



HAL
open science

Etude cellulaire et moléculaire de l'insuffisance cardiaque à fonction systolique préservée

Sarah Rouhana

► **To cite this version:**

Sarah Rouhana. Etude cellulaire et moléculaire de l'insuffisance cardiaque à fonction systolique préservée. Sciences agricoles. Université Montpellier; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté française de médecine et de pharmacie, 2018. Français. NNT : 2018MONTT067 . tel-02010470

HAL Id: tel-02010470

<https://theses.hal.science/tel-02010470>

Submitted on 7 Feb 2019

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé, spécialité : Physiologie cardiaque

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Inserm U1046 CNRS UMR

En partenariat international avec l'Université Saint Joseph, Liban

École doctorale Sciences et Santé

Doctorat en sciences biologiques et médicales, spécialité : Physiologie et Physiopathologie

Etude cellulaire et moléculaire de l'insuffisance cardiaque à fonction systolique préservée

Présentée par Sarah ROUHANA

Le 30 Novembre 2018

Sous la direction de Sylvain RICHARD
et Nassim FARES

Devant le jury composé de

Victor JEBARA, Professeur, Université Saint Joseph
Patrick BOIS, Professeur des universités, Université de Poitiers
Ramez CHAHINE, Professeur, Université Libanaise
Benjamin LAUZIER, Docteur, Université de Nantes
Pascal COLSON, Professeur des universités, Université de Montpellier
Sylvain RICHARD, Docteur, Université de Montpellier
Nassim FARES, Professeur, Université Saint Joseph

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Le chemin d'une thèse n'est jamais facile, et il aurait été encore plus dur sans la présence de nombreuses personnes que j'aimerais remercier. Entre Montpellier et Beirut, le support qui m'a été accordé sera gravé dans mon cœur à jamais.

Je tiens tout d'abord à remercier la faculté de médecine de l'Université Saint Joseph de Beirut, en la personne de son doyen le Professeur Roland Tomb, de m'avoir accueillie au sein de la faculté pendant ces années. Je remercie également le Pr. Jacques Mercier de m'avoir accueillie dans son unité *INSERM - CNRS* et de sa bienveillance.

Mes remerciements les plus sincères vont à mes directeurs de thèse, le Professeur Nassim FARES et le Docteur Sylvain RICHARD ; Pr. FARES, je n'oublierai jamais le jour où vous m'avez accueillie chez vous pour m'offrir la possibilité d'effectuer une thèse. J'étais votre étudiante durant les années de licence et de master, et vous m'avez toujours impressionnée. Vous avez approfondi mes connaissances en physiologie et contribué au développement de mon esprit scientifique. Je vous remercie pour les conseils, pour votre aide précieuse dans la progression du travail, la rédaction de l'article et du manuscrit. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, merci pour votre soutien durant ces années et surtout pendant les périodes difficiles, pour vos encouragements, pour votre compréhension, pour vos visites pendant mes séjours en France qui me rendaient tellement heureuse. Vous avez été toujours à mon écoute, au niveau personnel et au niveau professionnel. Je n'oublierai jamais les moments partagés ensemble, les repas, les délicieux gâteaux et notre passion pour les desserts. Je vous suis reconnaissante. Dr. RICHARD, je vous exprime toute ma gratitude pour m'avoir encadrée pendant ces années de thèse. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe, de m'avoir fait confiance, de m'avoir accordé votre temps pour m'installer et assurer mon intégration dans l'équipe. Merci pour le temps que vous avez consacré pour m'apprendre, pour discuter ensemble et approfondir ma réflexion, pour rédiger l'article et corriger mon manuscrit. Vos conseils m'ont permis de progresser au fil des années. Je vous remercie surtout pour m'avoir fait sentir que j'ai une famille en France, que je n'étais pas toute seule, votre accueil chaleureux a facilité mon séjour à l'étranger. Enfin, merci pour les papiers et

les justificatifs que vous avez rédigés, qui ont pris beaucoup de votre temps, mais qui m'ont permis de venir en France, je sais que ce n'était pas toujours évident mais bientôt c'est la fin.

Je remercie Pr. Patrick Bois, Pr. Ramez Chahine, Pr. Victor Jebara et Dr. Benjamin Lauzier qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail et faire partie du jury.

Je remercie le conseil de recherche de l'USJ, le campus France et Cèdre d'avoir financé ce projet durant ces années.

Dr. Youakim Saliba, l'encyclopédie mobile, je vous remercie pour vos conseils, pour votre aide, pour tous les moments que vous avez consacrés pour bien me lancer sur la paillasse. Merci pour les conversations enrichissantes qui m'ont permis de profiter de vos connaissances et de votre expérience professionnelle. Merci pour les beaux moments partagés ensemble.

J'envoie un grand merci à mes deux amies, Joelle et Stéphanie, qui ont rendu ce chemin beaucoup plus facile. Joelle, merci pour tous les moments d'écoute, pour ton soutien pendant les périodes stressantes et pour ton aide à tous les niveaux qui a rendu le travail agréable. Ta présence à mes côtés m'a confortée et m'a apporté une joie dans mon cœur. Stéphanie, je te remercie pour tes encouragements, pour ton support continu et pour ton aide au labo et en dehors du labo. Ta présence m'a soulagée beaucoup de fois. Les filles, les moments partagés ensemble seront ancrés dans mon cœur pour toujours.

Je remercie tous les membres de l'unité Inserm U1046, CNRS UMR 9214, laboratoire Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles pour leur accueil chaleureux. Je remercie l'équipe administrative, Mme Nadège Sanchez, Mme Fabienne Dagnac-Lagrange et Mme Annick Bourret qui ont assuré le bon déroulement de la thèse. Je remercie Dr. Anne Virsolvy, Mme Valérie Scheuermann, M. Patrice Bideaux pour leur contribution précieuse à ce travail. Mes remerciements vont à Nourine Chakouri pour son aide pendant les manips et pour sa présence qui a rendu le travail agréable. Je remercie beaucoup de personnes qui m'ont été d'un grand soutien au cours de mes séjours : Pierre, Marina, Nour, Haikel, Jennifer, Ana Carolina, Liliam. Je remercie Marie Demion pour ses conseils et son aide à tous les niveaux.

Je suis très contente d'avoir fait la connaissance de personnes avec lesquelles j'ai bâti une amitié même à travers la distance. Ma chère Mathilde, je n'ai jamais imaginé que je peux partager avec

une personne tellement de choses communes, des idées et des points de vue (tu sais de quoi je parle) qui ne peuvent pas être diffusés dans la société. Je te remercie pour ton amitié qui a rendu mon séjour agréable, pour nos longues discussions et tes encouragements. Je n'oublierai jamais les moments passés ensemble, nos après-midis au polygone, et surtout dans notre salon de thé préféré avec Mathias, que je remercie aussi surtout d'avoir enrichi mon vocabulaire. Je vous souhaite tous les deux le plus bel avenir que la vie peut offrir.

Amanda, ta présence au bureau m'a soulagée, je te remercie de tout mon cœur pour tes conseils et ton aide précieuse dans mon travail, merci pour les moments de rire et de pleure, pour m'avoir consolée, pour avoir partagé mes secrets, pour m'avoir appris beaucoup de choses, pour m'avoir corrigé l'anglais et me laisser le pratiquer pendant nos longues conversations. Je te remercie pour ton amitié et je te souhaite le meilleur.

Mes remerciements vont au Dr. Charlotte Farah pour sa contribution essentielle dans ce projet. Merci pour les longues heures passées devant l'échographe, pour ta patience et ta précision dans le travail. Le résultat n'aurait jamais été le même sans ta contribution.

Je remercie le Dr. Olivier Cazorla pour m'avoir appris et suivi à l'Ionoptix, pour sa contribution dans la publication et pour tous ses conseils.

J'exprime ma gratitude au Dr. Franck Aimond « le patcheur » qui a contribué à ce travail à travers le patch, pour son aide précieuse. C'est une personne agréable au niveau scientifique et humain.

Je remercie le Dr. Jérôme Roy pour sa contribution au travail, pour ses conseils et son enthousiasme.

Je remercie le Dr. Jérôme Thireau qui a suivi de près mon projet, pour ses conseils et pour m'avoir appris à effectuer l'ECG.

Je remercie Dr. Glaucy Rodrigues De Araujo pour sa contribution dans la publication.

Je remercie de tout mon cœur Dr. Cyril Reboul, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à Avignon, pour son travail qui a permis d'apporter de résultats très importants permettant la progression du travail sur la bonne voie. Je vous exprime toute ma gratitude.

Ma famille en France : Sandra Challita, les mots me manquent pour t'exprimer ma gratitude. Je n'aurai jamais réussi à arriver là où je suis sans toi. Ton accueil, ton aide, tes encouragements, ton amitié, ta générosité ont fait de moi une personne plus forte, plus courageuse et m'ont permis de finir cette thèse malgré toutes les difficultés. Merci Sandoura et merci parce que tu m'as laissé voler quelques amis qui sont devenus famille. Salim, ton amitié a bouleversé mes séjours à Montpellier. Elle les a rendus les plus beaux de ma vie. Je n'oublierai jamais les moments passés ensemble, les éclats de rire, les discussions, les diners de raclette, la découverte de nouveaux villages, et surtout Grau du Roi. Merci pour ton accueil et ton amitié, je te souhaite le meilleur à toi et Sarah ta fiancée. Yassine, je suis très contente d'avoir fait ta connaissance, d'avoir bâti cette amitié qui m'apporte une joie dans le cœur. Je te remercie pour les beaux souvenirs que tu m'as donnés. André, tu as laissé tes empreintes dans mon cœur par ta gentillesse et ton amitié. Les beaux moments passés ensemble seront gravés dans mon cœur. Je vous souhaite le meilleur là où vous partez dans le monde.

Arrivée à la fin de cette thèse, j'aimerais remercier Mr. Farid Khalifé, pour ses encouragements et son aide à tous les niveaux. Votre contribution de loin et de près m'a poussée au-delà de mes limites. Je vous suis reconnaissante.

Ma chère Famille, voilà que je termine mes études, enfin ! Mes chers parents, je suis là où je suis grâce à vous, à votre soutien, à vos encouragements. Mon Cher papa, je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi, les mots me manquent pour t'exprimer ma gratitude. Je te remercie pour tes sacrifices qui m'ont donné la chance de partir à l'étranger et de poursuivre mes rêves. Maman, ton amour inconditionnel m'a guidé même à distance. Je te remercie pour m'avoir donné la force de vivre une jolie expérience malgré toutes les difficultés, de m'avoir accompagnée sur Skype pendant des longues heures, pour tes encouragements, tes sacrifices. Mes chers parents, je vous dois ce que je suis et ce que je serai. Je vous aime et je remercie Dieu pour ce cadeau inlassable, vous. Ma chère sœur Zeina, ma psychologue, mon amie, tu es une personne exceptionnelle, je suis très chanceuse de t'avoir à mes côtés. Tu es mon support, la personne à laquelle j'ai recours pendant mes hauts et mes bas. Je te remercie Zanzoun pour tes encouragements, sans toi ce parcours aurait été beaucoup plus dur. Je t'aime. Tati, ma petite sœur qui n'est plus trop petite. Ta présence me donne la joie au cœur, tu me fais rire lorsque personne n'arrive à me changer les idées, je te remercie pour ton amour, ton sourire et les éclats de rire. Je t'aime.

Jad, l'amour de ma vie, mon mari. A chaque fois je pensais quoi t'écrire et comment te remercier, j'ai le souffle coupé. Voilà que je termine cette thèse, un long chemin que tu as décidé de parcourir avec moi, sans aucune hésitation. Je te remercie parce que tu as cru en moi surtout lorsque je me dévalorisais. Merci pour ton amour, merci pour tes encouragements, merci parce que tu vois en moi la personne que je désire être. Merci pour ta patience, toi qui ne manques pas d'énergie positive, de croyance, d'ambitions. Merci de m'avoir appris à apprécier la vie, mon idole. J'ai hâte de voir ce qu'elle nous cache, j'ai hâte de la vivre avec toi. Je t'aime.

DIEU, merci pour tes dons, merci pour tes grâces.

Table des matières

Table des illustrations	i
Liste des abréviations	iii
Résumé :.....	v
Abstract :	vi
Avant-Propos	1
Historique	3
1. Activité cardiaque normale	4
1.1 Rappel anatomo-physiologique	4
1.1.1 Muscle cardiaque	4
1.1.2 Cellules cardiaques	6
1.1.3 Le sarcolemme	7
1.1.4 Cycle cardiaque	8
1.2 Activité électrique du cœur	10
1.2.1 Potentiel d'action cardiaque	10
1.2.2 Les canaux ioniques cardiaques.....	12
1.3 Couplage excitation-contraction.....	18
1.3.1 Mécanisme	18
1.3.2 Les acteurs moléculaires de la contraction :	20
1.3.3 Les acteurs de la relaxation :.....	25
2. Activité cardiaque anormale : Insuffisance cardiaque	29
2.1 Insuffisance cardiaque systolique	31
2.1.1 Définition et épidémiologie	31
2.1.2 Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque systolique	33
2.1.3 Traitement	40
2.2 Insuffisance cardiaque diastolique	42
2.2.1 Définition et épidémiologie	42
2.2.2 Physiopathologie de l'IC diastolique	43
2.2.3 Diagnostic :.....	48
2.2.4 Traitement	51
3. L'homéostasie calcique dans l'IC systolique vs l'IC diastolique	55
3.1 Le calcium dans l'IC systolique.....	55

3.2	Le calcium dans l'IC diastolique :	57
Problématique et Objectifs.....		59
Matériels et Méthodes.....		61
1.	Modèle animal et protocole expérimental.....	62
2.	Suivi hémodynamique	64
2.1	Echocardiographie	64
2.2	Mesure des pressions artérielle et intra-ventriculaires.....	67
3.	Etude in vitro sur des cardiomyocytes isolés.....	68
3.1	Isolement et dissociation enzymatique des cardiomyocytes	68
3.2	Mesure des paramètres de la contraction et du transitoire calcique	71
3.3	Mesures des libérations spontanées de Ca ²⁺ en diastole : les Ca ²⁺ sparks	74
3.4	Etude de la fonction contractile des cardiomyocytes : mesure des forces passive et active dans les cardiomyocytes perméabilisés	76
3.5	Etude électrophysiologique – Technique de patch clamp.....	79
4.	Etudes biochimiques : Quantification de l'expression protéique : Western Blot.....	80
5.	Histologie.....	83
6.	Analyses Statistiques	84
Résultats.....		85
Résultats 1 : Etude de l'homéostasie calcique chez un modèle d'IC/FEp		86
Discussion de la publication		107
Résultats 2 : Etude de l'effet de la Ranolazine sur les cardiomyocytes isolés de cœurs de rats Sham et AAB.....		110
1.	Effets de la Ranolazine sur les paramètres de la contraction des cardiomyocytes de rats AAB :.	110
2.	Effets de la Ranolazine sur le transitoire calcique des cardiomyocytes de rats AAB :	112
3.	Effets de la Ranolazine sur la survenue d'évènements cellulaires anormaux par mesure d'évènements calciques durant la systole et la diastole :.....	114

Discussion des résultats	116
Discussion générale et perspectives	118
Conclusion et perspectives générales	129
Références bibliographiques	130

Table des illustrations

Liste des figures :

