–570.
13. Cooper MA, Son AI, Komlos D, Sun Y, Kleiman NJ, Zhou R. Loss of ephrin-A5 function disrupts lens fiber cell packing and leads to cataract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:16620–16625.
14. Stephen LJ, Fawkes AL, Verhoeve A, Lemke G, Brown A. A critical role for the EphA3 receptor tyrosine kinase in heart development. *Dev Biol.* 2007;302:66–79.
15. Ishii M, Mueller I, Nakajima T, Pasquale EB, Ogawa K. EphB signaling inhibits gap junctional intercellular communication and synchronized contraction in cultured cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2006;106:1057–1068.
16. Twigg SR, Matsumoto K, Kidd AM, Goriely A, Taylor IB, Fisher RB, Hoogeboom AJ, Mathijssen IM, Lourenco MT, Morton JE, Sweeney E, Wilson LC, Brunner HG, Mulliken JB, Wall SA, Wilkie AO. The origin of EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome: frequent somatic mosaicism and explanation of the paucity of carrier males. *Am J Hum Genet.* 2006;78:999–1010.
17. Davy A, Bush JO, Soriano P. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. *PLoS Biol.* 2006;4:e315.
18. Lee HS, Nishanian TG, Mood K, Bong YS, Daar IO. EphrinB1 controls cell–cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol.* 2008;10:979–986.
19. Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO. Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins. *Embo J.* 1999;18:2165–2173.
20. Huynh-Do U, Viindis C, Liu H, Cerretti DP, McGrew JT, Enriquez M, Chen J, Daniel TO. Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci.* 2002;115:3073–3081.
21. Davy A, Aubin J, Soriano P. EphrinB1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev.* 2004;18:572–583.
22. Sanford JL, Edwards JD, Mays TA, Gong B, Merriam AP, Rafael-Fortney JA. Claudin-5 localizes to the lateral membranes of cardiomyocytes and is altered in utrophin/dystrophin-deficient cardiomyopathic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:323–332.
23. Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkenin JD, Radice GL. Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 2005;97:474–481.
24. Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeold A, Fischer I, Paulin D, Schroder R, Wiche G. Myofiber integrity depends on desmin network

- targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol.* 2008;181:667–681.
25. Wang X, Osinska H, Dorn GW II, Nieman M, Lorenz JN, Gerdes AM, Witt S, Kimball T, Gulick J, Robbins J. Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation.* 2001;103:2402–2407.
 26. Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, Guilbeau-Frugier C, Escourrou G, Seif I, Roncalli J, Pizzinat N, Galinier M, Parini A, Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:587–595.
 27. Silver MDG. *Chapter 10: cardiomyopathies*, 2001.
 28. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, Petrof BJ. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *Faseb J.* 2001;15:1655–1657.
 29. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 2004;301:1–7.
 30. Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circ Res.* 2001;88:1112–1119.
 31. Arvanitis D, Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* 2008;22:416–429.
 32. Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr D. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology.* 2001;142:854–863.
 33. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem.* 2005;280:21092–21102.
 34. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:285–294.
 35. Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G, Salandi A, Daniel S, Cornelio F, Morandi L, Mora M. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet.* 2000;37:102–107.
 36. Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, Gerdes AM, Capetanaki Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:2063–2076.
 37. Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka F. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13873–13878.
 38. Shai SY, Harpf AE, Babbitt CJ, Jordan MC, Fishbein MC, Chen J, Omura M, Leil TA, Becker KD, Jiang M, Smith DJ, Cherry SR, Loftus JC, Ross RS. Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res.* 2002;90:458–464.
 39. Rasi K, Pihola J, Czabanka M, Sormunen R, Ilves M, Leskinen H, Rysa J, Kerkela R, Janney P, Heljasvaara R, Peuhkurinen K, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Vajkoczy P, Pihlajaniemi T, Eklund L. Collagen XV is necessary for modeling of the extracellular matrix and its deficiency predisposes to cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010;107:1241–1252.
 40. Aumailley M, Pesch M, Tunggal L, Gail F, Fassler R. Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 2):259–268.
 41. Boulaksil M, Winckels SK, Engelen MA, et al. Heterogeneous connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:913–921.
 42. Mays TA, Binkley PF, Lesinski A, Doshi AA, Quail MP, Margulies KB, Janssen PM, Rafael-Fortney JA. Claudin-5 levels are reduced in human end-stage cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45:81–87.

Novelty and Significance

What Is Known?

- The heart relies on strong tissue architectural cohesion and tight cellular interactions.
- Most cardiomyopathies are characterized by high cardiac tissue disorganization contributing to the progression toward heart failure.
- Ephrin-B1 is a key transmembrane molecule that governs cell–cell and cell–matrix interactions and it participates in tissue organization. However its role in cardiac tissue remains unknown.

What New Information Does This Article Contribute?

- Ephrin-B1 is a new and specific component of the lateral membrane of the cardiac myocyte where it constitutively interacts with claudin-5.
- Ephrin-B1 is essential for cardiac tissue architecture cohesion by stabilizing the rod-shape morphology of cardiac myocytes.
- Ephrin-B1 regulates structure, elastic properties, and composition of the lateral membrane of cardiac myocytes.
- Ephrin-B1 regulates adult cardiac myocyte morphology through a new cell–matrix interaction independent of the classical integrin/dystroglycan systems.
- Ephrin-B1 is not directly connected to the contractile machinery. The absence of ephrin-B1 confers hypersensitivity to mechanical stress because *efnb1* KO mice demonstrate early death following pressure overload and striking cardiac tissue disorganization mimicking those observed in end-stage heart failure human patients.
- Cardiac myocytes from mice failing hearts exhibit a significant decrease of ephrin-B1 and claudin-5 gene expression.

Cardiac tissue disorganization with disruption of cell–cell and cell–matrix interactions contributes to heart failure. In the search of new proteins that stabilize cardiac architecture, we identified ephrin-B1 as a new cardiac myocyte component specifically expressed at the lateral membrane. Young adult mice deficient for ephrin-B1 or with specific CM deletion exhibit focal tissue disorganization and loss of CM rod-shape morphology. Ephrin-B1 deficiency directly modifies cardiac myocyte lateral membrane structure, molecular composition (lack of claudin-5 interacting partner), and increases its stiffness. KO mice show loss of basement membrane components together with poorly organized fibrillar collagen matrix without modification in integrin/dystroglycan cell–matrix system. KO mice do not present contractile defects but decreased atrioventricular conduction and bradycardia. Moreover, they develop hypersensitivity to pressure overload with early death and striking cardiac tissue disorganization. Interestingly, following mechanical stress KO mice present abnormal increase in myocyte size, but fetal gene reprogramming, fibrosis development, and heart weight/body weight increase similar to wild-type mice. Finally, ephrin-B1 is specifically downregulated in failing cardiac myocytes. Our findings demonstrate ephrin-B1 as a potent cardiac tissue architecture stabilizer whose disruption could play an atypical role in transition toward heart failure. Overall, this work highlights the potential role of lateral membrane structure alteration in heart failure.

Carabin Protects Against Cardiac Hypertrophy by Blocking Calcineurin, Ras and CaMKII Signaling

Malik Bisselier, Magali Berthouze-Duquesnes, Magali Breckler, Florence Tortosa, Loubina Fazal, Annélie de Régibus, Anne-Coline Laurent, Audrey Varin, Alexandre Lucas, Maxime Branchereau, Pauline Marck, Jean-Nicolas Schickel, Claudine Deloménie, Olivier Cazorla, Pauline Soulas-Sprauel, Bertrand Crozatier, Eric Morel, Christophe Heymes and Frank Lezoualc'h

Circulation. published online November 4, 2014;

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2014 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/early/2014/11/04/CIRCULATIONAHA.114.010686>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2014/11/04/CIRCULATIONAHA.114.010686.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:

<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Carabin Protects Against Cardiac Hypertrophy by Blocking Calcineurin, Ras and CaMKII Signaling

Running title: *Bisserier et al.; Carabin, an inhibitor of cardiac hypertrophy*

Malik Bisserier, MSc^{1,2*}, Magali Berthouze-Duquesnes, PhD^{1,2*}; Magali Breckler, PhD^{1,2*};
Florence Tortosa, MSc^{1,2}; Loubina Fazal, PhD^{1,2}; Annélie de Régibus, MSc^{1,2};
Anne-Coline Laurent, PharmD, PhD^{1,2}; Audrey Varin, MSc^{3,4}; Alexandre Lucas, MSc^{1,2};
Maxime Branchereau, MSc¹; Pauline Marck, MSc¹; Jean-Nicolas Schickel, PhD⁵;
Claudine Deloménie, PhD^{3,4}; Olivier Cazorla, PhD⁶; Pauline Soulas-Sprauel, PhD⁵;
Bertrand Crozatier, MD, PhD^{3,4}; Eric Morel, PhD^{3,4}; Christophe Heymes, PhD^{1,2};
Frank Lezoualc'h, PhD^{1,2}

¹Inserm, UMR-1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France;
²Univ. Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France; ³Université Paris Sud, IFR141 IPSIT, Châtenay-Malabry, France; ⁴Inserm, UMR-S769, Châtenay-Malabry, France; ⁵CNRS UPR 3572, IBMC, Strasbourg, Faculty of Pharmacy, France, Strasbourg, France; ⁶Inserm, U1046, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, CHRU Montpellier, Montpellier, France
* contributed equally

Address for Correspondence:

Frank Lezoualc'h, PhD

Inserm, UMR-1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

1 avenue Jean Poulhès

31432 Toulouse Cedex 4, France.

Tel: +33-5-31-62-56-46

Fax: +33-5-31-62-56-22

E-mail: Frank.Lezoualc'h@inserm.fr

Journal Subject Codes: Atherosclerosis:[138] Cell signaling/signal transduction, Atherosclerosis:[148] Heart failure - basic studies, Hypertension:[15] Hypertrophy

Abstract

Background—Cardiac hypertrophy is an early hallmark during the clinical course of heart failure (HF) and is regulated by various signaling pathways. However, the molecular mechanisms that negatively regulate these signal transduction pathways remain poorly understood.