Figure H1 : Coupe longitudinale du cœur. www.arret-cardiaque.e-monsite.com	4
Figure H2 : Les parois du cœur de l'intérieur vers l'extérieur : l'endocarde, le myocarde, le péricarde avec son feuillet viscéral séreux et pariétal. La couche la plus externe du péricarde est fibreuse. www.e-monsite.fr	5
Figure H3 : Représentation d'une coupe de cardiomyocyte montrant les différentes jonctions intercellulaires. Ces jonctions sont localisées au niveau du sarcolemme, membrane de la cellule musculaire. www.couretmaladiescoronariennes.wordpress.com	7
Figure H4 : Schéma montrant la structure d'un sarcomère.	8
Figure H5 : Illustration des quatre phases du cycle cardiaque représentant la variation pression-volume. D'après « Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux © 2007, John Libbey EUROTEXT, Paris » (Libbey, 2007).....	9
Figure H6 : Différents potentiels d'action typiques enregistrés au sein du cœur, allant du nœud sinusal jusqu'au cardiomyocyte ventriculaire. Figure d'après http://www.bem.fi/book/06/06.htm	10
Figure H7 : Illustration montrant le PA cardiaque d'un cardiomyocyte (non-pacemaker).....	12
Figure H8 : Structure moléculaire du canal sodique cardiaque.	14
Figure H9 : Structure des sous-unités du canal calcique.	16
Figure H10 : Représentation schématique de la classification structurelle des sous-unités des canaux potassiques.	17
Figure H11 : Couplage excitation-contraction du cardiomyocyte ventriculaire.....	19
Figure H12 : Représentation schématique du sarcomère durant la diastole (A) et durant la systole (B). .	20
Figure H13 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire RyR2 comprenant quatre sous-unités identiques (numérotées de 1 à 4).	22
Figure 14 : Représentation schématique des modifications conformationnelles de SERCA2a et du cycle catalytique.	26
Figure H15 : Schéma représentant le cycle du Ca^{2+} dans le cardiomyocyte.	29
Figure H16 : Illustration de la relation pression-volume du VG à différentes phases d'un cycle cardiaque :	35
Figure H17 : Relation pression-volume en dysfonction diastolique du VG.	45
Figure H18 : Schéma simplifié des mécanismes contribuant à l'IC diastolique.	47
Figure H19 : Représentation schématique du flux mitral (première ligne), et du Doppler tissulaire au niveau de l'anneau mitral dans différents cas.	50
Figure MM 1 : Photographie montrant la Ligature de l'aorte abdominale au niveau supra-rénal juste avant la bifurcation (Flèche blanche).....	63
Figure MM 2 : Illustration d'échocardiographie réalisée au niveau du VG chez un rat Sham, montrant la cavité cardiaque en phase de diastole (panneau supérieur). Coupe parasternale montrant les mesures	

réalisées en phase de diastole et systole (panneau inférieur). Illustrations acquises lors des travaux réalisés dans notre laboratoire.....	66
Figure MM 3 : Photographie prise au Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire au moment de la mesure des pressions artérielles et intra-ventriculaires.....	67
Figure MM 4 : Dispositif du système de perfusion de Langendorff utilisé dans notre laboratoire.....	69
Figure MM 5 : Photographie du cœur de rat canulé en cours de digestion enzymatique.....	70
Figure MM 6 : Le système IonOptix. Image obtenue d'après www.ionoptix.com	72
Figure MM 7 : Acquisition obtenue lors de nos travaux. Le cardiomyocyte ventriculaire du rat en présence de l'indo-1AM.	73
Figure MM 8 : Les enregistrements des variations de fluorescences ainsi que les variations de la longueur des sarcomères en temps réel acquis grâce au système d'ionOptix dans notre laboratoire.	74
Figure MM 9 : Acquisition obtenue par microscopie confocale en mode line scan en présence de fluo-4AM où des Ca ²⁺ sparks peuvent être mesurés. L'acquisition est obtenue au cours de nos travaux.	76
Figure MM 10 : A : Mesure des tensions active et passive en fonction de la longueur de sarcomère ; B : Mesure de la tension relative en fonction de pCa.	78
Figure R 1 : Effet de la Ranolazine sur les paramètres de la contraction chez les rats Sham et AAB.	111
Figure R 2 : Effets de la Ranolazine sur le transitoire calcique chez les rats Sham et AAB.....	113
Figure R 3 : Effets de la Ranolazine sur la survenue des événements calciques cellulaires spontanés chez les rats Sham et AAB.....	114
Figure D 1 : Arbre d'aide à la décision identifiant les principales caractéristiques à remplir lors de la modélisation de l'IC/FEp dans les études précliniques (Valero-Muñoz et al., 2017).....	107
Figure D 2 : Représentation schématique de la physiopathologie de l'IC/FEp.	126

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Etiologie de l'IC. D'après les « guidelines » de la Société Européenne de Cardiologie, (Ponikowski et al., 2016).	34
Tableau 2 : Description des signes et symptômes typiques d'IC. D'après les « guidelines » de la Société Européenne de Cardiologie, (Ponikowski et al., 2016).....	38
Tableau 3 : Principaux traitements administrés aux patients de l'IC systolique.	41
Tableau 4 : Composition de la solution relaxante et de la solution activatrice.....	77

Liste des abréviations

AEM : agence européenne du médicament
AGE : *advance glycation endproducts*
AMP_c : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ANP : peptide natriurétique de type A
ARB : angiotensin receptor blockor
Asp351 : aspartate 351
ATP : adénosine triphosphate
BNP : peptide natriurétique de type B
bpm : battement par minute
Ca²⁺ : calcium
CSQ : Calséquestrine
CaM : calmoduline
CaMKII : protéine kinase Ca²⁺ calmoduline dépendante
CEC : couplage excitation-contraction
CICR : *calcium-induced calcium-release*
ECG : Electrocardiogramme
ESC : *European Society of Cardiology*
FE : fraction d'éjection
FKBP12 : *FK binding protein*
HF : *heart failure*
IC : insuffisance cardiaque
IC/FEp : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée
IC/FEr : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite
IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion
K⁺ : potassium
LTCC : canaux de type L
MMPs : métalloprotéinases matricielles
MRA : *mirevalo/corticoid receptor antagonist*
Na⁺ : sodium
NCX : échangeur sodium calcium

NYHA : *New York Heart Association*
OG : oreillette gauche
PA : potentiel d'action
PARV : parvalbumine
PKA : protéine kinase AMP_c-dépendante
PLN : phospholamban
PP1 : phosphatase 1
PP2 : phosphatase 2
RS : réticulum sarcoplasmique
RyR : récepteur à la Ryanodine
Ser16 : sérine 16
SERCA2a : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase
SHR : spontaneously hypertensive rats
SNA : système nerveux autonome
SRAA : système rénine angiotensine aldostérone
TGF-β : *transforming growth factor*
Thr17 : thréonine 17
TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases matricielles
VD : ventricule droit
VG : ventricule gauche

Résumé :

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (IC/FEp) constitue un problème de santé croissant. Elle pourrait devenir la principale cause d'IC d'ici une décennie. C'est une pathologie associée à un taux élevé de morbidité et de mortalité. La prise en charge thérapeutique de l'IC/FEp reste limitée en raison de sa physiopathologie encore mal élucidée. Dans le présent travail, après avoir mis au point un modèle d'IC/FEp sur le rat adulte mâle et l'avoir caractérisé, nous avons évalué le phénotype fonctionnel et l'homéostasie calcique des cardiomyocytes. Les cœurs de ces animaux ont montré une fraction d'éjection supérieure à 50%, associée à une congestion pulmonaire, une hypertrophie concentrique avec une augmentation de la masse du ventricule gauche, une rigidité myocardique, une relaxation et un remplissage ventriculaire passif altérés et une dilatation auriculaire. Au niveau cellulaire, la contraction mesurée sur des cardiomyocytes isolés ainsi que le transitoire calcique sont augmentés. On note, de même, une surcharge en Ca^{2+} diastolique favorisée par une fuite à travers les canaux Ryanodine 2 et par un dysfonctionnement de l'échangeur Na^+ /Ca^{2+} qui contribuent à générer des événements calciques spontanés. La phosphorylation du phospholamban, régulateur de l'activité de la SERCA2a, a également augmenté, laissant suggérer une compensation adaptative du cycle de Ca^{2+} . Enfin, en présence de Ranolazine, inhibiteur du courant sodique soutenu, les événements calciques spontanés ont été réprimés. En conclusion, le remodelage cardiaque dans l'IC/FEp semble être différent de celui observé dans l'IC/FEr et ouvre la voie vers de nouveaux acteurs physiopathologiques et thérapeutiques.

Mots clés : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, hypertension, cardiomyocytes, calcium, Ranolazine

Abstract :

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a growing health problem. It could become the leading cause of HF within a decade. It is a pathology associated with high morbidity and mortality. Therapeutic options are limited due to a lack of knowledge of the pathology and its evolution. In this work, we investigated the cellular phenotype and Ca^{2+} handling in hearts recapitulating HFpEF criteria. HFpEF was induced in a portion of male *Wistar* rats four weeks after abdominal aortic banding. These animals had nearly normal ejection fraction and presented elevated blood pressure, lung congestion, concentric hypertrophy, increased LV mass, wall stiffness, impaired active relaxation and passive filling of the left ventricle, enlarged left atrium, and cardiomyocyte hypertrophy. Left ventricular cell contraction was stronger and the Ca^{2+} transient larger. Ca^{2+} cycling was modified with a RyR2 mediated Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum and impaired Ca^{2+} extrusion through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), which promoted an increase in diastolic Ca^{2+} and spontaneous Ca^{2+} waves. PLN phosphorylation which promotes SERCA2a activity, was increased, suggesting an adaptive compensation of Ca^{2+} cycling. In the presence of Ranolazine, a sustained sodium current inhibitor, spontaneous Ca^{2+} events were suppressed. Cardiac remodeling in hearts with a HFpEF status differs from that known for HFrEF and opens the way to new pathophysiological and therapeutic actors.

Keywords : Heart failure with preserved ejection fraction, hypertension, cardiomyocytes, calcium, Ranolazine

Avant-Propos

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une thèse de cotutelle entre le *laboratoire de Recherche en Physiologie et Physiopathologie de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth*, et le *laboratoire de Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des muscles de l'Université de Montpellier*. Cette collaboration a permis de mettre en place un projet scientifique s'appuyant sur les compétences des deux équipes de recherche. Il a été effectué en alternance entre les deux laboratoires pendant différents séjours dans les deux pays.

Malgré le progrès médical important réalisé dans le domaine de la cardiologie, les maladies cardiovasculaires demeurent la cause principale de morbidité et mortalité dans le monde. L'insuffisance cardiaque (IC), plus particulièrement, affecte 1-3 % de la population et est la principale cause d'hospitalisation. L'IC résulte de l'impossibilité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Il s'agit d'une pathologie hétérogène et complexe. Son diagnostic est basé sur un ensemble de symptômes et de signes cliniques. L'IC a longtemps été associée à une altération de la fonction systolique du ventricule gauche (VG). Au cours des dernières années, les cardiologues ont identifié un sous-type d'IC caractérisé principalement par une altération de la fonction diastolique. On sait maintenant que 50% des patients atteints d'IC ont une fraction d'éjection (FE) normale, reflétant le fait que la fonction systolique est préservée. Il existe donc deux populations de patients souffrant d'IC : ceux avec une fraction d'éjection réduite (IC/FEr ou IC « systolique »), et ceux avec une fraction d'éjection préservée (IC/FEp ou « IC diastolique »). La prévalence de l'IC/FEp augmente de 1% chaque année et constitue un problème de santé croissant. Elle pourrait être considérée comme l'une des "nouvelles" pathologies de ce début de millénaire.

L'IC/FEp est associée à une fonction diastolique anormale, liée à une altération de la relaxation et du remplissage du VG. Ce syndrome est causé par un dysfonctionnement ventriculaire gauche qui à son tour induit une résistance accrue au remplissage ventriculaire gauche provoquant finalement une IC. Les patients souffrant de l'IC/FEp ont souvent une hypertrophie ventriculaire gauche. Elle est associée à des comorbidités telles que l'hypertension artérielle, le diabète, l'insuffisance rénale, les maladies de l'artère coronaire, et la fibrillation auriculaire. Les causes de ce remodelage cardiaque sont comparables à celles de l'IC/FEr avec symptômes cliniques identiques. Jusqu'à maintenant, il n'existe pas de traitement spécifique reconnu pour l'IC/FEp. L'absence d'un

traitement efficace est principalement due à une mauvaise compréhension du développement et de la progression de l'IC/FEp, et à l'absence des moyens appropriés pour le diagnostic et l'identification des premiers stades de la pathologie. Ainsi, pour mieux comprendre la physiopathologie de l'IC/FEp, et par conséquent améliorer la prise en charge des patients atteints, l'étude des mécanismes sous-jacents est d'une importance cruciale.

Notre objectif a été d'évaluer sur un modèle expérimental d'IC/FEp, induite par constriction de l'aorte abdominale chez le rat adulte, les composantes cellulaires et moléculaires impliquées dans cette pathologie.

Dans un **premier temps**, nous avons procédé à la mise au point du modèle expérimental, puis, dans un **second temps**, étudié, *in vitro*, l'homéostasie calcique et les protéines potentiellement impliquées, dès les stades les plus précoces de la pathologie.

Historique

1. Activité cardiaque normale

Le cœur est un organe vital du système circulatoire responsable de l'éjection du sang à travers les vaisseaux sanguins. La circulation entre le cœur et les poumons est appelée *circulation pulmonaire* et celle entre le cœur et les organes périphériques est dite *circulation systémique*. Le cœur est formé de deux parties distinctes, anatomiquement et fonctionnellement. Situé dans la partie antérieure et médiane du thorax, il est délimité par les poumons de chaque côté, au-dessus du diaphragme. Pour effectuer toutes ces fonctions, le cœur possède une anatomie particulière.

1.1 Rappel anatomo-physiologique

1.1.1 Muscle cardiaque

Le cœur est un organe creux formé de deux parties, gauche et droite, comportant chacune une oreillette et un ventricule formant quatre cavités au total. Sa fonction de pompe est régulée par la coordination d'un système valvulaire, (**Figure H1**) et sa vascularisation est assurée par un réseau composé d'artères et de veines coronaires.

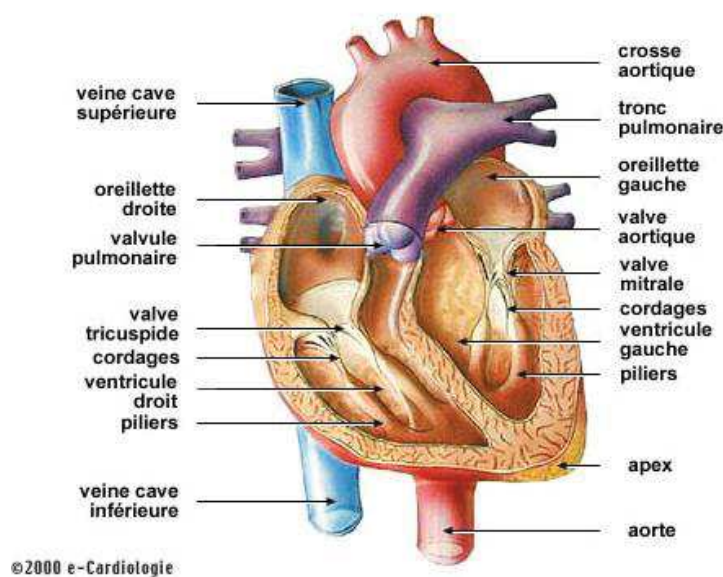


Figure H1 : Coupe longitudinale du cœur. www.arret-cardiaque.e-monsite.com

Le cœur est composé de trois couches :

L'endocarde : la face la plus interne formée d'une couche endothéliale.

Le myocarde : la partie la plus épaisse constituant la partie contractile du cœur, principalement formée de cardiomyocytes.

L'épicarde : la membrane interne séreuse ou feuillet viscéral du revêtement cardiaque (péricarde), séparée du myocarde par une épaisse couche de tissu adipeux où l'on observe les vaisseaux sanguins. Ce feuillet viscéral est en continuité avec la séreuse du feuillet pariétal du péricarde (**Figure H2**). Entre ces deux feuillets existe un espace péricardique favorisant le glissement entre les parois et donc les mouvements de contraction et de relaxation. Le péricarde fibreux est la couche la plus externe du péricarde.

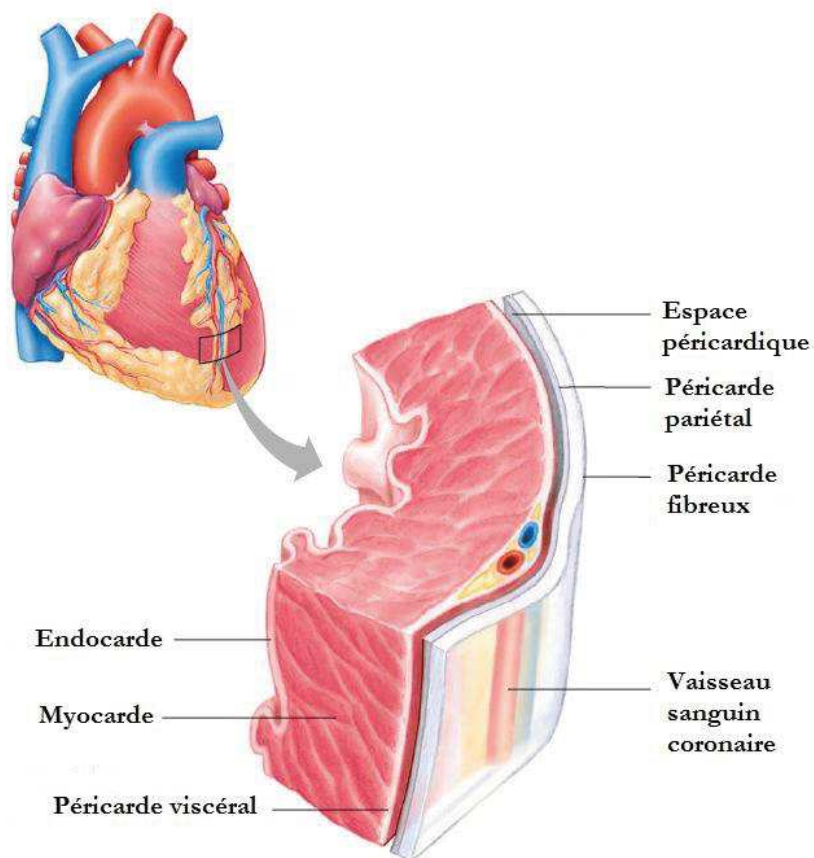


Figure H2 : Les parois du cœur de l'intérieur vers l'extérieur : l'endocarde, le myocarde, le péricarde avec son feuillet viscéral séreux et pariétal. La couche la plus externe du péricarde est fibreuse. www.e-monsite.fr

1.1.2 Cellules cardiaques

Le cœur, ayant essentiellement une fonction de pompe, n'est pourtant pas formé uniquement de tissu musculaire. La composition cellulaire du cœur chez le rat adulte comprend 30-35% de cardiomyocytes contre 65-70% de cellules non myocytaires, majoritairement des fibroblastes (Nag, 1980; Vliegen *et al.*, 1991; Baudino *et al.*, 2006). Chez l'homme, les cardiomyocytes constituent 30-40% du nombre total des cellules (Camelliti *et al.*, 2005).

Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires striées qui constituent l'entité fonctionnelle à l'origine de la contractilité du cœur. Ils ont une forme parallépipédique et mesurent en moyenne 120 μm en longueur et 90 μm en largeur. Les cellules cardiaques sont généralement mononuclées et leurs cytoplasmes sont riches en protéines contractiles organisées donnant naissance à la plus petite entité contractile de la cellule : le sarcomère.

Les cellules cardiaques sont connectées entre elles par des jonctions très particulières « les disques intercalaires ». Au niveau de ces derniers, s'observent les desmosomes et les jonctions communicantes (jonctions gap). Les desmosomes ont pour rôle d'assurer la cohésion entre les cellules et d'éviter leur détachement les unes des autres. Quant aux jonctions communicantes, elles assurent le passage des ions entre les cellules permettant la diffusion des potentiels d'action (Mezzano *et al.*, 2014) (**Figure H3**).

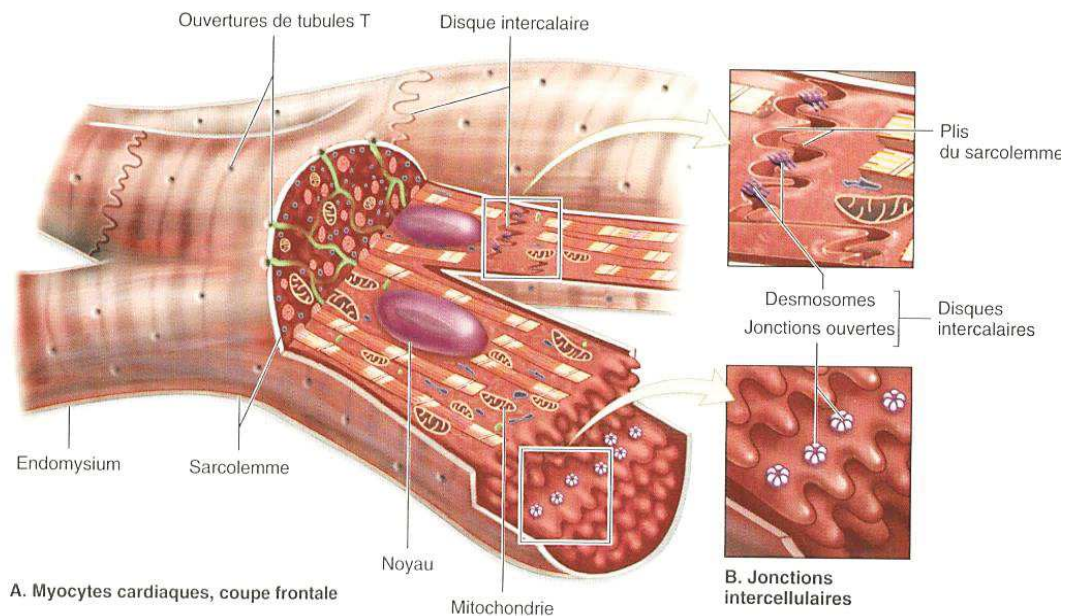


Figure H3 : Représentation d'une coupe de cardiomyocyte montrant les différentes jonctions intercellulaires. Ces jonctions sont localisées au niveau du sarcolemme, membrane de la cellule musculaire. www.coeuretmaladiescoronariennes.wordpress.com

1.1.3 Le sarcolemme

Le sarcolemme (membrane du cardiomyocyte) s'invagine pour former les tubules T qui rejoignent le réticulum sarcoplasmique. Ces tubules T sont en contact aussi avec le sarcomère. Le sarcomère est composé essentiellement de trois types de protéines : la myosine (de type 2 ayant majoritairement l'isoforme β pour la chaîne lourde chez l'homme « *Myosin Heavy Chain MHC* ») formant les filaments épais, l'actine (isoforme α) formant les filaments fins et la plus grosse protéine, la titine (isoforme N2B et N2BA), protéine de connexion (Yin *et al.*, 2015). Ces protéines sont « enchevêtrées » les unes dans les autres suivant une organisation précise. Chaque sarcomère est délimité par les lignes Z (stries Z ou disque Z) de chaque côté, auxquelles s'attachent la titine et l'actine, formant une bande I. La myosine est liée à la titine et forme la bande A. Lorsque le sarcomère est contracté, la ligne M s'observe au centre (**Figure H4**). L'ensemble des sarcomères constitue les myofibrilles.

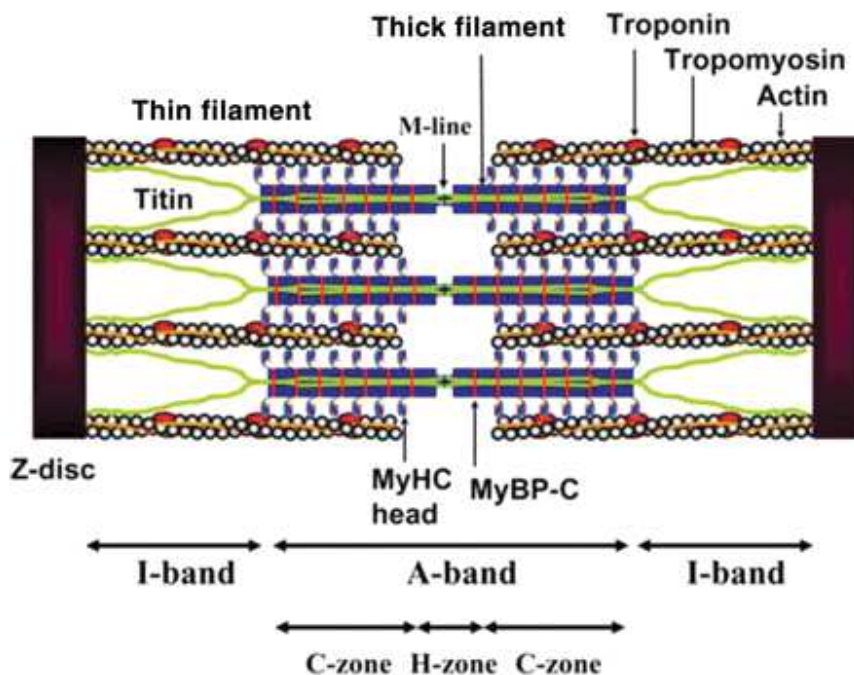


Figure H4 : Schéma montrant la structure d'un sarcomère.

La tropomyosine s'enroule autour des filaments d'actine formant une double hélice sur laquelle s'attache la troponine. La myosine à chaîne lourde est traversée transversalement par des bandes de « Myosin Binding Protein » (MyBP). La titine s'étend de la ligne Z jusqu'à la ligne M. D'après (Morimoto, 2008)

1.1.4 Cycle cardiaque

Le cycle cardiaque comporte quatre phases, à savoir deux lors de la systole (contraction) et deux lors de la diastole (relaxation). Pendant la phase 1, la valve mitrale est fermée ainsi que la valve aortique : c'est la fin du remplissage qui marque la fin de diastole (télédiastole). L'arrivée de l'onde de dépolarisation déclenche à ce moment la contraction ventriculaire avec augmentation de la pression dans la cavité sans variation de son volume : c'est la systole isovolumique. Pendant la phase 2, la contraction ventriculaire se poursuit et la pression dans les ventricules devient supérieure à celle dans l'aorte. Cette différence de pression provoque l'ouverture passive, mais rapide, des valvules sigmoïdes (aortiques) ; ce qui permet l'éjection du sang dans l'aorte. À la fin de la contraction, la pression ventriculaire diminue, ainsi, les valvules aortiques se referment puisque la pression aortique devient supérieure à celle du ventricule. Pendant la phase 3, alors que la systole est terminée, la valve mitrale reste fermée. La diastole débute et c'est la phase de

relaxation isovolumique pendant laquelle la pression baisse sans changement de volume. Cette baisse de pression dépend de la capacité du ventricule à se relâcher : plus le ventricule se relâche facilement (grande compliance), plus la pression diminue rapidement. La différence de pression qui se crée de part et d'autre de la valve mitrale provoque ainsi son ouverture et le remplissage débute. C'est la quatrième phase du cycle. La phase de remplissage comprend 3 étapes successives qui permettent de ramener le ventricule en télédiastole. La majeure partie du remplissage est rapide et s'effectue brusquement suite à la différence de pression qui provoque l'ouverture de la valve mitrale. Le sang pénètre alors dans le ventricule qui est dans un état de relaxation complète. La valve se referme alors partiellement, c'est le premier remplissage passif. Il s'ensuit une étape de remplissage lent (« *diastasis* ») qui est raccourcie, voire absente, lorsque la fréquence cardiaque augmente. La contraction auriculaire survient à la fin de cette période pour terminer le remplissage, provoquant une faible augmentation de la pression ventriculaire. La valve mitrale s'ouvre avant sa fermeture définitive accompagnant l'augmentation de la vitesse du flux sanguin. Lorsque la pression atteint 8 mm Hg (cœur sain) pendant la télédiastole, un nouveau cycle recommence (**Figure H5**).

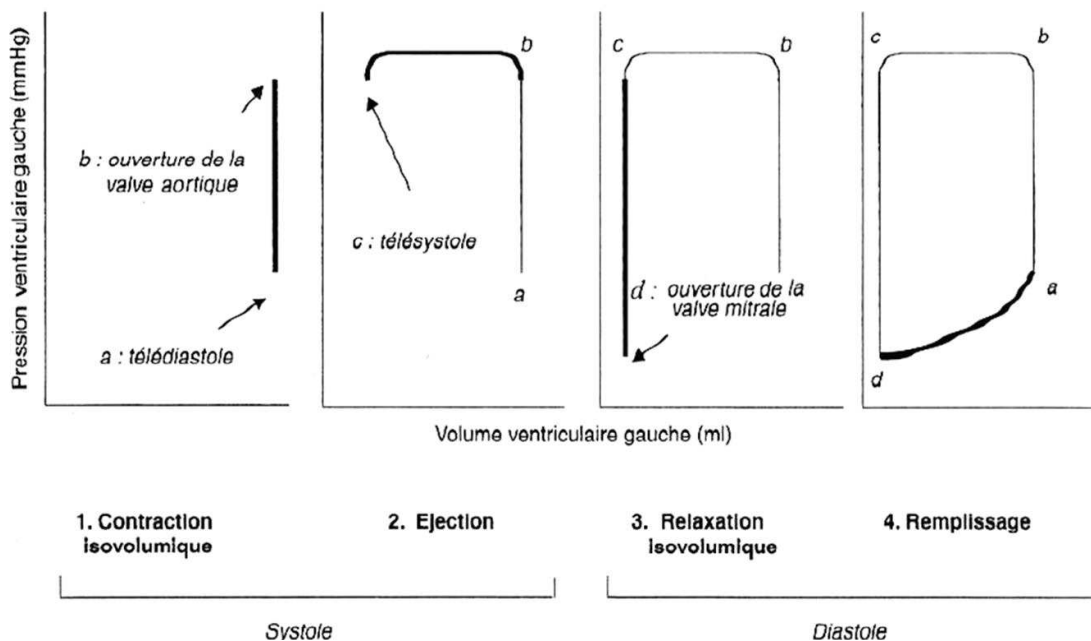


Figure H5 : Illustration des quatre phases du cycle cardiaque représentant la variation pression-volume. D'après « Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux © 2007, John Libbey EUROTTEXT, Paris » (Libbey, 2007).

1.2 Activité électrique du cœur

1.2.1 Potentiel d'action cardiaque

Les cellules cardiaques sont des cellules excitables. Leurs membranes plasmiques permettent la propagation du PA grâce à la présence de nombreux canaux ioniques à leur surface. Le potentiel membranaire de repos a été enregistré pour la première fois en 1949, sur des fibres de Purkinje du cœur du chien, par Edouard Corabœuf et Silvio Weidmann ayant une valeur aux alentours de -90 mV.

La stimulation de la membrane provoque une dépolarisation transitoire du potentiel de membrane nommée potentiel d'action. Le PA résulte de la sommation de flux ioniques entrants et sortants du cardiomyocyte à travers les différents canaux ioniques, ayant chacun des propriétés spécifiques leur permettant d'intervenir à des niveaux différents du PA. Le PA cardiaque présente une forme différente suivant les niveaux myocardiques et sa conduction est assurée par le faisceau de His (**Figure H6**).