Methods and Results—Here, we characterized Carabin, a protein expressed in cardiomyocytes that was downregulated in cardiac hypertrophy and human HF. Four weeks after transverse aortic constriction (TAC), Carabin deficient (Carabin^{-/-}) mice developed exaggerated cardiac hypertrophy and displayed a strong decrease in fractional shortening (FS) ($14.6 \pm 1.6\%$ versus $27.6 \pm 1.4\%$ in wild type + TAC mice, $P < 0.0001$). Conversely, compensation of Carabin loss through a cardiotropic adeno-associated viral vector encoding Carabin prevented TAC-induced cardiac hypertrophy with preserved FS ($39.9 \pm 1.2\%$ versus $25.9 \pm 2.6\%$ in control + TAC mice, $P < 0.0001$). Carabin also conferred protection against adrenergic receptor-induced hypertrophy in isolated cardiomyocytes. Mechanistically, Carabin carries out a tripartite suppressive function. Indeed, Carabin through its calcineurin (CaN) interacting site and Ras/Rab GTPase activating protein (GAP) domain functions as an endogenous inhibitor of CaN and Ras/extracellular signal-regulated kinase prohypertrophic signaling. Moreover, Carabin reduced Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activation and prevented nuclear export of histone deacetylase 4 following adrenergic stimulation or myocardial pressure overload. Finally, we showed that Carabin Ras-GAP domain and CaN interacting domain were both involved in the anti-hypertrophic action of Carabin.

Conclusions—Our study identifies Carabin as a negative regulator of key prohypertrophic signaling molecules, CaN, Ras, and CaMKII and implicates Carabin in the development of cardiac hypertrophy and failure.

Key words: hypertrophy/remodeling, signal transduction, calcineurin, pressure overload

Introduction

Cardiac hypertrophy is the compensatory response of the heart to stress and is characterized by non-mitotic growth, addition of new sarcomeres and fetal gene expression¹. However, prolonged hypertrophy of the myocardium can progress to heart failure (HF), a leading cause of morbidity and mortality, often associated with sudden cardiac death²⁻⁴. Thus, understanding the signaling mechanisms that regulate pathological cardiac hypertrophy may lead to a better treatment for patients with HF.

The hypertrophic growth of the myocardium is typically initiated by signal transduction pathways in response to either increased mechanical load on the heart or through the action of neurohumoral mediators⁵. Numerous signaling pathways coordinate the cardiac hypertrophic response. Among them, the Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin (CaN) is considered as a central prohypertrophic signaling effector in the myocardium^{6,7}. Activated CaN directly binds to and dephosphorylates the Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) in the cytoplasm, permitting its translocation to the nucleus where it participates in hypertrophic gene expression⁸. However, no single pathway seems to regulate cardiac hypertrophy alone. Rather, it appears more likely that each pathway operates as a component of an orchestrated hypertrophic network. For instance, the small G protein Ras, stress-responsive MAP kinases and the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) can cross-talk with the CaN signaling pathway to regulate hypertrophic processes⁹⁻¹¹. CaMKII is known to activate the myocyte enhancer factor 2 (MEF2) upon Class II histone deacetylases (HDAC) phosphorylation, thereby allowing this transcription factor to induce hypertrophic gene expression^{12,13}.

In contrast to these growth-promoting pathways, several endogenous molecules in the heart have been shown to negatively regulate cardiac hypertrophy¹⁴⁻¹⁸. Increasing these negative

signaling pathways may be of significant therapeutic value. In this context, Carabin (alias TBC/RabGAP), a protein mainly expressed in the immune system and the heart raised our interest¹⁹. Carabin has 446 amino acid residues and contains two important regions, a putative Ras GAP domain (GTPase Activating Protein) at its amino terminus and a carboxy-terminal domain that bears a CaN interacting domain^{19,20}. Here, we provide the first evidence for an anti-hypertrophic role of Carabin in the heart. Using knock-out mice for Carabin (*Carabin*^{-/-}), we showed a severely impaired cardiac function in response to pressure overload induced cardiac hypertrophy compared to control wild type animals (WT). Carabin was decreased in cardiac hypertrophy and failure. Compensation of its loss of expression using adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) mediated gene transfer *in vivo* protected the heart against hypertrophy and dysfunction. At the molecular level, Carabin repressed the pro-hypertrophic signaling of CaN, Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and CaMKII following cardiac pressure overload or adrenergic stimulation. Thereby, this work sets Carabin as a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy through the inhibition of various components of the intracellular signal-transduction network that coordinates hypertrophic responses.

Methods

The detailed and expanded methodology is provided in the online-only Data Supplement.

Animals

Mice carrying a global heterozygous knock-out of Carabin were generated by targeted gene deletion as previously described by Schickel et al. and were kindly provided by Dr. Soulas-Sprauel²¹. 8-week-old male *Carabin*^{-/-} mice and littermate controls (WT) used in this study were obtained by breeding *Carabin*^{+/-} males and *Carabin*^{+/-} females, both from a C57BL/6 genetic

background. Mice were genotyped by PCR using the following 2 sets of primers as previously described²¹: 5'-GCAGCACAGCAGCTACAGGTCCC-3'/5'-CCCTCTGCAGACCTCATCCGCC-3' ; and 5'-GCGCCACCATTGCCAGCTCTA-3'/5'-GCAGACCTCATCCGCCAGCGA G-3'. All mice used in this study were pathogen free and housed at constant (22°C) temperature, on 12-hour light/12-hour dark cycles, with ad libitum access to food and water.

AAV9 production and administration

AAV9-Carabin and AAV9-green fluorescent protein (GFP) were constructed and generated by Penn Vector Core (School of Medicine Gene Therapy Program at the University of Pennsylvania). 100 µL of physiological serum solution containing $3 \cdot 10^{11}$ genome copies/mL of the AAV9 were injected in the retro-orbital sinus of 4-week-old male C57BL/6 genetic background mice (Janvier, France).

Adenoviral infection

Bicistronic adenoviruses bearing human Carabin under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter and GFP under internal ribosomal entry site (IRES) were constructed and amplified by Genecust company (Evry, France). One day after plating, cardiomyocytes were incubated for 2 h with recombinant adenoviruses. After removal of the virus suspension, cells were replaced in maintenance medium for 2 days and then stimulated with the different drugs. Viruses were used at a multiplicity of infection (MOI) of 10.

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Differences between groups have been analyzed by unpaired Student t test, 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test or Tukey post-test. Differences were considered significant at *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001.

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 6.01).

Study approval

All animal experiments were performed under European laws on the protection of animals of the University of Toulouse outlined in Council Directive 86/609/EEC. Mouse and Rat experiments were approved and performed according to the guidelines of the Ethics and Animal Safety Committee of INSERM Toulouse/ENVT (agreement number: C3155507).

Results

Carabin deficiency potentiates the progression of heart failure under hemodynamic stress

To study the role of Carabin in the development of cardiac hypertrophy and HF, we first analyzed cardiac Carabin expression in mouse and rat subjected to pressure overload induced by thoracic aortic constriction (TAC), and in failing human heart samples. In both rodent and human hearts, Carabin mRNA and protein amounts were markedly reduced compared to control hearts suggesting that Carabin deficiency is associated with the development of cardiac hypertrophy and failure (**Figure 1A**).

Next, to test whether Carabin contributes to heart disease, we analysed the hearts of Carabin^{-/-} mice. This mouse line developed and reproduced normally as previously described²¹. We found that Carabin was expressed in cardiac myocytes and not in cardiac fibroblasts isolated from the heart of wild type animals (WT) (**Supplemental Figure 1A**). Western-Blot analysis failed to detect any cardiac expression of Carabin in Carabin^{-/-} mice (**Supplemental Figure 1B**). Cardiac function (**Table 1**) and the ratios of heart weight (HW) or left ventricular weight (LVW) to tibia length (TL) (**Figure 1B**), were not different between WT and Carabin deficient mice. In addition, hearts from Carabin-deficient mice were macroscopically indistinguishable from WT

animals (**Figure 1C**). However, 4 weeks after TAC, Carabin^{-/-} mice showed a decline in cardiac contractility as indicated by the reduced fractional shortening (FS) (**Table 1**). Left ventricular end-diastolic internal diameter (LVIDd) and left ventricular end-systolic internal diameter (LVIDs) were largely increased in Carabin^{-/-} mice after TAC (**Table 1**), indicating LV dilatation. Notably, Carabin-deficiency aggravated TAC induced hypertrophic response compared with WT mice as shown by increased HW/TL and LVW/TL ratios, and hematoxylin and eosin-stained heart sections (**Figure 1, B and C**). These changes were accompanied by an increased cardiomyocyte cross-sectional area and induction of interstitial fibrosis (**Figure 1C**). In addition, the development of pulmonary congestion (ratio of lung weight to tibia length) as an indirect indicator of HF was also significantly increased in Carabin^{-/-} mice (**Supplemental Figure 2**). Consistently, the expression of cardiac fetal genes (atrial natriuretic factor (ANF), brain natriuretic peptide (BNP), β myosin heavy chain (β -MHC)) and fibrotic markers (pro-collagen, type I, alpha 1 (Col1) and collagen type III (Col3)) was significantly augmented in Carabin-deficient mice after TAC (**Figure 1D**). Thus, Carabin deficiency does not cause baseline cardiac abnormalities but remarkably renders the heart more susceptible to stress induced pathological cardiac remodeling.