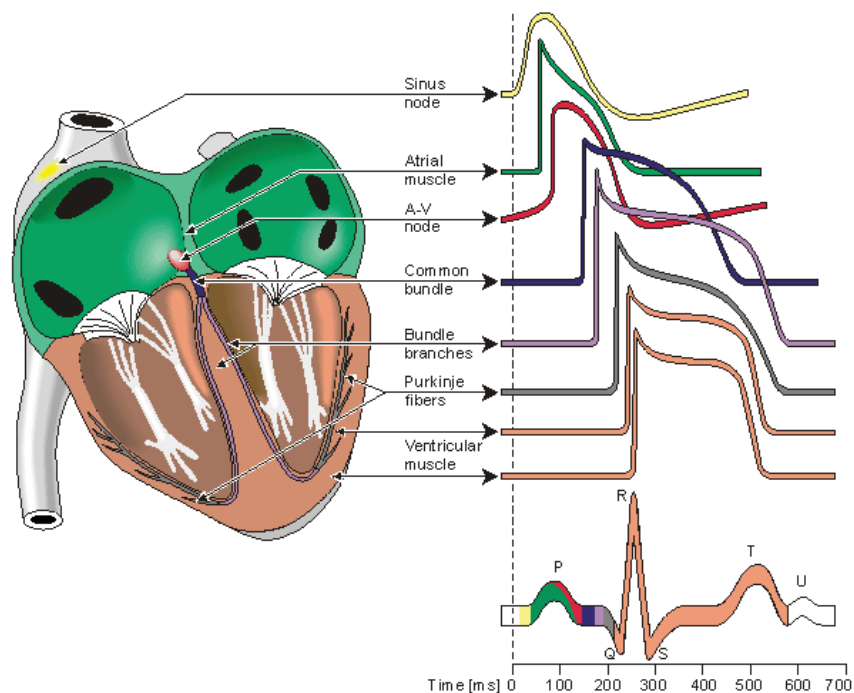


Figure H6 : Différents potentiels d'action typiques enregistrés au sein du cœur, allant du nœud sinusal jusqu'au cardiomyocyte ventriculaire. Figure d'après <http://www.bem.fi/book/06/06.htm>

Le PA ventriculaire comporte 5 phases (**Figure H7**) :

Phase de dépolarisation (ou phase 0) : cette phase correspond à l'ouverture des canaux sodiques rapides et les canaux calciques lents. (Klabunde, 2017) ; *Text book of medical physiology, Arthur C. Guyton and John E. Hall, 11th edition* (Guyton and Hall).

Phase de repolarisation rapide (ou phase 1) : suite à la phase de dépolarisation, la cellule subit une repolarisation rapide due à une sortie des ions K^+ par les canaux potassiques spécifiques qui s'ouvrent, et, éventuellement, à la fermeture des canaux sodiques lents (Nerbonne and Kass, 2005; Grant, 2009; Schmitt *et al.*, 2014).

Phase du plateau (ou phase 2) : l'influx continu des ions Ca^{2+} par les canaux calciques de type L vers l'intérieur maintient un état dépolarisé prolongé ce qui provoque la phase du plateau du PA (*Text book of medical physiology, Arthur C. Guyton and John E. Hall, 11th edition*).

Phase de repolarisation (ou phase 3) : lorsque ces canaux calciques commencent à se fermer, un autre type de canal potassique s'ouvre (Nerbonne and Kass, 2005; Grant, 2009; Schmitt *et al.*, 2014). La réduction des courants calciques entrants et l'augmentation des courants potassiques vers l'extérieur provoquent la repolarisation.

Retour au potentiel de repos (phase 4) : le retour au potentiel de repos est maintenu par les canaux potassiques qui sont ouverts pendant le potentiel de repos. Il est à noter que les cardiomyocytes ne subissent pas d'hyperpolarisation car ils sont hyperpolarisés au repos.

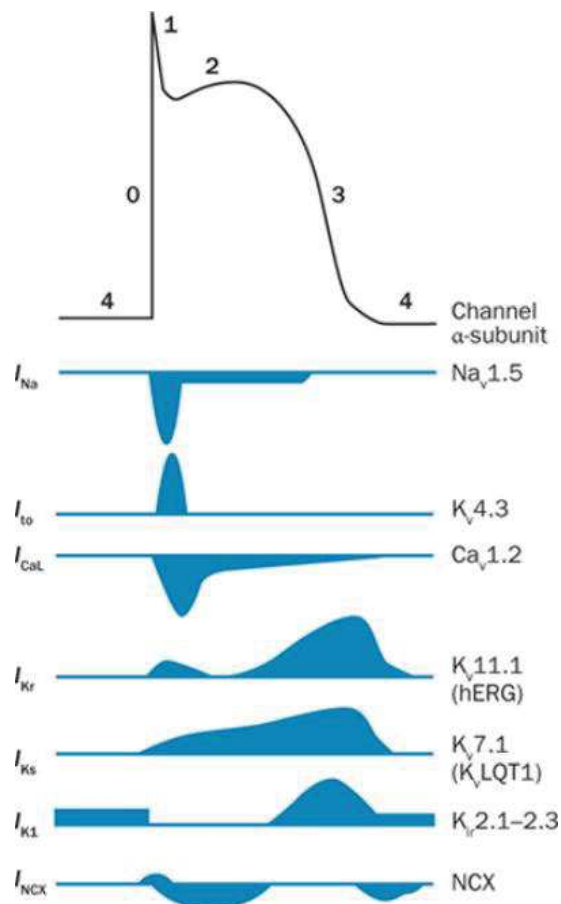


Figure H7 : Illustration montrant le PA cardiaque d'un cardiomyocyte (non-pacemaker).

Le potentiel de repos (phase 4), est généré principalement par le courant ionique sortant (I_{K1}), dû à la perméabilité membranaire aux ions K^+ , aussi impliqué dans la phase de repolarisation tardive. I_{Na} représente le courant sodique responsable de la phase de dépolarisation rapide du PA. Comme déjà décrit, une repolarisation rapide est due à la sortie des ions K^+ induisant le courant I_{K0} . La dépolarisation est maintenue grâce à l'entrée continue des ions Ca^{2+} , courant $I_{Ca(L)}$ provoquant la phase de plateau (Liu *et al.*, 2016).

1.2.2 Les canaux ioniques cardiaques

Un canal ionique est décrit principalement comme un pore traversant la bicouche phospholipidique membranaire permettant la diffusion des ions selon leur gradient de concentration. Cette diffusion dépend du diamètre du pore et des ions qui le traversent ainsi que des interactions avec les parois du pore et avec d'autres ions présents dans le canal. Les canaux ioniques sont activés différemment ; soit par le potentiel, soit par les ions, soit par les récepteurs, soit par les protéines

(G ou kinases) ou suite à des stimuli physiques et chimiques. De ce fait, il existe une diversité de canaux ioniques due aux différents modes d'activation et de modulation.

Dans cette partie, nous allons décrire les canaux voltage-dépendants impliqués dans la genèse et la propagation du PA cardiaque.

Canaux Na⁺ voltage-dépendants : Leur rôle principal étant la genèse du PA, les canaux Na⁺ sensibles au potentiel sont présents principalement dans les membranes des cellules excitables, notamment les neurones et les cellules musculaires. Cependant, il est à noter que les canaux Na⁺ du système nerveux, du cœur et des muscles squelettiques sont différents par certaines propriétés pharmacologiques et sont codés par des gènes différents. Neuf isoformes du canal Na⁺ ont été caractérisés (Nav1.1 – Nav1.9) et une dixième isoforme (Na_x) a été identifiée fonctionnant probablement comme étant un canal Na⁺ (Yu and Catterall, 2003). La protéine canal correspond à un complexe composé d'une sous-unité α primaire, qui forme le pore conducteur, associée à une ou plusieurs sous-unités β secondaires. La sous-unité α du canal présentent quatre domaines (I-IV), qui sont similaires l'un à l'autre et contiennent six segments transmembranaires α -hélicoïdaux (S1-S6). Dans chacun des domaines, le segment S4 contient un acide aminé chargé positivement en troisième ou quatrième position agissant comme le capteur du potentiel transmembranaire (Yu and Catterall, 2003; Grant, 2009) (**Figure H8**). La boucle P entre S5 et S6 de chaque domaine se plie vers la membrane formant ainsi le pore. Plusieurs acides aminés sont essentiels pour déterminer la sélectivité et la perméabilité ionique du canal : l'aspartate, le glutamate, la lysine et l'alanine. Cependant la lysine dans le domaine III est cruciale pour la sélectivité ionique du canal. Chez l'homme, le Nav1.5 est exprimé dans le cœur. Les canaux sodiques s'ouvrent très brièvement (<1 ms) pendant plus de 99% des dépolarisations. Le courant I_{Na} généré par le canal Na⁺ (Nav1.5) est responsable de l'initiation du PA et est enregistré dans la phase 0 du potentiel au niveau des oreillettes et des ventricules mais absent dans les cellules *pacemaker* (du tissu nodal).

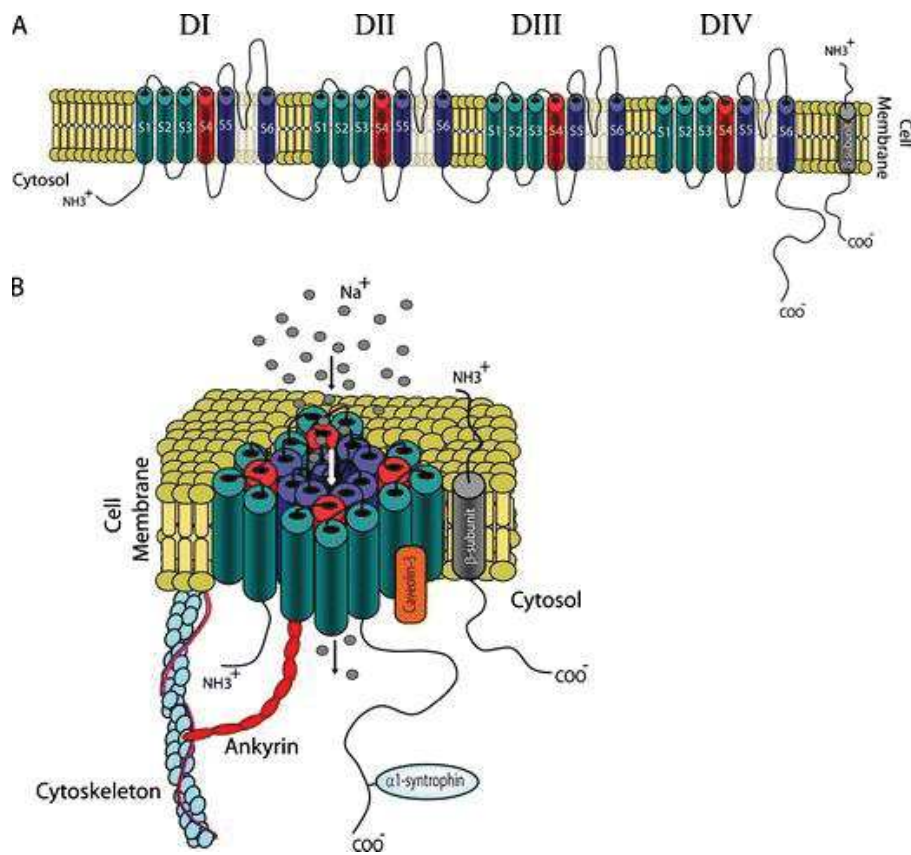


Figure H8 : Structure moléculaire du canal sodique cardiaque.

(A) une illustration de la sous-unité α (Nav1.5) et de la sous-unité β du canal sodique cardiaque. Nav1.5 est constitué de quatre domaines (DI-DIV) contenant chacun six segments transmembranaires (S1-S6) ; Les segments S4 sont chargés positivement et agissent comme des capteurs de tension. La sous-unité β est constituée d'un seul segment transmembranaire. (B) Les quatre domaines de Nav1.5 se replient autour du pore conducteur d'ions, qui est bordé par les boucles entre les segments S5 et S6. L'expression et la fonction de Nav1.5 sont régulées par des sous-unités β et plusieurs protéines régulatrices interagissant directement ou indirectement avec le canal (Amin *et al.*, 2010).

Canaux Ca^{2+} voltage-dépendants : les ions Ca^{2+} sont les principaux ions de signalisation intracellulaire. Ils régulent le couplage excitation-contraction, la sécrétion et l'activité de nombreuses enzymes et canaux ioniques. Les canaux Ca^{2+} sont alors le principal portail d'entrée de Ca^{2+} dans les cellules. Deux types de canaux coexistent principalement dans les membranes des cellules cardiaques. Le premier type regroupe les canaux de type T pour « transient » ou « LVA »

pour « low voltage-activated » qui s'activent à des potentiels relativement négatifs et qui s'inactivent rapidement d'une manière dépendante du voltage (Reuter, 1979; Tsien, 1983). Le second type regroupe les canaux qui s'activent à des potentiels moins négatifs et qui s'inactivent très lentement, appelés canaux de type L pour « long lasting » qui font partie des canaux « HVA » pour « High voltage-activated » (Carbone and Lux, 1984; Nowycky *et al.*, 1985). D'autres canaux à haut seuil ont été décrits et sont distingués par leurs propriétés pharmacologiques : les canaux de type N, Q et R essentiellement trouvés dans les membranes des neurones, les canaux de type P exprimés au niveau des cellules de Purkinje. Cinq sous-unités α_1 , α_2 , β , γ et δ forment le canal. Les canaux Ca^{2+} ont une structure similaire au canal Na^+ : quatre domaines homologues composés chacun de 6 segments transmembranaires (S1-S6), chargés positivement au niveau du S4 jouant ainsi le rôle de détecteur de potentiel. La boucle membranaire existant entre le S5 et le S6 de chaque domaine contient des résidus glutamate essentiels pour la sélectivité au calcium et pour la structure du pore (**Figure H9**). Il existe plusieurs sous-unités α_1 . Les canaux Ca^{2+} cardiaques de type L présentent trois isoformes, $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, et $\text{Ca}_v1.3$ et les canaux Ca^{2+} cardiaques de type T, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, et $\text{Ca}_v3.3$ (Grant, 2009; Catterall, 2011). C'est durant la phase 2 du PA ventriculaire que les canaux Ca^{2+} sont activés. Les canaux de type T ($\text{Ca}_v3.1/3.2$) sont exprimés essentiellement au niveau du nœud sino-atrial, au niveau des oreillettes et des cellules de Purkinje. Les canaux de type L ($\text{Ca}_v1.2$) sont exprimés au niveau de tous les types de cardiomyocytes.

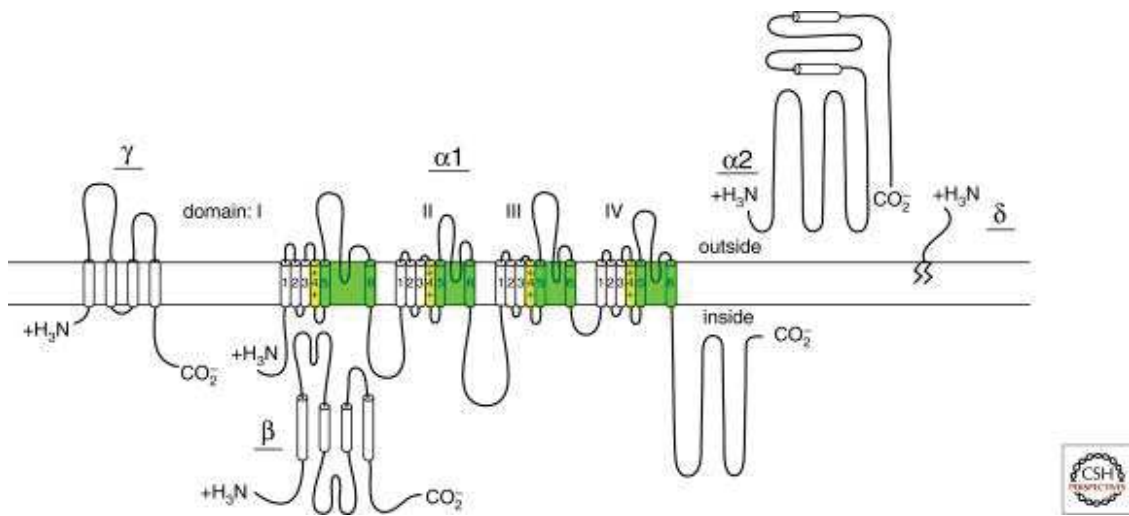


Figure H9 : Structure des sous-unités du canal calcique.

Les sous-unités du canal sont représentées par des plis transmembranaires. La sous-unité α_1 est composée de quatre domaines constitués chacun de 6 segments transmembranaires. Les hélices de la sous-unité du canal sont représentées sous forme de cylindres. Les segments S4, chargés positivement, jouent le rôle de détecteur de potentiel. La ligne zigzag sur la sous-unité δ illustre son ancrage glycophosphatidyl-inositol. Figure d'après (Catterall, 2011)

Canaux K^+ voltage-dépendants : exprimés dans toutes les cellules eucaryotes, les canaux K^+ sont très divers encore plus que les canaux Na^+ et Ca^{2+} . La classification dépend essentiellement de la séquence des acides aminés au niveau de la sous-unité α . Selon les isoformes, les sous-unités α sont formées soit de six, soit de quatre, soit de deux segments transmembranaires associés à plusieurs sous-unités β (Shieh *et al.*, 2000) (**Figure H10**). Pour les canaux K^+ voltages-dépendants, la sous-unité α contient six régions transmembranaires (S1–S6). Le segment S4 est riche en résidus chargés positivement sensibles à la variation du potentiel. Les canaux présents au niveau cardiaque se subdivisent en trois catégories parmi lesquelles figurent les canaux K^+ voltages dépendants. Il existe plusieurs isoformes exprimés au niveau du cœur et responsables de quatre courants : I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , et I_{Ks} . Pendant la phase 1 du potentiel, le courant I_{to} (rapide et lent) s'active au niveau des canaux K^+ ($K_v4.2/4.3$) et ($K_v1.4/1.7/3.4$). Au niveau des oreillettes, un courant supplémentaire appelé I_{Kur} contribue à la repolarisation précoce (ou rapide). La phase 3 de repolarisation est souligné par trois courants potassiques différents appelés I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1} qui sont voltage-dépendants ; I_{kr} est conduit par $K_v11.1$ et I_{ks} est conduit par $K_v7.1$. Le courant I_{k1} est un courant

rectifiant entrant (ir : *inward rectifier*) conduit par le canal K_{ir} 2.1/2.2. En outre, il existe un courant $I_{K_{Ach}}$ induit par (K_{ir} 3.1/3.4) ayant un rôle essentiel dans les oreillettes (sinus sino-atrial) mais aussi dans les ventricules et faisant partie des canaux modulés par les protéines G. D'autres canaux potassiques sont exprimés dans les myocytes cardiaques. Ce sont les canaux activés par les ions tels que les K_{Ca} activés par le Ca^{2+} intracellulaire, les K_{Na} activés par le Na^{+} intracellulaire (Grant, 2009).

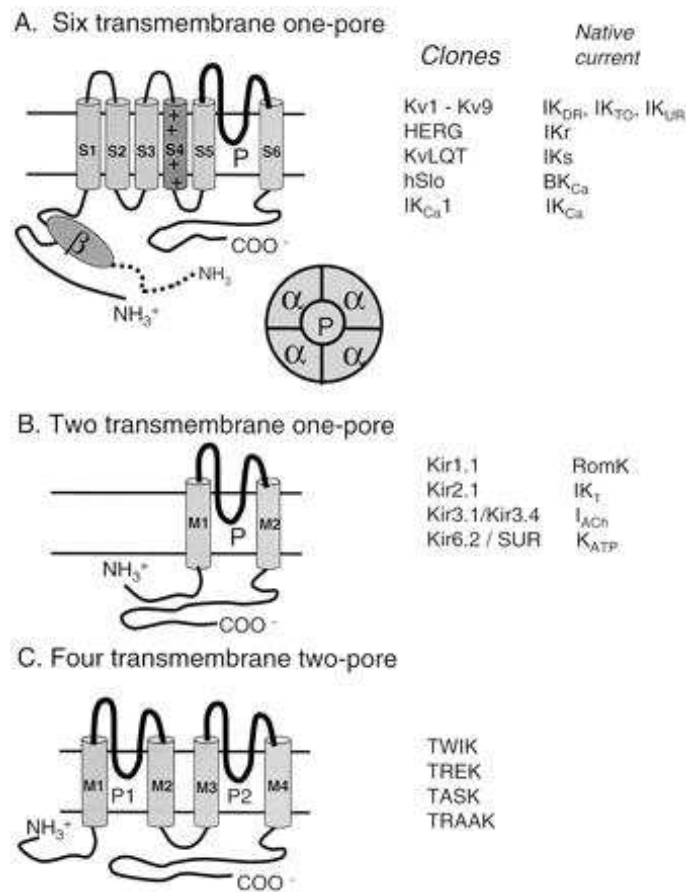


Figure H10 : Représentation schématique de la classification structurale des sous-unités des canaux potassiques.

Les canaux voltage-dépendants sont constitués de quatre domaines (sous-unités) contenant six segments transmembranaires (S1-S6) et un pore (P) situé entre S5 et S6 avec un capteur de tension (charge positive des résidus d'acides aminés) situé au S4. Certains des canaux voltage-dépendants comprennent une sous-unité β auxiliaire ($Kv\beta$), qui est une protéine cytoplasmique avec un site de liaison situé à l'extrémité N-terminale de la sous-unité α . Le canal K^{+} rectifiant entrant appartient

à une superfamille de canaux avec quatre sous-unités contenant chacune deux segments transmembranaires (M1 et M2) avec une boucle P entre les deux. Figure d'après (Shieh *et al.*, 2000).

1.3 Couplage excitation-contraction

1.3.1 Mécanisme

L'arrivée du PA au niveau des cardiomyocytes induit leur contraction par un mécanisme appelé : couplage excitation-contraction (CEC). Ce dernier regroupe l'ensemble des événements qui permettent la transformation du signal électrique en un signal intracellulaire engendrant la contraction des cardiomyocytes.

Lors de la dépolarisation membranaire, l'entrée du Ca^{2+} à travers les canaux calciques de type L (appelés aussi DHPR pour récepteur dihydropyridines), situés sur les tubules T, va induire la libération du Ca^{2+} intracellulaire à travers les récepteurs à la ryanodine (RyR) exprimés à la surface du (RS) (Bers, 2002) (**Figure H11**). Ce mécanisme est appelé « *calcium-induced calcium-release* » (CICR) (Fabiato, 1983). En effet, les ions Ca^{2+} entrant, insuffisants pour induire la contraction, activent l'ouverture du canal calcique du RS, le RyR, et par suite la libération du Ca^{2+} du RS. Ceci crée ce qu'on appelle les « *calcium sparks* » au niveau de la région située entre le RS et les canaux de type L (Eisner *et al.*, 2017). Ainsi, cette libération de Ca^{2+} induit une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique. Effectivement, une concentration de $\approx 1 \mu\text{M}$ produit une contraction en activant les protéines contractiles (Eisner *et al.*, 2017).

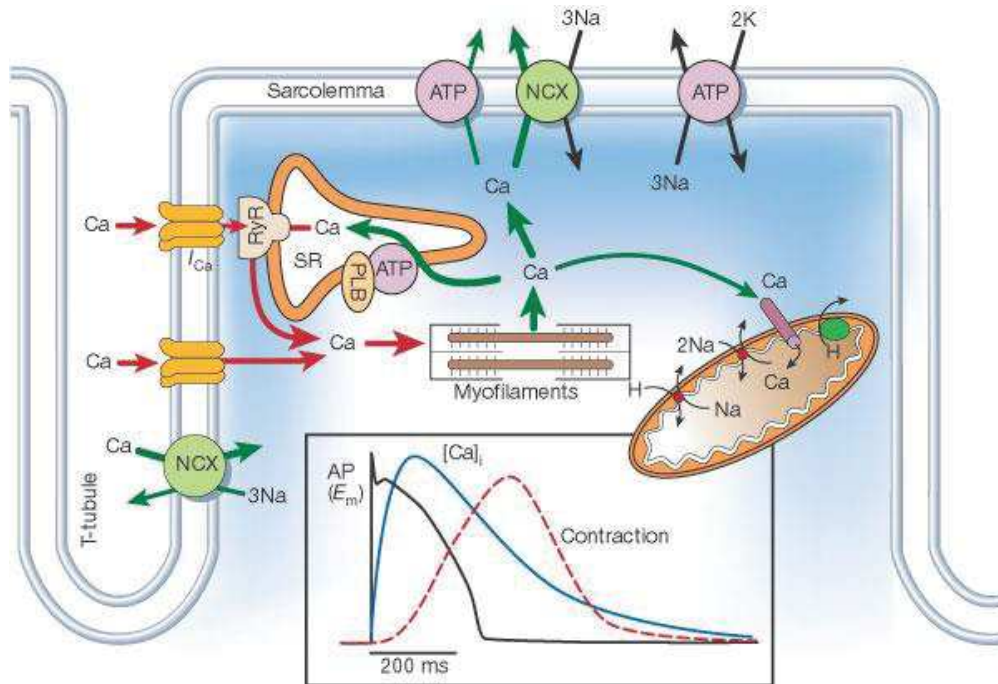


Figure H11 : Couplage excitation-contraction du cardiomyocyte ventriculaire.

La dépolarisation manifestée par l'ouverture des canaux Na^+ induit l'ouverture des canaux calciques permettant l'entrée des ions Ca^{2+} . Cette entrée déclenche la libération du Ca^{2+} du RS via RyR. Les ions Ca^{2+} ainsi libérés se fixent sur les myofilaments déclenchant la contraction des cardiomyocytes. Le retour des ions calcium vers le RS et leur extrusion vers l'extérieur de la cellule sont assurés par la pompe SERCA2a et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, respectivement. D'après (Bers, 2002).

Les ions Ca^{2+} se fixent sur la troponine C du complexe troponine-tropomyosine induisant un changement de la conformation du complexe. En effet, il existe trois sous-unités de la troponine : troponine C (cTnC), la troponine I (cTnI) et la troponine T (cTnT). La troponine I agit comme inhibiteur du complexe, en interagissant avec la tropomyosine en absence du Ca^{2+} elle empêche la liaison entre l'actine et la myosine et par suite la contraction (ter Keurs, 2012). En présence de Ca^{2+} lié à la troponine C, le changement conformationnel généré permet la formation des ponts d'actine et de myosine et, par suite, le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction cellulaire (**Figure H12**). La troponine T assure la liaison du complexe à la tropomyosine et confère aux myofilaments leur activité ATPase Ca^{2+} dépendante permettant l'hydrolyse de l'ATP et ainsi la production de l'énergie nécessaire au CEC (ter Keurs, 2012).

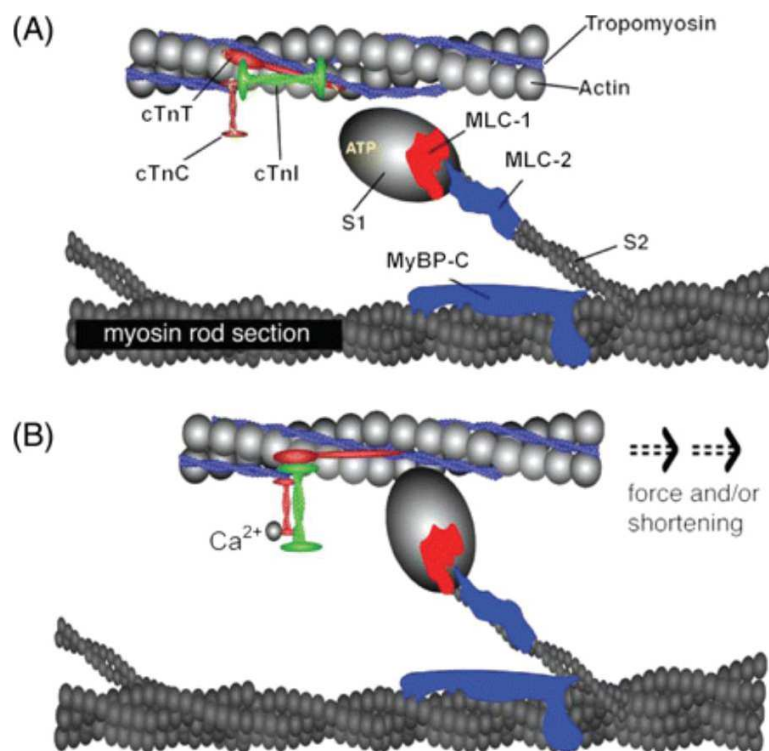


Figure H12 : Représentation schématique du sarcomère durant la diastole (A) et durant la systole (B).

L'actine, la tropomyosine et le complexe de troponine forment le filament fin alors que la myosine (constituée de la tête globulaire, le dimère S1 et de la tige S2) forme le filament épais. Le dimère S1 contient le site de liaison à l'actine et le site actif de l'ATPase permettant la production de l'énergie nécessaire pour la contraction (Hamdani *et al.*, 2008).

La relaxation se produit lorsque la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme diminue. Le Ca^{2+} libéré par la troponine C est pompé vers le RS par la pompe SERCA2a et emmené à l'extérieur de la cellule essentiellement par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Bers *et al.*, 2006) ou la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique.

Dans ce qui suit, nous allons parler d'une façon plus détaillée des acteurs moléculaires de la contraction et ceux de la relaxation.

1.3.2 Les acteurs moléculaires de la contraction :

Les canaux calciques de type L (LTCC) : Comme déjà décrit précédemment dans la partie « Les canaux ioniques cardiaques », les canaux de type L activés par le voltage sont présents, via différentes isoformes. La sous-unité α_1 forme le pore de perméabilité. Les sept types de la sous-unité α_1 , composante centrale du complexe, codés par sept gènes différents donnent naissance aux isoformes $Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$ et $Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$. Bien qu'on trouve les $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, et $Ca_v1.3$ dans le cœur, dans les conditions physiologiques, seulement $Ca_v1.2$ serait exprimé et ayant la sous-unité α_{1C} . La sous-unité β associée à α_{1C} est située sur la face cytoplasmique de la membrane liée à la boucle entre les domaines I et II. Elle module l'expression et les propriétés de α_{1C} . D'autre part, la sous-unité α_{1C} est régulée par la Calmoduline (CaM), protéine Ca^{2+} dépendante responsable de la modulation de l'activité du canal : en effet, les canaux LTCC subissent des phénomènes de facilitation et d'inactivation Ca^{2+} dépendantes via le senseur calcique qui est la Calmoduline. Les sous-unités $\alpha_2\delta$ et γ sont moins connues, α_2 constitue la partie N-terminale et δ la partie C-terminale. $\alpha_2\delta$ semblent contribuer à l'adressage de α_1 à la membrane.

De point de vue pharmacologique, les dihydropyridines regroupent des molécules agonistes (Bay K 8644) ou antagonistes (nifédipine, nitrendipine) aux canaux calciques. Ainsi, les canaux calciques sont nommés aussi récepteurs des dihydropyridines (DHPR).

La concentration en Ca^{2+} du milieu extracellulaire est supérieure à celle du milieu intracellulaire. C'est le premier facteur qui permet l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule à travers les LTCC. L'activation du canal dépend du segment S4 ; la dépolarisation membranaire induit le déplacement des charges au niveau du S4 induisant à son tour le changement conformationnel nécessaire à l'ouverture du canal.