Cardiotropic expression of Carabin prevents cardiac myocyte hypertrophy and preserves cardiac function after pressure overload

We first examined the effect of Carabin overexpression in isolated cardiac myocytes. We infected or transfected neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) with either a control vector or a vector encoding Carabin (**Figure 2, A and B**). Carabin overexpressing cells had a dampened hypertrophic response to phenylephrine (PE) (10 μ mol/L) treatment based on analysis of cell surface area, sarcomeric organization or the expression of the ANF, which are hallmarks of

cardiomyocyte hypertrophy (**Figure 2, A and B**). Conversely, knock-down of Carabin with specific siRNA (Si-Carabin) further amplified the effect of PE on the expression of ANF and cardiomyocyte surface area (**Supplemental Figure 3**). These results indicate an anti-hypertrophic effect of Carabin in cardiomyocytes.

Because Carabin was decreased in cardiac remodeling and HF, we tested whether its cardiac overexpression would prevent hypertrophy. For that, we chose a gene transfer approach using adeno-associated virus of serotype 9 which shows strong tropism for cardiac myocytes²². An AAV9 encoding Carabin or its control (GFP) was injected into retro-orbital sinus of mice and 5 weeks later, TAC was performed (**Supplemental Figure 4**). Mice treated with AAV9-Carabin and subjected to TAC showed a similar level of cardiac Carabin observed in basal condition (**Figure 2C**). Remarkably, restoration of Carabin expression with AAV9-Carabin, significantly prevented cardiac hypertrophy as judged by the ratio of HW/TL and LVW/TL (**Figure 2D**). Importantly, histological analysis showed a reduction in cardiomyocyte size as well as fibrosis in the TAC group treated with AAV9-Carabin (**Figure 2E**). In addition, up-regulation of the hypertrophic gene markers as well as fibrotic markers was also compromised in AAV9-Carabin (**Figure 2F**). This effect of Carabin was associated with a preserved cardiac function as demonstrated by the echocardiographic data on LVIDs, LVIDd and FS (**Table 2**). None of these effects occurred in the AAV9-GFP control group. These data strongly suggest that Carabin overexpression protects from the development of pathologic cardiac hypertrophy.

Carabin suppresses the CaN/NFAT signaling pathway in a Ras-GAP independent fashion

Next, we sought to determine the signaling mechanisms by which Carabin represses hypertrophy. Since Carabin contains a CaN interacting domain¹⁹, we analysed its ability to regulate CaN activity in NRVMs (**Figure 3A**). Cyclosporine A (CsA), a well-known inhibitor of

CaN, was used as a positive control. PE- induced CaN activation was significantly decreased in NRVMs infected with an adenovirus encoding Carabin (Ad.Carabin) compared to control cells (Ad.GFP) (**Figure 3A**), indicating that the phosphatase is a target of Carabin. Conversely, Si-Carabin potentiated PE- induced CaN activation and NFAT nuclear translocation (**Supplemental Figure 5, A and B**). In line with this result, PE as well as the calcium ionophore, ionomycin failed to induce NFAT nuclear translocation in NRVMs transfected with Carabin (**Figure 3B, Supplemental Figure 6**). Accordingly, the expression of the 1.4 isoform of the calcineurin-interacting protein (MCIP 1.4), a downstream effector for CaN-dependent activity^{23,24} that can serve as a highly sensitive readout for CaN activity *in vivo*^{14,25}, was prevented in left ventricular lysates of AAV9-Carabin treated mice after TAC compared to control animals. In contrast, cardiac MCIP 1.4 expression was potentiated in Carabin^{-/-} mice subjected to pressure overload (**Figure 3C**).

The interaction of Carabin with CaN/NFAT signaling was further confirmed by cotransfecting Si-Carabin and NFAT response elements coupled to the luciferase gene (NFAT-Luc) in NRVMs (**Figure 3D**). As expected, we observed a significant increase in PE-induced NFAT-Luc transcriptional activity in Si-Carabin transfected cells compared to control siRNA (Si-CT) stimulated with PE. A similar inhibitory effect of Si-Carabin on NFAT-Luc activity was observed under stimulation of a non-selective β -adrenergic receptor (β -AR) agonist, isoprenaline indicating that Carabin inhibited NFAT activation not only in response to α -AR but also to β -AR activation (**Supplemental Figure 7**). The presence of the C-terminal CaN interacting domain in Carabin¹⁹ raised the possibility that this domain might be involved in the regulation of CaN/NFAT signaling. Transient transfection experiments showed that indeed the inhibitory effect of Carabin on NFAT activity was dependent on its CaN binding domain but independent

on Ras-GAP domain since mutations in the CaN binding domain of Carabin (Carabin^{AAVGA} mutant) or inactivation of Carabin RasGAP domain (Carabin^{R141A} mutant) (**Figure 3E**), abolished or mimicked Carabin effect, respectively (**Figure 3F**). Altogether these data show that Carabin specifically inhibits CaN/NFAT signaling pathway through its CaN interacting domain and independently of its Ras-GAP activity.

Carabin blocks Ras and ERK activation via its Ras-GAP domain

The fact that Carabin presents a Ras-GAP domain^{19,20} led us to investigate a potential interaction Ras/Carabin. Co-immunoprecipitation experiments followed by immunoblot showed that Carabin interacted with Ras in NRVMs (**Figure 4A**). Knockdown of Carabin confirmed the specificity of this association (**Figure 4A**). The interaction Ras–Carabin was constitutive and was not influenced by adrenergic stimulation (**Figure 4A**). Consistent with its anti-hypertrophic action, Carabin decreased the amount of the active form of Ras, Ras-GTP produced under PE treatment whereas Carabin^{R141A} failed to inhibit Ras activation (**Figure 4B**). To further substantiate the inhibitory action of Carabin on Ras signaling, we analysed its effect on the activation of a downstream target of Ras, the mitogen activated protein kinase ERK^{26,27}. Si-Carabin enhanced by ~70% PE-induced ERK activation (**Supplemental Figure 8**), whereas transfected Carabin decreased p-ERK in cardiac myocytes stimulated with PE compared to control cells (**Figure 4C**). Similarly, loss or gain of function of Carabin potentiated or prevented TAC-induced ERK activation in left ventricular homogenates, respectively (**Figure 4, D and E**). Of particular interest, PE-induced ERK was still observed in the presence of Carabin^{R141A} confirming the involvement of Carabin Ras-GAP domain on the inhibition of Ras/ERK pathway (**Figure 4F**). These data demonstrate that Carabin via its interaction with Ras and its Ras/GAP domain inhibits Ras and ERK hypertrophic signaling.

Carabin regulates HDAC4 nucleo-cytoplasmic shuttling

We previously showed that the small GTPase Ras regulates cardiac myocyte hypertrophy in coordination with CaMKII^{9,28}. Hence, to further analyze Carabin anti-hypertrophic signaling, we investigated its effect on CaMKII. Carabin prevented PE- or TAC-induced CaMKII auto-phosphorylation state (indicative of CaMKII activation) whereas CaMKII was more activated in hearts samples of Carabin^{-/-} mice subjected to TAC compared with WT animals (**Figures 5, A-C**). In contrast to Carabin and Carabin^{AAVGA}, Carabin^{R141A} failed to inhibit CaMKII activation, indicating that Carabin effect on CaMKII was Ras-dependent (**Figure 5A**).

Once phosphorylated by CaMKII, HDAC proteins are translocated out of the nucleus thereby allowing MEF2 to activate its target genes¹³. Therefore, to ensure the relationship between Carabin and CaMKII hypertrophic signaling, we tested whether Carabin could influence HDAC4 nucleo-cytoplasmic shuttling and subsequent MEF2 transcriptional activation (**Figure 5, D-G**). Firstly, we examined HDAC4 nuclear export after TAC in Carabin^{-/-} and AAV9-Carabin treated mice. While the myocardium of Carabin^{-/-} mice showed an increase in the cytosolic/nuclear ratio of HDAC4 protein expression after TAC compared with WT mice (**Figure 5D**), cardiac overexpression of Carabin prevented the nucleo-cytoplasmic shuttling of HDAC4 (**Figure 5E**). Secondly, we determined the expression level of cytoplasmic HDAC4 and MEF2 transcriptional activity in NRVMs transfected with Carabin and treated with PE. The results show that Carabin inhibited PE-induced HDAC4 nuclear export and MEF2 activation (**Figures 5, F and G**). Inversely, Si-Carabin potentiated the up regulation of MEF2 transcriptional activity induced by PE (**Supplemental Figure 9**).

Next, to find out which domain of Carabin is important for its effect on HDAC4 and MEF2, we performed transient transfection in NRVMs using Carabin^{R141A} and Carabin^{AAVGA}

mutants. KN93 a pharmacological inhibitor of CaMKII was used as positive control. Both mutants failed to block HDAC4 translocation suggesting that Carabin CaN interacting and Ras-GAP domains are involved in HDAC4 nucleocytoplasmic shuttling (**Figure 5F**). In agreement with its effect on HDAC4, Carabin^{R141A} did not prevent MEF2 activation in cells stimulated with PE (**Figure 5G**). We obtained an intermediate effect with Carabin^{AAVGA} suggesting that the CaN domain of Carabin is partially involved in the regulation of MEF2 transcriptional activity (**Figure 5G**). Taken together, these data show that in response to adrenergic stimulation Carabin, mainly through its Ras-GAP domain prevents the activation of the prohypertrophic transcription factor MEF2 via the inhibition of CaMKII and HDAC nuclear export.

Carabin Ras-GAP domain and CaN interacting domain are both involved in the anti-hypertrophic action of Carabin

Since Carabin regulates both CaN and Ras/CaMKII pathways, we assessed their relative contributions to Carabin's regulation of cardiac myocyte hypertrophy. Carabin^{R141A} and Carabin^{AAVGA} mutants were significantly less potent than the wild type form of Carabin to inhibit cell surface area, sarcomeric organization or the ANF promoter transcriptional activity (**Supplemental Figures 10 and 11**). The two Carabin mutants had a similar effect on cardiomyocyte hypertrophy markers. Transfection of Carabin^{R141A} or Carabin^{AAVGA} in the presence of either a pharmacological inhibitor of CaMKII, KN93 or CaN, CsA mimicked the effect of Carabin on PE-induced myocyte hypertrophy (**Supplemental Figures 10 and 11**). These data demonstrate that Carabin Ras-GAP domain and CaN interacting domain are both involved in the anti-hypertrophic action of Carabin.