Le RyR2 : La quantité de Ca^{2+} qui entre de l'extérieur dans le cardiomyocyte via les LTCC est insuffisante pour initier la contraction cellulaire. Elle est suivie d'une libération intracellulaire du Ca^{2+} stockée dans le RS via le RyR. Les RyR sont les plus grands canaux ioniques connus (> 2MDa) et existent sous trois isoformes (RyR 1-3) mais seul l'isoforme RyR2 est exprimé dans le tissu cardiaque (Nakai *et al.*, 1990; Otsu *et al.*, 1990). RyR1 a été détecté pour la première fois dans le muscle squelettique (Takeshima *et al.*, 1989; Zorzato *et al.*, 1990) et RyR3 dans le cerveau (Hakamata *et al.*, 1992). Le canal est nommé d'après un alcaloïde végétal la « Ryanodine » qui a permis son identification grâce à l'affinité élevée qu'elle lui présente (Takasago *et al.*, 1989). À de faibles concentrations (de l'ordre de nM), la Ryanodine bloque le canal dans un état semi ouvert

qui peut éventuellement vider le RS, cependant à des fortes concentrations ($> 100 \mu\text{M}$), la Ryanodine inhibe irréversiblement le canal (Fleischer *et al.*, 1985; McGrew *et al.*, 1989). Toutes les isoformes sont des homotétramères comportant des sous-unités de taille supérieure à 550 KDa. L'extrémité C-terminale du monomère forme le pore du canal, tandis que l'extrémité N-terminale est intégrée dans le domaine cytoplasmique et constitue un grand site d'interactions avec d'autres modulateurs de RyR (**Figure H13**).

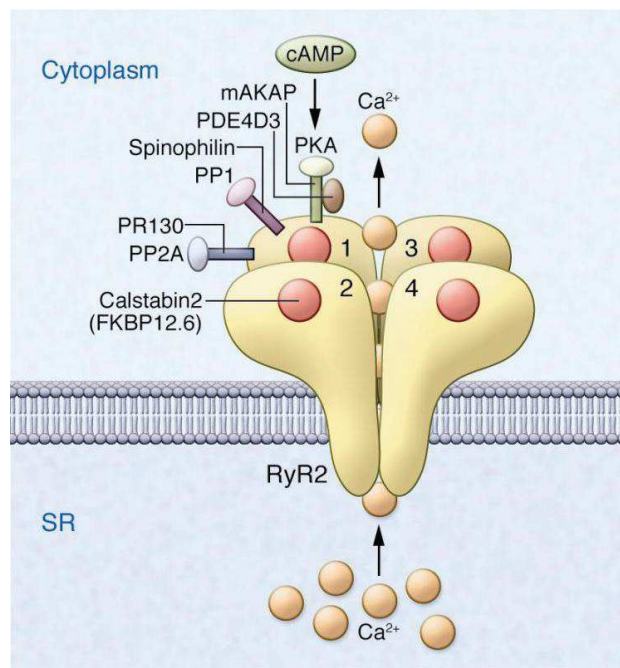


Figure H13 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire RyR2 comprenant quatre sous-unités identiques (numérotées de 1 à 4).

Chaque sous-unité est liée au FKBP12.6 (ou la calstabin2) ainsi qu'à mAKAP, auxquelles les sous-unités catalytiques et régulatrices de PKA et PDE4D3 sont liés (Marks, 2013).

Le RyR2, avec Cav_{1.1} / Cav_{1.2}, CaM, PKA, CaMKII, FKBP12 et 12.6, PDE4D3, PP1 et PP2a, triadine, jonctine, et calsequestrine forment le noyau du complexe macromoléculaire qui régule la libération du Ca²⁺ du RS. Ainsi, la structure du RyR, sa fonction et sa régulation sont plutôt définies dans ce complexe macromoléculaire d'interactions. La plupart des modulateurs du RyR2 interagissent avec la région cytoplasmique de la chaîne, ce qui suggère qu'ils régulent le canal de manière allostérique (Lanner *et al.*, 2010).

- La Calmoduline (CaM): La Calmoduline est une protéine ubiquitaire dont l'activité nécessite la liaison aux ions Ca^{2+} , d'où son nom, *calcium modulated protein*. Elle comporte quatre motifs en main EF (deux au niveau N-terminal et deux au niveau C-terminal). Les trois isoformes de RyR se lient et sont régulées par la CaM. Dans le muscle cardiaque, la CaM augmente le seuil d'activation de RyR2 à des concentrations de Ca^{2+} plus élevées et diminue donc l'ouverture de RyR2 à toutes les concentrations de Ca^{2+} (Balshaw *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2003). Récemment, la diminution de l'affinité de la CaM au RyR2 accompagnée d'une phosphorylation par la PKA a été démontré dans un modèle de souris CPVT (« *Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia* ») produisant des événements calciques anormaux et engendrant des arythmies létales (Xu *et al.*, 2010).

Indépendamment de la CaM, un certain nombre de protéines présentant des motifs en main EF, ont été reconnues pour interagir et réguler RyR, y compris la caluménine et S100A1 (Jung *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008). S100A1 a été décrite pour sa capacité de rentrer en compétition avec la CaM pour se lier au RyR.

- PKA et CaMKII: L'importance de la phosphorylation du RyR dans la modulation de la libération de Ca^{2+} du RS a d'abord été établie dans le cœur (Takasago *et al.*, 1989). Le résidu Ser2808 de RyR2 a été décrit pour la première fois comme un site de phosphorylation de CaMKII, mais il a été démontré plus tard que PKA et PKG phosphorylent également ce site (Witcher *et al.*, 1991; Rodriguez *et al.*, 2003; Wehrens *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006; Huke and Bers, 2007). Ser2814, cependant, semble seulement être phosphorylée par CaMKII alors que Ser2030 est seulement phosphorylée par PKA (Wehrens *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006). L'activation de la PKA via la stimulation des récepteurs β adrénergiques permet la phosphorylation du RyR qui induit un changement fonctionnel dans le canal. Ce changement est associé à une augmentation de fuite calcique du RS à travers le RyR2 dans le cœur ; ce qui peut contribuer à une diminution de la force contractile et une augmentation des arythmies. L'altération de la phosphorylation du RyR2 est aussi liée au dysfonctionnement du RyR. En effet, une hyperstimulation adrénergique survenant dans l'insuffisance cardiaque ou lors d'un stress conduit à une hyperphosphorylation, suggérant qu'elle est responsable de la dissociation de FKBP de

RyR2 produisant des canaux susceptibles d'ouvrir au repos et ainsi une fuite de Ca^{2+} réduisant le contenu du RS (Reiken *et al.*, 2003). Ces observations peuvent être attribuées aussi à la phosphorylation par la CaMKII : plusieurs études ont montré que la réduction de la charge du RS et la fuite à travers le RyR2 dans les cœurs défaillants résultent de la phosphorylation de RyR2 par la CaMKII (Neef *et al.*, 2010).

- FK506 Binding protein FKBP12 et 12.6 : Ces deux protéines, appelées aussi Calstabin 1 et 2, respectivement, appartiennent à la famille des protéines ayant une séquence hautement conservée. Elles sont connues pour leur capacité à se lier à un immunosuppresseur, le FK506, et sont impliquées dans plusieurs mécanismes tels que le repliement des protéines, la signalisation, la transcription et autres. Elles interagissent avec les trois isoformes de RyR avec une affinité différente dans les différents tissus. La FKBP 12.6 est liée au RyR2 dans le cœur et interagit avec le canal au niveau des régions N et C terminal (Masumiya *et al.*, 2003). La FKBP12 est exprimée plus fortement dans le muscle squelettique. Dans les conditions physiologiques, les FKBP se lient au RyR pour le maintenir dans un état fermé (Ahern *et al.*, 1994; Brillantes *et al.*, 1994). Cependant, la FKBP12.6 assure la libération synchronisée du Ca^{2+} pendant le CEC.
- La phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3) : Un autre régulateur du RyR2 ; c'est une protéine à activité enzymatique qui permet l'hydrolyse de l' AMP_C réduisant ainsi sa concentration locale à côté du RyR2 et influencent l'activité de la PKA dont elle est dépendante (Zaccolo and Pozzan, 2002). La PDE4D3 est accrochée au RyR2 à travers la mAKAP, « *muscle-specific A-kinase anchoring protein* ».
- La protéine phosphatase 1 et 2a (PP1 et PP2a) : Ces deux protéines régulent l'activité du RyR2 en inversant les effets des kinases. Elles déphosphorylent le canal et permettent de réduire, comme la PDE4D3, la concentration en AMP_C . Elles sont liées au RyR2 par leurs protéines d'ancrage respectives, la spinophiline et la PR130. La PP1 est exprimée plus fortement dans le cœur et déphosphoryle les résidus sérines 2808 et 2814 du RyR2 (Strack *et al.*, 1997).

- La Calsequestrine (CSQ), la Triadine, la Jonctine : Ces protéines régulent le RyR dans sa face interne de la membrane du RS contrairement aux autres protéines qui sont situées dans la partie cytoplasmique. Il existe deux types de CSQ : la CSQ1 est exprimée dans les muscles squelettiques alors que la CSQ2 est exprimée dans le cœur. Les études ont montré que la CSQ2 augmente la probabilité d'ouverture de RyR2 (Wei *et al.*, 2009). En effet, au niveau du muscle cardiaque, la CSQ2 qui est un chélateur calcique, séquestre le Ca^{2+} jusqu'à reconstitution des stocks calciques du RS. Une fois la concentration calcique nécessaire est atteinte, le flux du Ca^{2+} à travers le RyR2 est facilité, permettant ainsi une activation plus rapide de la contraction. Cette protéine est accompagnée de la Triadine et de la Jonctine qui d'une part, assurent l'interaction directe de la CSQ2 avec le RyR2, et d'autre part, permettent l'ancrage du RyR2 à la membrane du RS.

1.3.3 Les acteurs de la relaxation :

Avec chaque battement cardiaque et l'entrée du Ca^{2+} à travers les canaux calciques, le Ca^{2+} est libéré du RS via le RyR2 augmentant la concentration du Ca^{2+} cytosolique et activant la concentration du muscle cardiaque. Le Ca^{2+} est ensuite pompé dans le RS grâce à SERCA et extrudé vers le milieu extracellulaire, diminuant ainsi la concentration du Ca^{2+} cytosolique la ramenant aux valeurs basales provoquant la relaxation. Cette recapture est assurée par deux acteurs essentiels : la pompe « Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase 2a » (SERCA2a) et l'échangeur Sodium/Calcium (NCX).

SERCA2a : La pompe SERCA2a est une protéine transmembranaire de taille moléculaire de 110 kDa (MacLennan *et al.*, 1985). Il existe plusieurs isoformes de la protéine SERCA, mais SERCA2a est celle qui est exprimée dans le cœur. Comme son nom l'indique, c'est une protéine ATPase capable d'hydrolyser l'ATP (Moller *et al.*, 2005). L'énergie produite par hydrolyse d'une molécule d'ATP permet à SERCA2a de transférer deux ions Ca^{2+} dans le RS. La recapture s'effectue contre le gradient électrochimique puisque la concentration cytoplasmique du Ca^{2+} libéré lors de la contraction demeure inférieure à celle du RS. Le mécanisme du transport comprend un cycle caractérisé par deux états conformationnels majeurs, appelés E1 et E2. La conformation E1 est la forme qui présente la plus grande affinité pour le Ca^{2+} capable de le lier du cytoplasme, tandis que la conformation E2 a une affinité plus faible pour l'ion, elle le libère dans la lumière du RS (Moller *et al.*, 2005). La protéine est composée de trois domaines cytoplasmiques appelés A, N et P, et un

domaine M qui comprend les hélices transmembranaires et les boucles courtes tournées vers la lumière du RS. Le domaine A permet l'activation de la liaison et la libération de Ca^{2+} . Le domaine N contient le site de liaison aux nucléotides. Le domaine P comprend Asp351, le résidu qui est phosphorylé pendant le cycle d'action (**Figure H14**). Le nucléotide est lié entre les domaines N et P, de telle sorte que son γ -phosphate soit proche de l'Asp351. Les deux sites de liaison au Ca^{2+} sont situés dans les hélices α M4, M5, M6 et M8 du domaine M. Les trois domaines cytoplasmiques subissent un réarrangement important suite à la phosphorylation de l'Aspartate, un événement clé pour la libération du Ca^{2+} dans la lumière du RS (Toyoshima and Inesi, 2004).

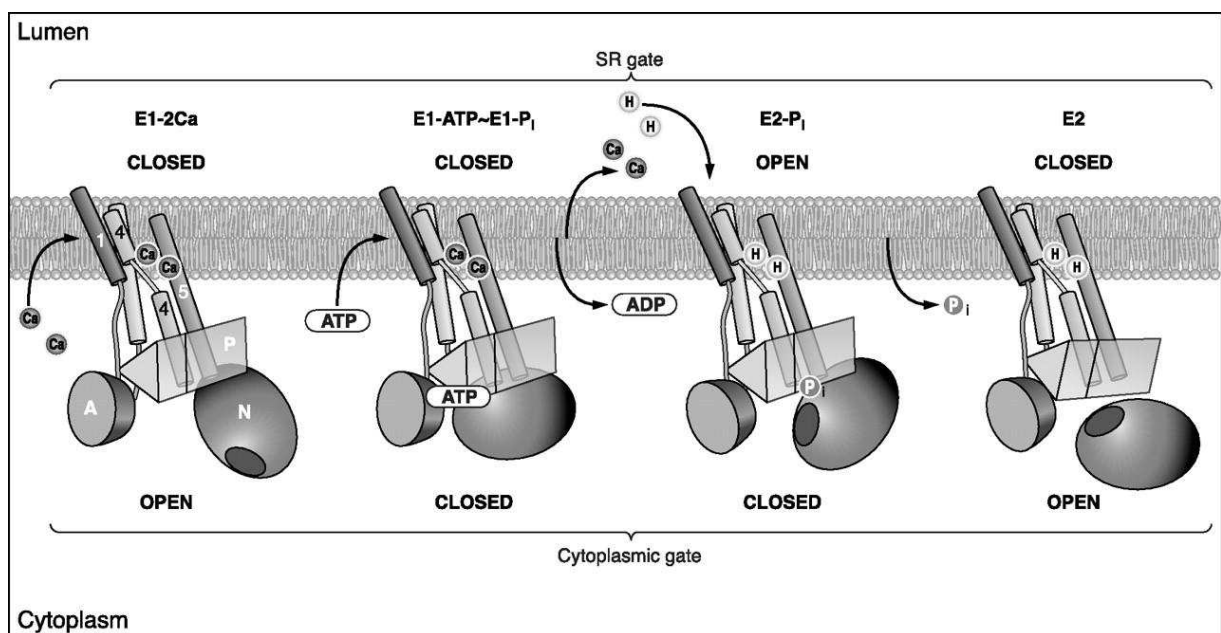


Figure 14 : Représentation schématique des modifications conformationnelles de SERCA2a et du cycle catalytique.

Quatre domaines constituent la protéine, M: domaine transmembranaire ; P: domaine de phosphorylation ; N: domaine de liaison aux nucléotides ; A: domaine de l'activation de la liaison. Les deux domaines de liaison au Ca^{2+} présentent une affinité élevée ou faible, connus respectivement sous le nom d'états E1 et E2, et ne permettent l'accès que du côté cytosolique et luminal, respectivement (Wray and Burdyga, 2010).

L'activité de SERCA2a peut être régulée par différents facteurs comme le Phospholamban (PLN), la Sarcolipine (SLN) (Traaseth *et al.*, 2008), la S100A1 et la PP1. De même, la SERCA2a peut

être phosphorylée par la CaMKII sur la sérine 38 (Toyofuku *et al.*, 1994), et par « *Small Ubiquitin-related Modifier 1* » (SUMO1) (Kho *et al.*, 2011) et l'insuline (Adachi *et al.*, 2004).