Discussion

This study is the first to show that Carabin is a negative regulator of cardiac hypertrophy under

pathological conditions. This is supported by both gain-of- and loss-of-function studies. Because Carabin was downregulated in cardiac remodeling and failure, we sought to compensate for its loss through *in vivo* gene transfer approach using AAV9-Carabin. Restoration of Carabin expression prevented the hypertrophic response to TAC and improved cardiac function as evidenced by gravimetric, echocardiographic, fetal program and cell size analysis. Consistent with the *in vivo* data, transfected Carabin inhibited PE-induced hypertrophy in NRVMs. Conversely, Si-Carabin potentiated cardiac hypertrophic markers. Importantly, Carabin-deficient mice developed a severe cardiac dysfunction in response to pressure overload, associated with altered contractile function, increased LV dilation and cardiac fibrosis. Furthermore, we observed severe HF with lung oedema developed in Carabin-deficient mice after TAC. Altogether, these data suggest that Carabin plays a key role in the regulation of the transition from hypertrophy to HF in response to pathological stress.

Several endogenous repressors of cardiac hypertrophy have been previously identified¹⁸. Among them, Cabin 1²⁹, Calsarcin-1¹⁴ and PICOT (Protein kinase C-interacting coupling of thioredoxin)¹⁶ have been shown to prevent pathological cardiac hypertrophy mainly through modulation of CaN activity. Although Carabin is another negative regulator of cardiac hypertrophy, this protein takes a special place among the others since 1) Carabin represents a promising target to prevent maladaptive cardiac hypertrophy. In contrast to other hypertrophic signaling molecules, Carabin does not seem to be required for normal development. Rather, Carabin gain functional importance during the cardiac stress response resulting from hypertrophic signaling and mechanical overload. This is supported by the absence of myocardial atrophy in Carabin overexpressing mice and also by data from Carabin-deficient mice, which show no overt cardiac phenotype under basal conditions; 2) mechanistically, Carabin carries out

a remarkable tripartite suppressive function. Indeed, Carabin exhibits inhibitory activity not only on CaN/NFAT (by its carboxy-terminal domain of interaction with calcineurin) and Ras/ERK (by its amino-terminus Ras-GAP domain) pathways but also on CaMKII and HDAC4 nuclear export.

Importantly, we noticed that Carabin is expressed both in the cytoplasm and nucleus of cardiac myocytes and induces the inhibition of these prohypertrophic signaling proteins whatever the stimuli. Indeed, Carabin prevents NFAT transcriptional activity under α 1-AR or β -AR stimulation. Expression of the gene encoding MCIP1.4, which is under tight control by calcineurin activity³⁰, was further augmented or decreased in hearts of Carabin^{-/-} or AAV9-Carabin injected mice upon pressure overload, respectively. Likewise, the effect of Carabin on CaMKII activity was observed *in vivo* in the TAC model and in NRVMs treated with either PE or 8-pCPT (**Supplemental Figure 12A**), an Epac (exchange protein directly activated by cAMP) selective agonist which is a potent activator of cAMP-dependent cardiomyocyte hypertrophy^{26,31}. Phosphorylation of the sarcoplasmic ryanodine receptor which is another effector of CaMKII, was inhibited by Carabin following activation of the prohypertrophic factor Epac (**Supplemental Figure 12B**). Altogether, these data suggest that Carabin does not belong to a protein complex specifically associated with a subcellular compartment and/or a signaling pathway but most probably, exerts its functions in concert with various proteins localized in distinct intra-cellular compartments.

Since Carabin expression was decreased in human failing heart and in TAC-induced hypertrophy in rodents, we speculate that this downregulation of Carabin may play an active role in promoting cardiac hypertrophy under stress condition. In support of this hypothesis, Carabin overexpression attenuated hypertrophic signaling and protected the heart against hypertrophic

remodeling. Cardiac gene therapy has emerged as a promising approach for treating HF, supported by a growing number of positive preclinical studies³² and a recent successful result in Phase 2 study (CUPID trial) targeting the cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump³³. Our findings that restoration of Carabin expression with AAV9-Carabin improves cardiac function in mice with HF suggest that Carabin gene transfer may provide a novel therapeutic strategy for the treatment of HF. As a next step, it will be important to test the beneficial impact of Carabin gene transfer in a preclinical study using a large animal model of HF.

Although our data obtained both *in vitro* and *in vivo* support for a cardioprotective role of Carabin, we found a 50% increase in the expression of Carabin in response to one day of treatment with PE *in vitro* (**Supplemental Figure 3B**). Accordingly, the proximal promoter region of Carabin revealed the presence of multiple consensus NFAT-binding sites,¹⁹ suggesting that the expression of Carabin might be regulated by the CaN signaling pathway. Therefore, one can imagine a scenario in which the upregulation of Carabin at the early phase of hypertrophy development may counteract the progression of pathological cardiac growth and, when the stress persists as observed 4 weeks after TAC, Carabin may be degraded thereby contributing to disease progression. However, to validate this hypothesis further experiments are required to show the upregulation of Carabin at the early phase of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. Interestingly, bioinformatic analysis of Carabin sequence showed many potential phosphorylation sites, mainly for PKA and PKC (analysis with NetPhosK, ExPASy software) which are implicated in cardiac hypertrophy signaling⁵, suggesting that Carabin may be tightly regulated by phosphorylation and dephosphorylation which can then influence its proteolytic degradation.

CaN, CaMKII and Ras signaling pathways may converge to the same downstream effectors such as the transcriptional factors NFAT and MEF2 to regulate cardiac growth. For instance, studies in transgenic mice showed that inhibition of MEF2 abrogated the effects of CaN on cardiac dilation and dysfunction suggesting that this transcription factor was a target of CaN³⁴. Yet, Li and collaborators³⁵ reported that CaN regulates MEF2 transcriptional activity in C2C12 myoblasts. In contrast, CaMKII is also known to negatively regulate CaN-NFAT signaling by phosphorylation¹¹. These different signaling pathways are therefore tightly linked and our finding on Carabin adds complexity to this crosstalk.

As expected, mutations in the CaN binding domain of Carabin (Carabin^{AAVGA}) prevent NFAT activation. This data combined with the observation that NFAT transcriptional activity was unaffected by the Carabin^{R141A} mutant, indicates that Carabin inhibits CaN/NFAT signaling pathways only via its CaN binding domain and in a Ras-independent fashion. On the contrary, Carabin inhibitory effect on CaMKII involves its Ras-GAP function since Carabin^{R141A} fails to prevent HDAC4 nuclear translocation and subsequent MEF2 transcriptional activation. This finding is in agreement with a previous report showing that increased MEF2 activity in response to hypertrophic stimuli was dependent on Ras¹⁰. Additionally, the CaN binding domain of Carabin is also involved in Carabin inhibitory effect on CaMKII pathway since the mutant Carabin^{AAVGA} behaves as the vector control on HDAC4 nucleocytoplasmic shuttling. The fact that Carabin^{AAVGA} had a slight tendency to inhibit MEF2 activation could be explained by a differential interaction between CaN/HDAC4 and CaN/MEF2. This hypothesis is strengthened by the study of Grégoire and collaborators³⁶ who showed that CaN interacted with HDAC4 more strongly than MEF2.

Finally, we found that Carabin anti-hypertrophic action was dependent of its Ras-GAP

domain and CaN interacting domain. This makes sense since 1) the Ras-GAP domain of Carabin prevents the activation of Ras/CaMKII and the CaN interacting domain of Carabin specifically inhibits CaN/NFAT signaling; 2) Ras/CaMKII and CaN signaling are both involved in cardiac hypertrophy⁵. Our finding that the CaN binding domain of Carabin is implicated in Carabin inhibitory effect on HDAC translocation and MEF2 activation may justify why Carabin^{AAVGA} is less potent than KN93 to inhibit PE-induced cardiomyocyte hypertrophy. This cooperation between Carabin Ras-GAP domain and CaN interacting domain to exert their inhibitory action on hypertrophy may explain why Carabin^{R141A} is less effective than CsA to prevent cardiomyocyte hypertrophy.

In conclusion, our study has revealed Carabin as a novel and negative regulatory point for modulating CaN-NFAT, Ras/ERK and CaMKII signaling. Hypertrophic remodeling of the heart under chronic stress appears to result, at least in part, from downregulation of Carabin and thus from insufficient control by this protein. Our finding that Carabin has a protective function in the heart in response to hemodynamic stress suggests that Carabin may be a potential diagnostic and therapeutic target for heart disease.

Acknowledgments: We thank Jane-Lise Samuel for providing human myocardial samples. We are grateful to Corinne Evra and Cédric Baudelin and their staff for animal housing (*UMS US006/INSERM/UPS*). We thank Jeanne Mialet-Perez for the critical reading of the manuscript.

Funding Sources: Frank Lezoualc'h was supported by grants from Association Française contre les Myopathies, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM: DPC2011122995) and Région Midi-Pyrénées. Magali Breckler, Malik Bissierier, Magali Berthouze-Duquesnes, and Anne-Coline Laurent were recipients of grants from Région Ile-de-France (CODIM), Région Midi-Pyrénées, Fondation Lefoulon Delalande, and Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (G.R.R.C)/Fédération Française de Cardiologie (F. F. C), respectively.

Conflict of Interest Disclosures: None.

References:

1. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med*. 2008;358:1370-1380.
2. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:30-41.
3. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL, Murabito JM, Vasani RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:1397-1402.
4. De Simone G, Gottdiener JS, Chinali M, Maurer MS. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J*. 2008;29:741-747.
5. Van Berlo JH, Maillet M, Molkenin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*. 2013;123:37-45.
6. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215-228.
7. Molkenin JD. Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells. *Circ Res*. 2013;113:16-9.
8. Heineke J, Ritter O. Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:62-73.
9. Lezoualc'h F, Métrich M, Hmitou I, Duquesnes N, Morel E. Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44:623-632.
10. Métrich M, Laurent A-C, Breckler M, Duquesnes N, Hmitou I, Courillau D, Blondeau J-P, Crozatier B, Lezoualc'h F, Morel E. Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell Signal*. 2010;22:1459-1468.
11. MacDonnell SM, Weisser-Thomas J, Kubo H, Hanscome M, Liu Q, Jaleel N, Berretta R, Chen X, Brown JH, Sabri A-K, Molkenin JD, Houser SR. CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;105:316-325.
12. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:468-473.
13. Backs J, Olson EN. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res*.

2006;98:15-24.

14. Frey N, Barrientos T, Shelton JM, Frank D, Rütten H, Gehring D, Kuhn C, Lutz M, Rothermel B, Bassel-Duby R, Richardson JA, Katus HA, Hill JA, Olson EN. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med.* 2004;10:1336-1343.
15. Frost RJA, Engelhardt S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation.* 2007;116:1768-1775.
16. Jeong D, Kim JM, Cha H, Oh JG, Park J, Yun S-H, Ju E-S, Jeon E-S, Hajjar RJ, Park WJ. PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ Res.* 2008;102:711-719.
17. Maillet M, Lynch JM, Sanna B, York AJ, Zheng Y, Molkentin JD. Cdc42 is an antihypertrophic molecular switch in the mouse heart. *J Clin Invest.* 2009;119:3079-3088.
18. Leenders JJ, Pinto YM, Creemers EE. Tapping the brake on cardiac growth-endogenous repressors of hypertrophic signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:156-167.
19. Pan F, Sun L, Kardian DB, Whartenby K a, Pardoll DM, Liu JO. Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature.* 2007;445:433-436.
20. Nagai H, Yasuda S, Ohba Y, Fukuda M, Nakamura T. All members of the EPI64 subfamily of TBC/RabGAPs also have GAP activities towards Ras. *J Biochem.* 2013;153:283-288.
21. Schickel J-N, Pasquali J-L, Soley A, Knapp A-M, Decossas M, Kern A, Fauny J-D, Marcellin L, Korganow A-S, Martin T, Soulas-Sprauel P. Carabin deficiency in B cells increases BCR-TLR9 costimulation-induced autoimmunity. *EMBO Mol Med.* 2012;4:1261-1275.
22. Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, Mougnot N, Reiken S, Haghghi K, Kranias EG, Marks AR, Lacampagne A, Engelhardt S, Hatem SN, Lompre A-M, Hulot J-S. Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J.* 2012;26:1009-1017.
23. Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:669-674.
24. Sanna B, Brandt EB, Kaiser RA, Pfluger P, Witt SA, Kimball TR, van Rooij E, De Windt LJ, Rothenberg ME, Tschop MH, Benoit SC, Molkentin JD. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7327-7332.
25. Van Rooij E, Doevendans PA, Crijns HJGM, Heeneman S, Lips DJ, van Bilsen M, Williams RS, Olson EN, Bassel-Duby R, Rothermel BA, De Windt LJ. MCIP1 overexpression suppresses

- left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;94:e18-26.
26. Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F. Epac Mediates β -Adrenergic Receptor-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res*. 2008;102:959-965.
27. Zheng M, Hou R, Han Q, Xiao R-P. Different regulation of ERK1/2 activation by beta-adrenergic receptor subtypes in adult mouse cardiomyocytes. *Heart Lung Circ*. 2004;13:179-183.
28. Métrich M, Laurent A-C, Breckler M, Duquesnes N, Hmitou I, Courillau D, Blondeau J-P, Crozatier B, Lezoualc'h F, Morel E. Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell Signal*. 2010;22:1459-1468.
29. De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molkentin JD. Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3322-3327.
30. Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*. 2000;87:E61-68.
31. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré A-M, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*. 2005;97:1296-1304.
32. Hajjar RJ. Potential of gene therapy as a treatment for heart failure. *J Clin Invest*. 2013;123:53-61.
33. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2011;124:304-313.
34. Van Oort RJ, van Rooij E, Bourajjaj M, Schimmel J, Jansen MA, van der Nagel R, Doevendans PA, Schneider MD, van Echteld CJA, De Windt LJ. MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure. *Circulation*. 2006;114:298-308.
35. Li J, Vargas MAX, Kapiloff MS, Dodge-Kafka KL. Regulation of MEF2 transcriptional activity by calcineurin/mAKAP complexes. *Exp Cell Res*. 2013;319:447-454.
36. Grégoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, Mao Z, Wu Z, Giguère V, Yang X-J. Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem*. 2006;281:4423-4433.

Table 1. Echocardiographic analysis of WT and Carabin^{-/-} mice after sham and TAC operations.

Groups	WT-Sham n= 10	WT-TAC n = 12	Carabin ^{-/-} -Sham n = 10	Carabin ^{-/-} -TAC n = 12
LVIDs (mm)	1.860 ± 0.069	2.716 ± 0.140***	1.912 ± 0.042	4.194 ± 0.198 ****####
LVIDd (mm)	3.230 ± 0.102	3.748 ± 0.156****	3.305 ± 0.068	4.768 ± 0.162 ****####
ESV (mL)	0.018 ± 0.002	0.053 ± 0.007*	0.02 ± 0.001	0.187 ± 0.023****####
EDV (mL)	0.088 ± 0.008	0.157 ± 0.011*	0.092 ± 0.006	0.271 ± 0.024*###
FS (%)	42.43 ± 0.685	27.63 ± 1.463****	42.00 ± 0.674	14.67 ± 1.683****####

Left ventricular end-systolic internal diameter (LVIDs), LV end-diastolic internal diameter (LVIDd), end-systolic (ESV) and end-diastolic (EDV) volumes, fractional shortening (FS). Statistical significance was determined by 2-way ANOVA with interaction analysis and Tukey post-test. *p<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001, compared with their respective control group, ####P<0.001, #####P<0.0001 compared with WT-TAC animal group.

Table 2. Echocardiographic analysis of AAV9-GFP or AAV9-Carabin treated mice after sham and TAC operations.

Groups	GFP-Sham n= 10	GFP-TAC n = 12	Carabin -Sham n = 10	Carabin -TAC n = 12
LVIDs (mm)	2.00 ± 0.063	3.05 ± 0.241****	1.94 ± 0.039	2.00 ± 0.088####
LVIDd (mm)	3.48 ± 0.091	4.07 ± 0.176**	3.41 ± 0.056	3.33 ± 0.098###
ESV (mL)	0.02 ± 0.002	0.08 ± 0.020****	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.004###
EDV (mL)	0.11 ± 0.008	0.17 ± 0.022**	0.10 ± 0.004	0.10 ± 0.008###
FS (%)	42.46 ± 0.836	25.90 ± 2.681 ****	43.08 ± 0.468	39.91 ± 1.232####

Left ventricular end-systolic internal diameter (LVIDs), LV end-diastolic internal diameter (LVIDd), end-systolic (ESV) and end-diastolic (EDV) volumes, fractional shortening (FS). Statistical significance was determined by 2-way ANOVA with interaction analysis and Tukey post-test. **P<0.01, ****P<0.0001, compared with WT control group, ####P<0.001, #####P<0.0001 compared with WT-TAC animal group.

Figure Legends:

Figure 1. Carabin deficiency accelerates pressure overload-induced heart failure (HF). **(A)** Analysis of myocardial Carabin expression by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Wblot. Left and middle, quantification of Carabin in mouse or rat left ventricular myocardium from TAC (mouse n=6; rat n=10) or sham-operated controls (mouse n=7; rat n=10). Right, quantification of Carabin in left ventricular myocardium from patients with dilated cardiomyopathy (DCM) (n=4) or non-failing control biopsies (n=4). Representative immunoblots are shown. **(B)** Heart weight (HW)/tibia length (TL) and left ventricular weight (LVW)/TL ratios of control and Carabin^{-/-} mice after sham and TAC operation (n=10–12 per group). **(C)** Upper panel, representative hematoxylin- and eosin-stained heart sections of WT or Carabin^{-/-} mice subjected or not to TAC (scale bar: 2mm). Vinculin staining (scale bar: 50 μm) and histological characterization of fibrosis (scale bar: 100 μm) in cardiac sections of WT and Carabin^{-/-} mice. The graph represents quantification of cardiomyocytes cross-sectional area (right) and the collagen content (left) (n=6 to 8 per group). **(D)** Levels of cardiac hypertrophy-related transcripts (ANF, BNP, β-MHC) and fibrosis markers (Col1, Col3) were quantified by qPCR (n=6 to 8 per group). Statistical significance was determined by the Student *t* test **(A)** or by 2-way ANOVA with interaction analysis and Tukey post-test **(B-D)**. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 compared with indicated value. RQ: relative quantity.

Figure 2. Increased Carabin expression blocks the cardiac hypertrophic response. **(A)** Left, sarcomere organization, as determined by immunostaining cells for sarcomeric α-actinin (red) in neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) infected with the indicated adenoviruses(Ad.) and stimulated or not with phenylephrine (PE). Scale bar represents 10 μm. Right, quantification of

cell surface area. **(B)** Relative luciferase activity of the ANF promoter in NRVMs co-transfected with the indicated plasmids. Bar graphs show results from 8 independent experiments performed in triplicate. The immunoblot shows the expression of recombinant cMyc-Carabin. **(C)** Immunoblot analysis of Carabin was performed on left ventricular (LV) homogenates from mice injected with AAV9-GFP (GFP) and AAV9-Carabin (Carabin) and subjected or not to TAC (n=5 per group). GAPDH expression was used as loading control. The graph represents quantification of Carabin levels. **(D)** Heart weight (HW)/tibia length (TL) and LV weight (LVW)/TL ratios of AAV9-GFP (GFP) and AAV9-Carabin (Carabin) treated mice after sham and TAC operations (n=10-12 per group). **(E)** Heart sections of AAV9-GFP (GFP) and AAV9-Carabin (Carabin) mice were stained with either vinculin to demarcate cell boundaries (green; scale bar: 50 μ m) or Masson's trichrome to detect fibrosis (blue; scale bar: 100 μ m). The bar graphs show the quantification of cardiomyocytes cross-sectional areas and fibrosis (n=8-12 per group). **(F)** Relative expression of cardiac hypertrophic (ANF, BNP, β -MHC) and fibrosis (Col1, Col3) markers genes of hearts samples from AAV9-GFP (GFP) and AAV9-Carabin (Carabin) after sham and TAC (n=6-8 per group). All data were evaluated by 2-way ANOVA/Tukey post-test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 compared with indicated value. RQ: relative quantity.