- Le phospholamban (PLN ou PLB) : Le PLN une protéine transmembranaire de 52 acides aminés phosphorylée en réponse à la stimulation β -adrénergique, et régulateur important de la fonction contractile (Lindemann *et al.*, 1983). Cette protéine homopentamère agit directement avec SERCA2a. Dans son état déphosphorylé, le PLB diminue la contractilité cardiaque en inhibant l'activité de SERCA2a. Le PLB inhibe l'activité de SERCA2a en diminuant l'affinité au Ca^{2+} à ses deux sites de liaison (I et II) situés dans la membrane du RS, ce qui diminue le remplissage du RS en Ca^{2+} , et par suite le développement de la force contractile. La phosphorylation de PLB aux résidus Serine 16 et Thréonine 17 inverse partiellement les altérations induites par les PLB et le rend inactif, ce qui augmente considérablement l'affinité au Ca^{2+} et ainsi la contractilité (Wegener *et al.*, 1989).
- La sarcolipine (SLN) : Comme pour le PLN, elle interagit avec SERCA2a afin d'inhiber son activité, en diminuant son affinité pour le Ca^{2+} (Winther *et al.*, 2013). Elle présente une structure semblable à celle du PLN.
- La S100A1 : Cette protéine en structure « *EF Hand* » se lie au Ca^{2+} (« *calcium binding protein A1* ») et interagit avec plusieurs protéines impliquées dans l'homéostasie calcique. Elle affecte de même leur activité (Ritterhoff and Most, 2012). Elle est exprimée dans le cœur (localisée au niveau du RS), le muscle squelettique et le cerveau. Elle est connue pour réguler l'action de SERCA2a positivement, améliorant ainsi la recapture calcique (Most *et al.*, 2003).
- La PP1 : La phosphatase PP1, forme prédominante cardiaque, déphosphoryle le PLN, et par la suite inhibe l'action de SERCA2a (Strack *et al.*, 1997).

L'échangeur Sodium/Calcium « *Sodium/Calcium exchanger* » (NCX) :

L'échangeur NCX est une protéine sarcolemmique responsable du transport du Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule. Il existe sous trois isoformes différentes, NCX1 est la seule exprimée au niveau du tissu cardiaque (Quednau *et al.*, 1997).

Il est composé de 10 segments transmembranaires qui lient et transportent le Na^+ et le Ca^{2+} à travers la membrane plasmique (Liao *et al.*, 2012; Ren and Philipson, 2013). Une grande boucle cytoplasmique entre les segments transmembranaires 5 et 6 contient deux domaines de régulation pour Ca^{2+} . En effet, il est régulé de manière allostérique par le Ca^{2+} intracellulaire (Matsuoka and Hilgemann, 1992; Ottolia *et al.*, 2009). Les études en immunolocalisation ont montré que le NCX1 est réparti sur toute la membrane, y compris les tubules T (Dan *et al.*, 2007). Certaines études ont montré que la densité de NCX1 est plus élevée dans les tubules T (Sipido *et al.*, 2013).

NCX1 transporte 3 ions Na^+ en échange d'un ion Ca^{2+} . Il peut fonctionner de manière bidirectionnelle. En mode « *Forward* », l'échangeur expulse un ion Ca^{2+} des myocytes en échange de 3 ions Na^+ . À l'inverse, pendant le mode « *Reverse* », l'échangeur expulse du Na^+ en échange de Ca^{2+} . Le mode de fonctionnement de NCX1 est régi par les gradients de Na^+ et Ca^{2+} à travers la membrane cellulaire, ainsi que par le potentiel membranaire. L'action la plus reconnue de NCX1 est en mode « *Forward* » (Blaustein and Lederer, 1999).

La relaxation des myocytes commence par l'élimination du Ca^{2+} du cytoplasme (**Figure H15**). Il existe deux grandes voies de retrait : l'une est par SERCA2a, l'autre est par NCX1. Dans les conditions physiologiques, NCX1 élimine la même quantité de Ca^{2+} qui est entrée dans la cellule à travers les LTCC afin de maintenir l'équilibre du Ca^{2+} cellulaire (Bridge *et al.*, 1990).

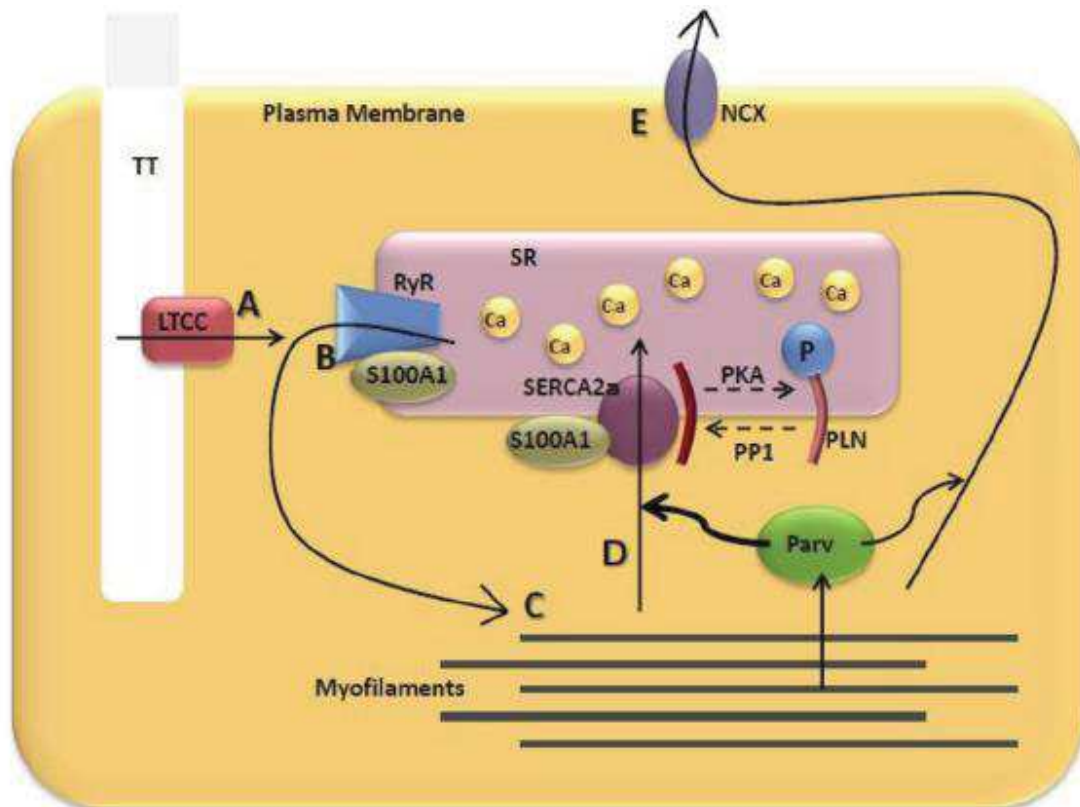


Figure H15 : Schéma représentant le cycle du Ca^{2+} dans le cardiomyocyte.

Le PA permet l'entrée de Ca^{2+} via le LTCC ce qui déclenche une libération d'une quantité plus élevée de Ca^{2+} à travers le RyR2 du RS. Le Ca^{2+} se lie aux myofilaments, conduisant à la contraction. Le Ca^{2+} est ensuite repris dans le RS via SERCA2a, ou pompé hors de la cellule via NCX. S100A1 et PLN agissent comme modulateurs de la fonction de SERCA2a. Parv représente la parvalbumine, une des protéines en « *EF hand* » capable de lier le Ca^{2+} et de l'éloigner des myofilaments après la production de la contraction. Ces protéines « *Ca²⁺ Buffering* » améliore la relaxation en accélérant la recapture du Ca^{2+} . D'après (Asp *et al.*, 2013).

2. Activité cardiaque anormale : Insuffisance cardiaque

Durant ce dernier demi-siècle, le progrès dans la prévention, le diagnostic et la gestion des maladies cardiovasculaires a été remarquable. Les taux de mortalité associés aux maladies cardiovasculaires ont diminué d'une façon spectaculaire dans les pays industrialisés (Nabel and

Braunwald, 2012) (organisation mondiale de la santé). Cependant, elles restent l'une des principales causes de mortalité. Parmi les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance cardiaque (IC) est la principale cause d'hospitalisation dans le monde (McMurray *et al.*, 2012) (organisation mondiale de la santé). C'est une maladie qui touche principalement les personnes âgées (> 60 ans) ; 10% chez les hommes et 8% chez les femmes soit 1-3% de la population avec une prévalence qui augmente avec l'âge (McMurray *et al.*, 2012; Braunwald, 2013).

L'IC est caractérisée par des symptômes typiques (essoufflement, gonflement au niveau de la cheville et fatigue) qui peuvent s'accompagner de signes (élévation de la pression veineuse jugulaire élevée, œdèmes périphériques...) dus à une anomalie cardiaque structurelle et/ou fonctionnelle, ce qui entraîne un débit cardiaque réduit et/ou des pressions intracardiaques élevées au repos ou à l'effort.

La définition actuelle de l'IC se limite aux stades des signes et symptômes cliniques apparents. Avant que les symptômes cliniques ne deviennent évidents, les patients peuvent présenter des anomalies cardiaques structurelles et fonctionnelles asymptomatiques (comme le dysfonctionnement systolique ou diastolique du VG). La reconnaissance précoce de ces anomalies est importante car ils peuvent entraîner des complications graves, et l'initiation du traitement au stade précoce peut réduire le taux de mortalité. Plusieurs types de classification ont été proposés : (i) l'IC gauche et l'IC droite. Cette classification a une base clinique et est largement utilisée. Les maladies coronaires et l'hypertension, par exemple, induisent une IC gauche. D'autre part, les maladies vasculaires pulmonaires entraînent une IC droite. Toutefois, cette classification présente des lacunes puisque la partie gauche et la partie droite ne sont pas indépendantes et les symptômes observés sont communs ; ce qui rend la distinction entre IC droite et gauche difficile. Mais la classification gauche/droite est utile pour établir l'étiologie et comprendre les conséquences sur les cavités cardiaques. (ii) On peut classer aussi l'IC en deux autres catégories ; chronique ou aiguë. On parle d'IC aiguë, souvent due à un infarctus du myocarde et accompagnée par des symptômes brutaux qui requièrent une intervention médicale urgente. Elle est chronique lorsqu'elle résulte d'une maladie coronaire, ischémique, valvulaire ou due à l'hypertension. Cette forme met du temps pour s'installer. Les formes aiguës et chroniques peuvent être attribuées aussi aux IC gauche et droite selon les étiologies. (iii) Dans les travaux de thèse présentés ici, la classification envisagée retient l'IC attribuée à la fonction systolique et celle attribuée à l'IC

diastolique. Cette classification se base sur la physiologie et elle est la plus utile du fait qu'elle sépare les altérations systoliques des altérations diastoliques pour déterminer l'étiologie et le traitement spécifique. L'IC a longtemps été associée à la diminution de la capacité contractile du cœur. Mais après l'identification du nouveau sous-type d'IC associé à la dysfonction diastolique, les cardiologues ont donc établi une nouvelle classification. L'IC comprend alors un large éventail de patients ; ceux qui ont une FE normale (préservée) considérée comme $\geq 50\%$: insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée IC/FEp ou IC systolique, ceux qui ont une FE réduite considérée comme $< 40\%$: Insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite IC/FEr ou IC diastolique. Les patients ayant une FE de 40-49% représentent une catégorie nommée récemment insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection moyenne « *mid range* » (Ponikowski *et al.*, 2016). La distinction entre les patients atteints d'IC systolique ou diastolique, basée sur la mesure de la FE, est importante car elle permet de déterminer les étiologies, les comorbidités et les traitements convenables.

Contrairement à l'IC/FEr ou IC systolique, il y a peu d'informations concernant les mécanismes et la pathogenèse de l'IC/FEp ou IC diastolique, rendant son traitement non efficace, malgré la présence des mêmes signes et symptômes. Comprendre les mécanismes de l'IC/FEp est devenu un enjeu majeur. Ainsi dans cette partie de l'introduction, on parlera de l'IC/FEr et puis de l'IC/FEp. Une comparaison de la physiopathologie des deux sous-types d'IC demeure importante puisque les traitements efficaces de l'IC/FEr n'ont pas réussi dans le traitement des patients de l'IC/FEp, suggérant la présence d'une physiopathologie différente.

2.1 Insuffisance cardiaque systolique

2.1.1 Définition et épidémiologie

L'IC est une condition durant laquelle le débit cardiaque est réduit, rendant le cœur incapable d'assurer la perfusion sanguine nécessaire au métabolisme. C'est une anomalie qui touche la fonction contractile du cœur. Cette définition n'englobe pas tout, mais elle met en relief le rôle du cœur, pompe musculaire assurant la circulation. Différentes causes sont incriminées dans la pathogenèse, les plus connues sont : les cardiomyopathies, les valvulopathies, les maladies coronaires et l'hypertension. En d'autres termes, tout dérèglement de la fonction ventriculaire, et plus spécifiquement de la fonction systolique touchant à la contraction, pourrait engendrer l'IC systolique. La Société Européenne de Cardiologie exige la présence de signes et symptômes d'IC

(au repos ou à l'effort) associés à une preuve de dysfonction cardiaque systolique (dans ce type d'IC), soulignée par la réduction de la fraction d'éjection (FE). Généralement, lorsqu'on parle d'IC, on désigne la réduction de la fonction contractile du cœur. Mais il est à noter que, comme déjà expliqué dans l'introduction de cette partie, il existe un autre sous-type d'IC qui touche à la fonction diastolique que l'on précise d'IC diastolique. Ainsi, la terminologie IC (sans précision) indique une altération de la fonction systolique contractile, fonction principale du cœur.

L'IC est une maladie fréquente avec une prévalence de 1-2 % dans les pays développés et s'élève à ≥ 10 % après l'âge de 70 ans, faisant d'elle la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde « *ESC guidelines 2016* » (Ponikowski *et al.*, 2016). Après l'accouchement, elle est la première cause d'hospitalisation, et est plus fréquente chez l'homme que chez la femme. À l'âge de 55 ans, le risque de présenter l'IC est de 33% chez l'homme et 28% chez la femme. Le pronostic de l'IC reste, malgré le progrès médical, faible : 50 % des patients décèdent dans les 4 ans suivant le diagnostic.

Classification de l'IC systolique

La « New York Heart Association » (NYHA), distingue entre quatre classes d'IC correspondant aux niveaux de sévérité des symptômes sont adoptées :

Classe NYHA I : Aucune limitation de l'activité physique. L'activité physique ordinaire ne cause pas de fatigue excessive, de palpitations, ou de dyspnée.

Classe NYHA II : Légère limitation de l'activité physique. Au repos, le patient ne montre aucun signe de fatigue. Cependant, suite à une activité physique ordinaire, il y a apparition d'une fatigue, des palpitations ou dyspnée.

Classe NYHA III : Limitation marquée de l'activité physique. Une faible activité physique provoque une fatigue des palpitations ou dyspnée.

Classe NYHA IV : Impossible d'exercer une activité physique sans inconfort. Les symptômes d'IC apparaissent même au repos. Si une activité physique est maintenue, l'inconfort augmente.

Un autre critère de classification de l'IC proposé par l'AHA (American Heart Association) qui mettent en évidence la présence ou non de l'anomalie cardio-vasculaire. Ainsi, on distingue les

niveaux de classement de A jusqu'à D partent de l'absence totale de preuve d'anomalie à la présence d'anomalie sévère.

2.1.2 Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque systolique

a. Etiologie

L'étiologie de l'IC dépend de plusieurs facteurs cardiovasculaires et non cardiovasculaires. L'identification de ces causes demeure un état critique car elle conditionne la prise en charge thérapeutique. Les causes les plus fréquentes à l'origine de l'IC reflètent les anomalies touchant le myocarde (cardiomyopathies), celles touchant à l'appareil valvulaire (valvulopathies) et aux coronaires (coronaropathies). L'IC peut aussi apparaître suite à l'infarctus du myocarde, ou suite à une surcharge imposée au ventricule (de volume ou de pression), ou acquise suite à une intoxication alcoolique (par exemple) ou à une infection (myocardite). Dans d'autres cas plus rares, elle peut être génétique comme dans le cas des cardiomyopathies idiopathiques (**Tableau 1**).

Parmi les différentes causes, celle qui occupe la première place est l'atteinte ischémique par athérosclérose coronarienne. La cardiopathie générée est liée à une perte régionale de tissu contractile et ainsi se traduit par une réduction de la masse musculaire efficace. La fonction contractile du myocarde serait altérée et l'efficacité de la pompe musculaire est réduite.