Figure 3. Carabin inhibits CaN-NFAT signaling pathway in a Ras independent fashion. **(A)** CaN activity was determined on neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) infected with either Ad.GFP or Ad.Carabin and stimulated with phenylephrine (PE, 10 μ mol/L, 30 min). Cyclosporine A (CsA, 1 μ mol/L), was used as a positive control (n=3 per condition). Data are means \pm S.E.M from 3 independent experiments. *p<0.05, ***p<0.001, versus Ad.GFP cells,

paired t test. **(B)** NRVMs transfected with the indicated plasmids were preincubated or not with CsA and stimulated or not with PE (10 μ mol/L) for 10 min. Endogenous nuclear factor of activated T-cells c3 (NFATc3) and Carabin were visualized by immunostaining using an anti-NFATc3 and an anti-cMyc antibody, respectively. At least 100 cells were analyzed in each condition. DAPI stain marks the position of nuclei. Scale bar represents 10 μ m. **(C)** Quantitative PCR analysis of MCIP 1.4 in mouse hearts subjected or not to TAC (n=8-10 mice per group). **(D)** Relative NFAT luciferase activity in NRVMs cotransfected with either siRNA control (Si-CT) or siRNA Carabin (Si-Carabin). Results are means \pm S.E.M from 3 independent experiments performed in triplicate. **(E)** Schematic representation of Carabin mutants. **(F)** Relative NFAT luciferase activity in NRVMs transfected with the indicated plasmids. The expression of Carabin and Carabin mutants (Carabin^{R141A} and Carabin^{AAVGA}) were revealed by immunoblot (D, F). *p<0.05, ***p<0.001, ****P<0.0001, compared to the control or indicated value, 2-way ANOVA/Tukey comparison test. RQ: relative quantity.

Figure 4. Carabin prevents Ras and ERK activation. **(A)** Representative Western blots depicting the interaction of Carabin with Ras. Neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) transfected with either siRNA-Carabin (Si-Carabin) or its control (Si-CT) were treated or not with PE (10 μ mol/L) for 10 min before immunoprecipitation experiments (IP). Representative of 3 experiments is shown. **(B)** Amounts of Ras-GTP determined by pull-down assays in NRVMs transfected with the indicated constructs. The bar graph represents the mean \pm S.E.M. of 5 independent experiments. **(C)** NRVMs were transfected with the indicated plasmids and then were stimulated or not with PE (10 μ mol/L) for the indicated period of time. Phosphorylated ERK (p-ERK) and total-ERK (t-ERK) were analysed by Western blot. Values are means \pm

S.E.M of 4 independent experiments. Representative immunoblots are shown. **(D, E)** Quantification of the ratio p-ERK/t-ERK as determined by Western blot of heart lysates from Carabin knock-out (Carabin^{-/-}) mice **(D)** or AAV9-Carabin (Carabin) treated mice **(E)** and their respective control 4 weeks after sham and TAC operation (n=6–8 per group). Representative immunoblots are shown. **(F)** Effects of Carabin mutant on ERK activation. After transfection with Carabin, NRVMs were stimulated or not with PE (10 μmol/L, 10 min). The bar graph represents the mean ± S.E.M. of 4 independent experiments. Representative immunoblots are shown. Of note, the ERK antibody (from Santa Cruz Biotechnology) used in **C** and **F** recognizes 1 band, and the ERK antibody (from Cell Signaling Technology) used in **D** and **E**, revealed 2 specific bands for ERK. Data were evaluated by 2-way ANOVA/Bonferroni or Tukey post-test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, compared with control group or vs. indicated value. #p<0.05, ##p<0.01, compared with control cells at the corresponding time.

Figure 5. Carabin inhibits CaMKII activation and HDAC4 nucleocytoplasmic shuttling. **(A)** Neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) were transfected with the indicated constructs and treated or not with PE (10 μmol/L, 10 min). Phospho-CaMKII (p-CaMKII), total CaMKII (t-CaMKII) and cMyc-Carabin were revealed by Western blot. The graph represents means ± S.E.M of 8 independent experiments. **(B-E)** Quantification of the ratios p-CaMKII/t-CaMKII **(B, C)** or Cytosolic (C)/Nuclear (N) HDAC4 **(D, E)** of heart lysates from Carabin^{-/-} mice or AAV9-Carabin (Carabin) treated mice and their respective control 4 weeks after sham and TAC operation (n=6–8 per group). Representative immunoblots are shown. **(F, G)** Effect of Carabin and Carabin mutants on HDAC4 cytoplasmic accumulation **(F)** and MEF2 transcriptional activity **(G)** in NRVMs. A control condition was performed by pre-treating control pSV2-

transfected cells with a CaMKII pharmacological inhibitor , KN93 (1 $\mu\text{mol/L}$). Results were normalized to control for each experiment and were expressed as means \pm S.E.M of 6 independent experiments performed in triplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the corresponding non stimulated condition or indicated values, 2-way ANOVA, Bonferroni comparison test.



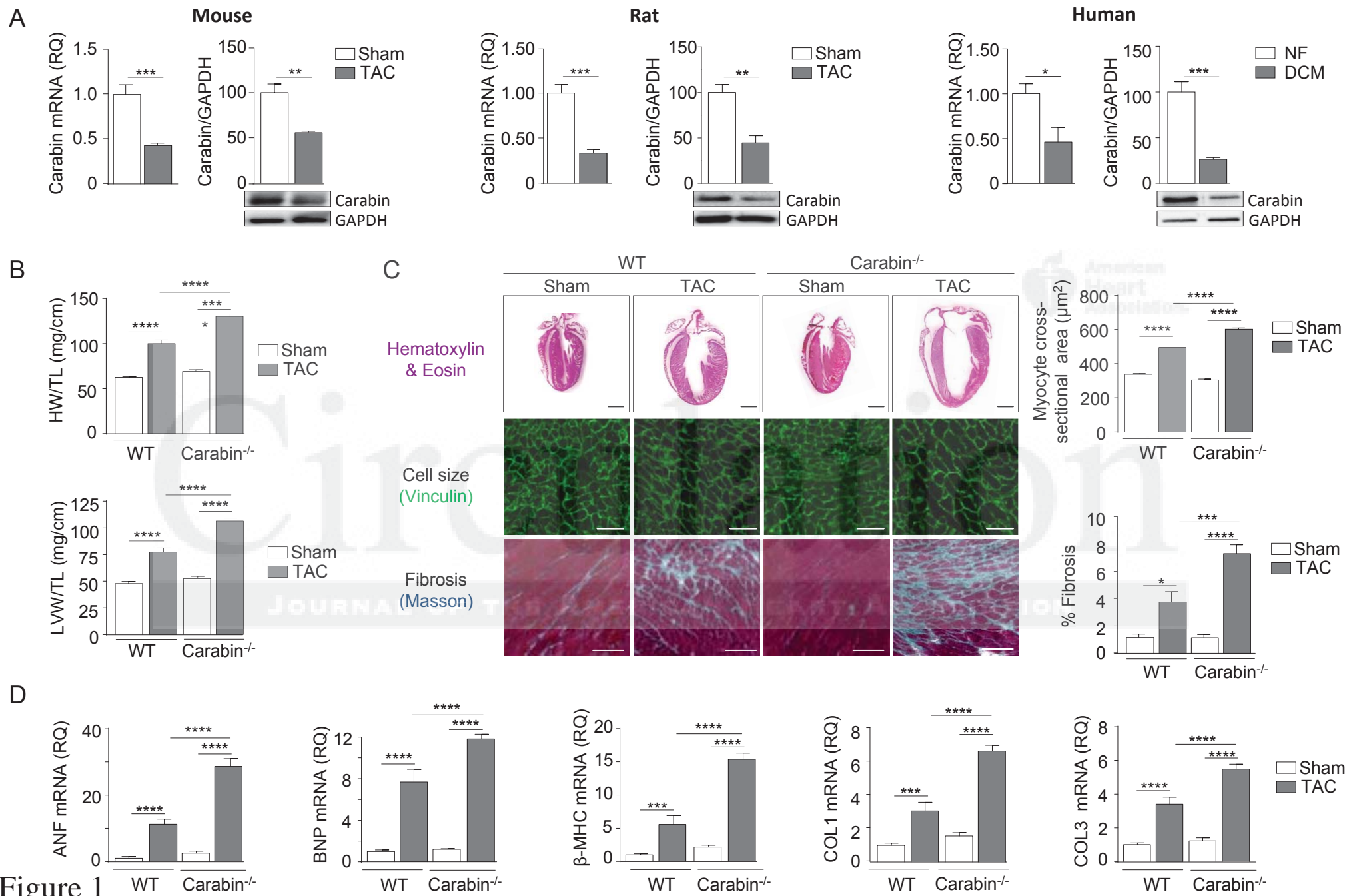


Figure 1

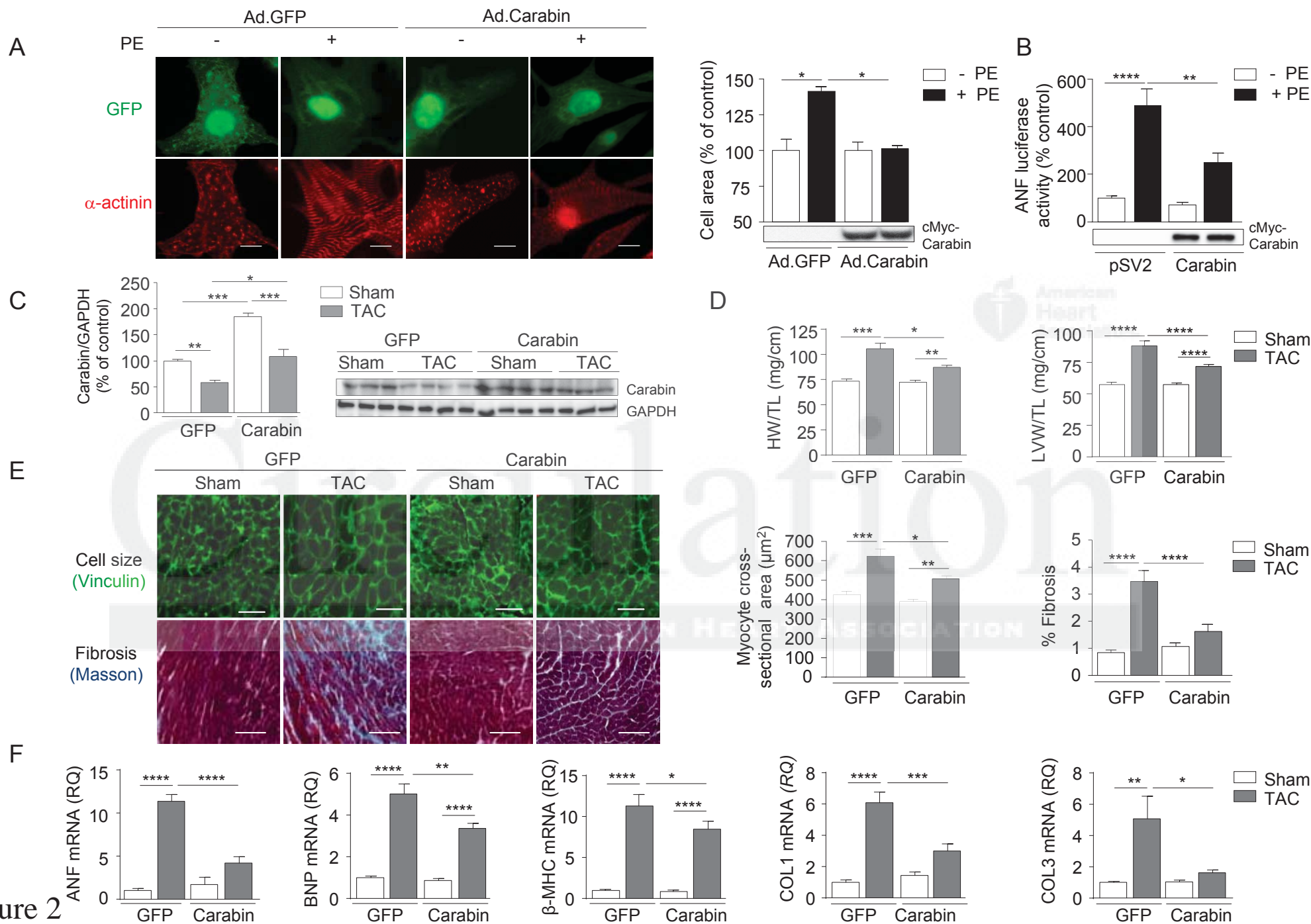


Figure 2

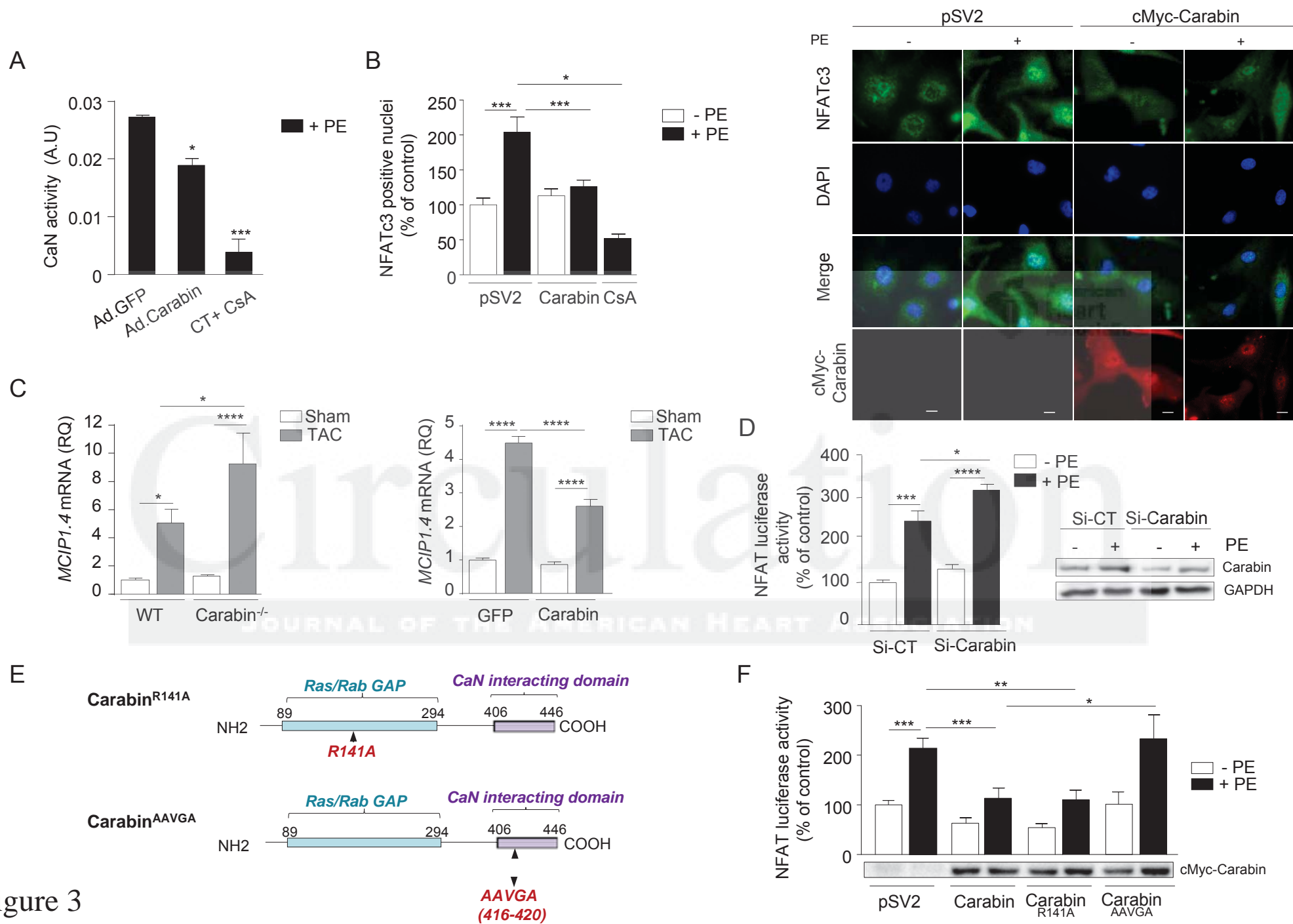


Figure 3

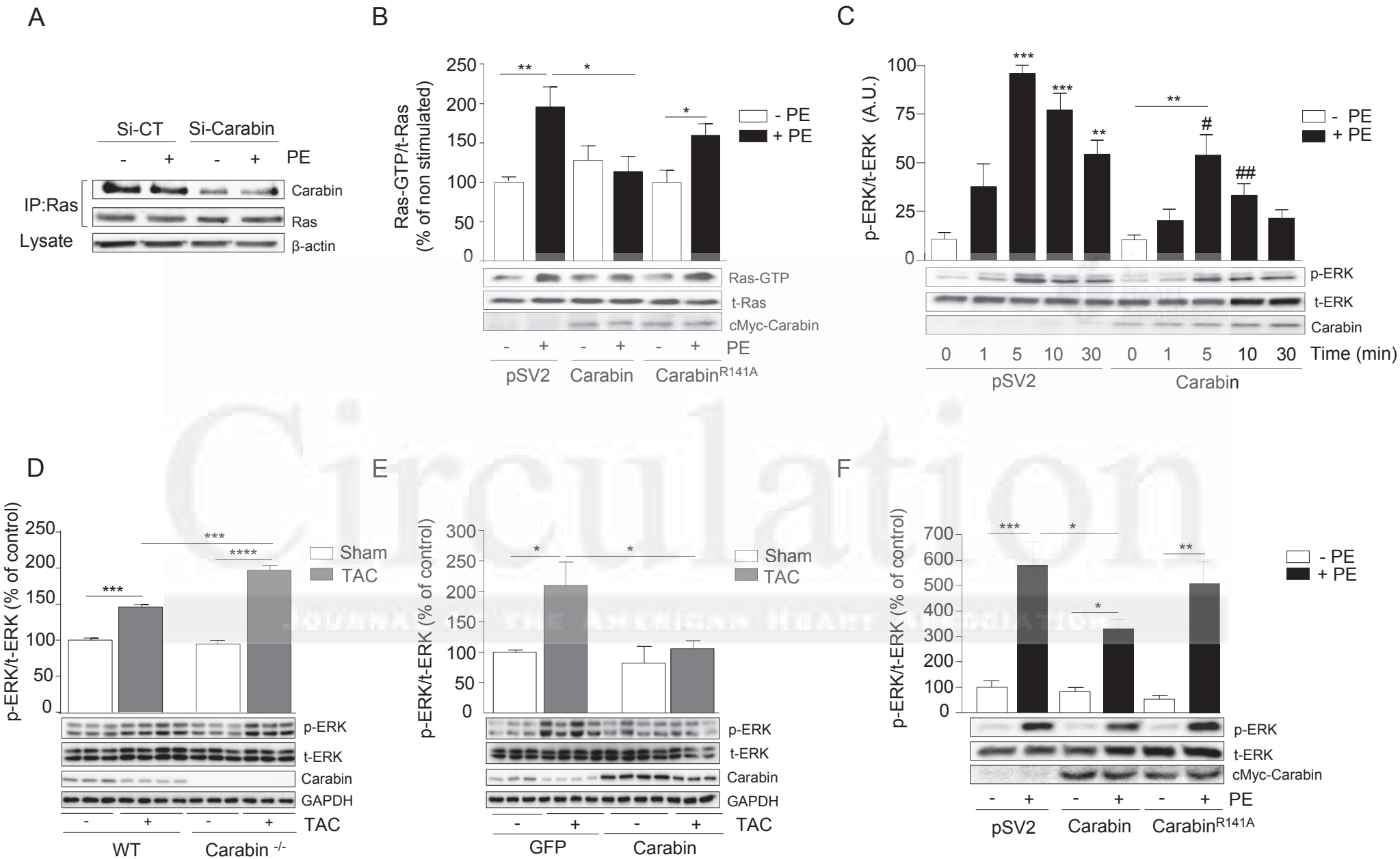


Figure 4

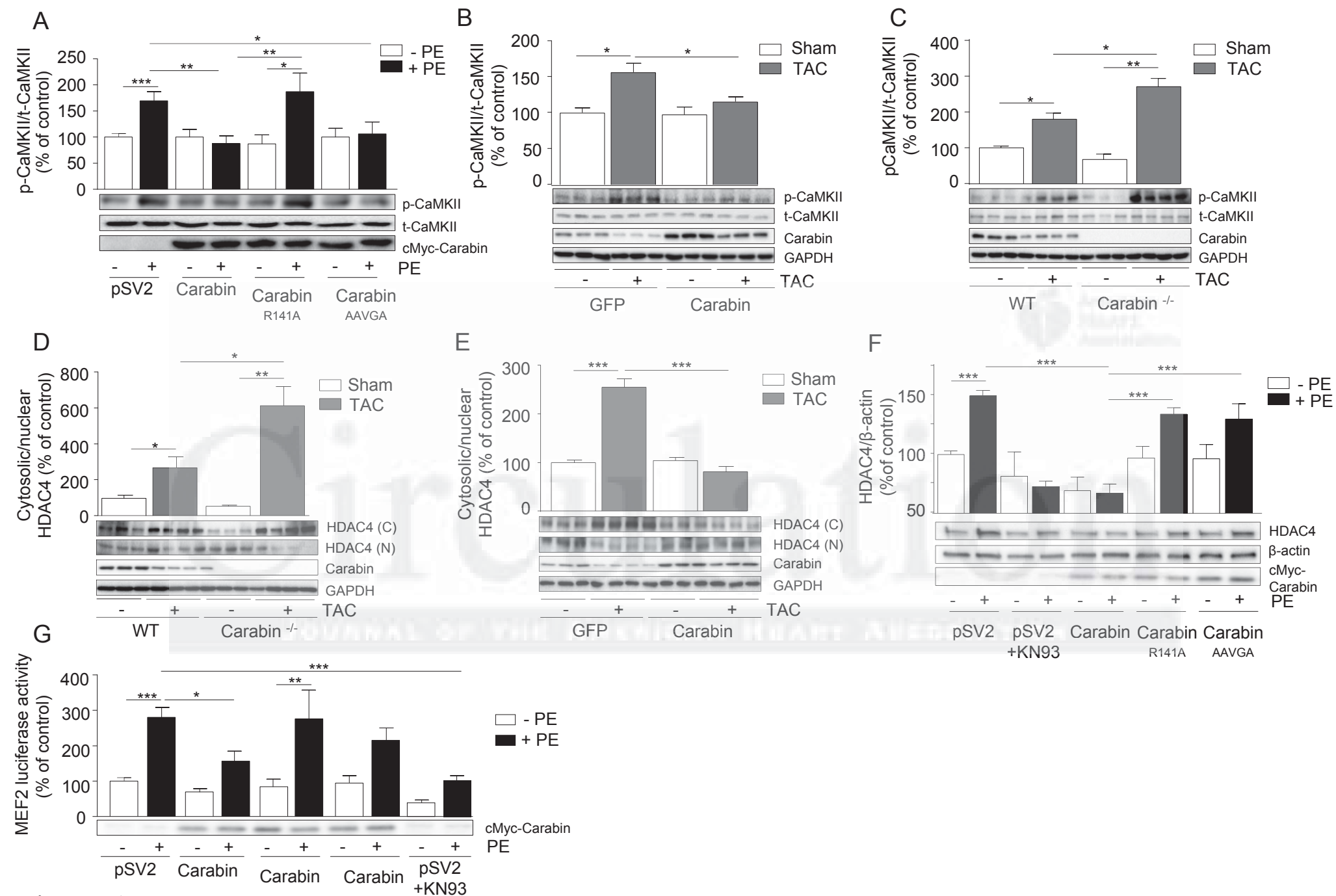


Figure 5

Résumé :

L'insuffisance cardiaque (IC) est une cause majeure de mortalité dans les pays industrialisés. Ce syndrome est le résultat de nombreuses maladies cardiaques qui induisent dans un premier temps un remodelage adaptatif du myocarde : l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG).

Dans le cœur, le calcium libéré à partir du réticulum sarcoplasmique (RS) est à l'origine de la contractilité. Ce mécanisme est contrôlé par un macro-complexe moléculaire, composé du récepteur de la ryanodine (RyR2), et de protéines stabilisatrices associées dont la junctine (JCN), la calséquestrine (CSQ2), et la triadine (Trd). Ces dernières années, des dysfonctionnements de ce complexe, par des relâchements aberrants de Ca^{2+} du RS (vu comme des fuites de Ca^{2+} hors du RS) ont été remarqués au cours de l'IC, conduisant à une HVG associée à une dysfonction contractile et à la survenue d'arythmies cardiaques létales. De très nombreuses études se sont intéressées aux protéines principales du RS, telles que RyR2 et CSQ2, mais peu de données sont disponibles sur le rôle de Trd, protéine considérée comme mineure en physiopathologie cardiaque. Afin d'étudier son rôle dans le cœur, notre travail s'est articulé autour de trois modèles de pathologie cardiaque : 1-une surcharge de pression par une sténose de l'aorte transverse (TAC), 2-une diffusion de catécholamines (isoprotérénol, Iso) par mini-pompe osmotique et 3-une IC chronique par un infarctus du myocarde (IM), chez des souris dont le gène de la triadine a été invalidé (KO Trd). En réponse à une TAC ou à l'ISO, les animaux développent une HVG plus importante que les souris WT. Suite à une TAC, cette HVG est supérieure et excentrique et s'accompagne d'une dysfonction cardiaque comparativement aux animaux sauvages. Suite à un IM, les souris KO Trd présentent une mortalité accrue post-chirurgie. L'accroissement de cette mortalité accrue résiderait dans l'augmentation significative d'arythmies ventriculaires sévères (tachycardies ventriculaires, TV) chez ces souris suite à une stimulation catécholaminergique, pouvant être la conséquence d'une augmentation des fuites de Ca^{2+} hors du RS. Nous avons également observé qu'en réponse à la TAC la réexpression du gène TRDN avec un adénovirus AAV9 dans notre modèle KO Trd permet le maintien de la fonction cardiaque et de prévenir le développement de l'HVG.

Au final, ces travaux montrent que l'absence de la triadine accélère la transition vers l'IC en modulant à la fois l'HVG et la dysfonction contractile associée mais également la survenue d'arythmies ventriculaires létales.

Mots clés : Triadine, insuffisance cardiaque, hypertrophie cardiaque, arythmies, calcium.

Abstract :

Heart failure (HF) is a serious public health issue with a growing prevalence in industrialized countries. This syndrome results from several cardiac diseases which begin with an adaptive myocardial remodeling: left ventricular hypertrophy (LVH).

In heart, contractility depends on calcium release from sarcoplasmic reticulum (SR). This release is controlled by a macro-molecular complex, composed by ryanodine receptor (RyR2) and its associated regulatory protein junctin (JCN), calsequestrin (CSQ2) and triadin (Trd). During the past years, alterations of this complex by disturbed calcium release outside SR (as « sparks ») was often observed during the development of HF, being associated with LVH, dysfunction and fatal ventricular arrhythmias. Most studies were focused on RyR2 and CSQ2 function but few data are available regarding the role of Trd, considered until now having minor role in cardiac physiopathology. To elucidate its role, we realized 3 cardiac pathological experimental models on mice with triadin gene invalidation (KO Trd): 1- a pressure overload with transversal aorta constriction (TAC) 2-a chronic infusion of catecholamines (Isoproterenol, Iso) with osmotic minipumps and 3- a chronic HF with myocardial infarction (MI). In response to TAC or Iso, KO mice developed a greater LVH compared to wild-type mice. Also, with TAC, KO mice show an eccentric LVH associated with a severe cardiac dysfunction, as compared to wild-type mice. After MI, we observed a greater mortality post-surgery in KO Trd mice. This prevalence may be due to increasing of severe ventricular arrhythmias (ventricular tachycardia, VT) after catecholaminergic stimulation. This observation could be a consequence of increasing number of « sparks », and thus an increased calcium release during diastole. More interestingly, delivery of TRDN gene using AAV9 in KO mice, prevent adverse remodeling and the associated cardiac dysfunction following 28 days TAC surgery.

To conclude, this work shows that the lack of triadin accelerate the transition towards heart failure, acting on LVH, contractile dysfunction, and the occurrence of lethal ventricular arrhythmias.

Keywords : Triadin, Heart failure, Cardiac Hypertrophy, Arrhythmia, Calcium.