DISEASED MYOCARDIUM		
Ischaemic heart disease	Myocardial scar	
	Myocardial stunning/hibernation	
	Epicardial coronary artery disease	
	Abnormal coronary microcirculation	
	Endothelial dysfunction	
Toxic damage	Recreational substance abuse	Alcohol, cocaine, amphetamine, anabolic steroids.
	Heavy metals	Copper, iron, lead, cobalt.
	Medications	Cytostatic drugs (e.g. anthracyclines), immunomodulating drugs (e.g. interferons monoclonal antibodies such as trastuzumab, cetuximab), antidepressant drugs, antiarrhythmics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, anaesthetics.
	Radiation	
Immune-mediated and inflammatory damage	Related to infection	Bacteria, spirochaetes, fungi, protozoa, parasites (Chagas disease), rickettsiae, viruses (HIV/AIDS).
	Not related to infection	Lymphocytic/giant cell myocarditis, autoimmune diseases (e.g. Graves' disease, rheumatoid arthritis, connective tissue disorders, mainly systemic lupus erythematosus), hypersensitivity and eosinophilic myocarditis (Churg–Strauss).
Infiltration	Related to malignancy	Direct infiltrations and metastases.
	Not related to malignancy	Amyloidosis, sarcoidosis, haemochromatosis (iron), glycogen storage diseases (e.g. Pompe disease), lysosomal storage diseases (e.g. Fabry disease).
Metabolic derangements	Hormonal	Thyroid diseases, parathyroid diseases, acromegaly, GH deficiency, hypercortisolaemia, Conn's disease, Addison disease, diabetes, metabolic syndrome, pheochromocytoma, pathologies related to pregnancy and peripartum.
	Nutritional	Deficiencies in thiamine, L-carnitine, selenium, iron, phosphates, calcium, complex malnutrition (e.g. malignancy, AIDS, anorexia nervosa), obesity.
Genetic abnormalities	Diverse forms	HCM, DCM, LV non-compaction, ARVC, restrictive cardiomyopathy (for details see respective expert documents), muscular dystrophies and laminopathies.
ABNORMAL LOADING CONDITIONS		
Hypertension		
Valve and myocardium structural defects	Acquired	Mitral, aortic, tricuspid and pulmonary valve diseases.
	Congenital	Atrial and ventricular septum defects and others (for details see a respective expert document).
Pericardial and endomyocardial pathologies	Pericardial	Constrictive pericarditis Pericardial effusion
	Endomyocardial	HES, EMF, endocardial fibroelastosis.
High output states		Severe anaemia, sepsis, thyrotoxicosis, Paget's disease, arteriovenous fistula, pregnancy.
Volume overload		Renal failure, iatrogenic fluid overload.
ARRHYTHMIAS		
Tachyarrhythmias		Atrial, ventricular arrhythmias.
Bradycardias		Sinus node dysfunctions, conduction disorders.

Tableau 1 : Etiologie de l'IC. D'après les « guidelines » de la Société Européenne de Cardiologie, (Ponikowski et al., 2016).

b. Pathogenèse

Les mécanismes mis en jeu lors de l'installation de l'IC systolique (ICS) dépendent fortement de l'étiologie, mais convergent tous vers une réduction de la fonction contractile et donc du débit cardiaque. Ce dernier représente le produit du volume d'éjection systolique par la fréquence

cardiaque. La fréquence est contrôlée par le système nerveux autonome alors que le volume d'éjection systolique dépend de deux conditions :

La précharge : elle représente la tension passive du ventricule, c'est-à-dire, la tension développée au repos, appelée la rigidité. En effet, le remplissage dépend de la pression. Ainsi, la mesure de la précharge est associée à celle des pressions auriculaire et ventriculaire télédiastolique appelées pressions de remplissage et dont dépend le volume sanguin. La loi de *Starling* précise la relation entre la précharge et le débit cardiaque ce qui permet l'évaluation de la fonction ventriculaire : si cette dernière est altérée, la courbe représentative « s'aplatie » et les modifications de la précharge n'entraînent plus d'effets sur le débit cardiaque. Plus la précharge augmente, plus la force de contraction augmente et par suite le volume sanguin (**Figure H16**).

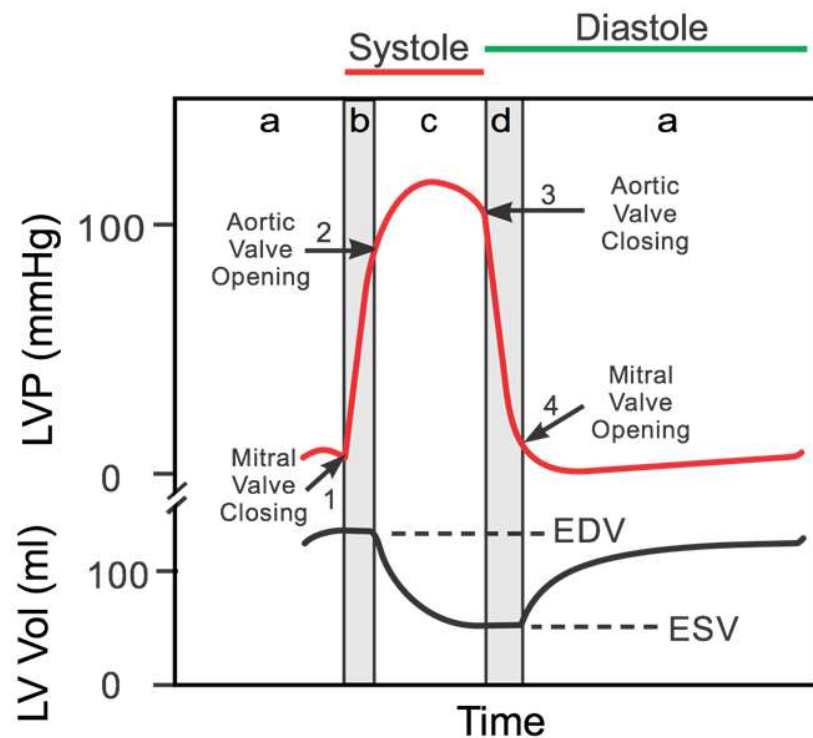


Figure H16 : Illustration de la relation pression-volume du VG à différentes phases d'un cycle cardiaque :

a) remplissage b) contraction isovolumique c) éjection d) relaxation isovolumique. Adapté d'après « Cardiovascular Physiology Concepts, Richard E. Klabunde © 2012 published by Lippincott Williams & Wilkins ».

La postcharge : elle correspond à la force nécessaire développée pour expulser le sang dans les ventricules contre la tension vasculaire. Elle dépend donc de la pression ventriculaire systolique et du volume, et elle est représentée par la loi de Laplace :

$$\text{Tension pariétale} = \frac{\text{pression du VG} \times \text{rayon du VG}}{\text{épaisseur de la paroi}}$$

Donc le débit cardiaque, qui constitue le déterminant de la fonction ventriculaire, est influencé par différents facteurs et son altération est un signe de dysfonction systolique. Cette dernière peut être induite par un ou plusieurs mécanismes :

- a) Limitation du remplissage ventriculaire
 - b) Surcharge de pression ou de volume imposée au ventricule gauche
 - c) Altération de la fonction contractile
-
- a) La limitation du remplissage ventriculaire : elle est causée principalement par la sténose mitrale engendrant l'IC malgré que dans cette situation, le VG soit normal. C'est le cas des cardiopathies hypertrophiques aussi où le remplissage est altéré suite à la rigidité du VG (condition observée dans l'IC diastolique, partie qui suit). Quel que soient les causes, ceci résulte en une baisse du débit cardiaque.
 - b) Surcharge volumique ou barométrique du VG : l'augmentation du volume télédiastolique (due aux régurgitations valvulaires) entraîne une augmentation de la force contractile. Suite à cette élévation, le ventricule se dilate avec une augmentation de l'étirement des fibres musculaires. Une dilatation du VG est synonyme de dysfonction systolique. D'autre part, la surcharge de pression, imposée par la postcharge (augmentation de la force contractile pour pomper plus de sang), finit par entraîner une défaillance cardiaque avec une diminution du débit cardiaque. Ces mécanismes sont, au tout début, compensateurs, mais en dépassant la capacité d'adaptation du ventricule ils deviennent des mécanismes délétères.
 - c) Altération de la fonction contractile : ce mécanisme est une cause prédominante de l'IC systolique au stade de décompensation, mais aussi une conséquence des autres mécanismes

déjà décrits ; ce qui se traduit par la dilatation du VG. Une réduction de la masse musculaire efficace suite à une nécrose des cardiomyocytes (due à l'ischémie) ou une cardiomyopathie d'origine idiopathique ou toxique réduisent l'efficacité de la pompe cardiaque en absence de toute capacité de maintien du débit cardiaque par les mécanismes compensateurs.

c. Diagnostic :

Le diagnostic est basé sur une série d'examens suite à l'apparition de certains signes et symptômes. Le diagnostic doit obligatoirement être accompagné par une recherche de la cause afin de pouvoir établir une piste thérapeutique spécifique (**Tableau 2**). En regardant les signes et les symptômes d'IC, on distingue certains qui sont plus spécifiques que d'autres. Cependant, il est conseillé de voir s'il existe des antécédents médicaux augmentant la probabilité de développer une IC puisque l'apparition d'une IC chez un individu sans avoir aucun antécédent est inhabituelle. Surveiller les signes et les symptômes est aussi une étape importante dans le suivi des patients permettant d'évaluer leur réponse aux traitements proposés. Une persistance ou un aggravement dans les signes et les symptômes malgré le traitement nécessitent une thérapie supplémentaire et une intervention médicale rapide.

Symptoms	Signs
Typical	More specific
Breathlessness Orthopnoea Paroxysmal nocturnal dyspnoea Reduced exercise tolerance Fatigue, tiredness, increased time to recover after exercise Ankle swelling	Elevated jugular venous pressure Hepatojugular reflux Third heart sound (gallop rhythm) Laterally displaced apical impulse
Less typical	Less specific
Nocturnal cough Wheezing Bloated feeling Loss of appetite Confusion (especially in the elderly) Depression Palpitations Dizziness Syncope Bendopnea ³³	Weight gain (>2 kg/week) Weight loss (in advanced HF) Tissue wasting (cachexia) Cardiac murmur Peripheral oedema (ankle, sacral, scrotal) Pulmonary crepitations Reduced air entry and dullness to percussion at lung bases (pleural effusion) Tachycardia Irregular pulse Tachypnoea Cheyne Stokes respiration Hepatomegaly Ascites Cold extremities Oliguria Narrow pulse pressure

Tableau 2 : Description des signes et symptômes typiques d'IC. D'après les « guidelines » de la Société Européenne de Cardiologie, (Ponikowski et al., 2016).

La dyspnée est le symptôme majeur de l'IC. Elle est associée à l'effort souvent pour déterminer la classe d'IC comme déjà décrit par NYHA. Elle peut prendre trois formes :

- L'orthopnée est celle qui survient en position couchée ; son effet est réduit en changeant de la position couchée à la position semi assise.
- La dyspnée paroxystique nocturne qui se caractérise soit par une bradypnée (ventilation ralentie) ou un œdème pulmonaire.
- La bendopnée qui est définie par la survenue d'une dyspnée en position inclinée (antéflexion), traduisant une augmentation des pressions de remplissage.

L'examen clinique comme la palpation et l'auscultation révèle différents signes d'IC mais il complété par l'examen paraclinique. Il comprend des méthodes non-invasives (électrocardiographie, échocardiographie, radiographie du thorax avec l'examen biologique) et des méthodes invasives (cathétérisme cardiaque).

Electrocardiographie : un électrocardiogramme complètement normal est très rarement associé à une IC, par conséquent, l'analyse d'un ECG est une méthode courante et recommandé pour exclure l'IC (Mant *et al.*, 2009). Cependant, il permet d'orienter l'étiologie et/ou de détecter un trouble de rythme et par suite préciser le traitement spécifique (Mant *et al.*, 2009).

Echocardiographie Transthoracique (ETT) : c'est la méthode la plus utile et la plus rigoureuse qui permet de diagnostiquer les maladies cardiaques, qu'elles soient dans le stade de compensation ou dépassées. Le terme échocardiographie regroupe toutes les techniques d'imagerie par ultrasons. Elle comprend : l'échocardiographie bidimensionnelle et tridimensionnelle, le Doppler en mode continu ou pulsé (qui peut être à codage couleur), le Doppler tissulaire (imagerie doppler de tissu) (« *Tissue Doppler Imaging* »). L'échographie permet d'évaluer les structures. Quant à l'effet Doppler, il permet de calculer les vitesses des flux sanguins et des parois (vitesse de déformation ou « *strain rate* ») pour le tissulaire. Cet examen est l'examen de choix pour l'évaluation de la fonction systolique et de la fonction diastolique (pour les deux ventricules) et d'établir l'étiologie.

La dysfonction systolique est déterminée essentiellement par la fraction d'éjection, grandeur mesurée par échocardiographie et constitue un déterminant principal de la fonction ventriculaire. Elle évalue d'une façon quantitative la fonction systolique selon le calcul suivant :

$$\text{Fraction d'éjection}(\%) = \frac{\text{Volume télédiastolique} - \text{Volume télésystolique}}{\text{Volume télédiastolique}}$$

Volume télédiastolique : volume en fin de diastole

Volume télésystolique : volume restant en fin de systole

En effet, la terminologie de l'IC se base sur la mesure de la FE. Comme il a été évoqué dans l'introduction de la partie « Activité cardiaque anormale », une FE inférieure à 40% est considérée comme « réduite », et ainsi relève d'une IC systolique, ou IC avec FE réduite (« *Guidelines* » de la société européenne de la cardiologie). La mesure de la FE permet ainsi de distinguer l'IC

associée à une dysfonction systolique, de l'IC associée à une dysfonction diastolique. Cette distinction entre les patients atteints d'IC basée sur la mesure de la FE est importante pour plusieurs raisons : elle permet de déterminer les différentes étiologies sous-jacentes conditionnant le traitement convenable, et évaluer la démographie et les co-morbidités (Butler *et al.*, 2014).

D'autres paramètres importants, comme ceux qui évaluent la morphologie cardiaque, sont aussi mesurés par échocardiographie :

- Le diamètre ventriculaire : LVID « *Left Ventricular Internal Diameter* » : une augmentation du LVID est un signe de dilatation du VG et une diminution de la fonction contractile.
- L'épaisseur de la paroi postérieure : PWT « *Posterior Wall Thickness* » : la perte de la fonction contractile due à la nécrose des cardiomyocytes induit l'amincissement de la paroi du VG. La diminution de PWT accompagne ainsi l'IC systolique et contribue à l'augmentation du diamètre du VG.
- L'épaisseur du septum inter-ventriculaire : IVS « *Inter-ventricular Septum Thickness* » : le septum est moins affecté que la paroi postérieure mais une diminution de son épaisseur est observée lors de l'augmentation du diamètre du VG.
- Les volumes ventriculaires et le débit cardiaque : le débit cardiaque est diminué dans l'IC systolique. C'est la conséquence majeure de la pathologie.

Les paramètres d'évaluation de la fonction diastolique, mesurés par échocardiographie, seront développés dans la partie IC diastolique.

2.1.3 Traitement

Le traitement peut être préventif lorsque le patient présente des facteurs de risque telle l'hypertension artérielle, l'ischémie ou les valvulopathies. Il a comme objectif principal d'éviter l'installation de la dysfonction systolique et par suite l'IC. D'autre part, le traitement peut être destiné à corriger les symptômes (surtout la douleur thoracique, la dyspnée).

Dans le cas d'IC systolique chronique, où la décompensation est déjà installée, l'état est irréversible et le traitement est destiné à corriger les signes et les symptômes. Les médicaments attribués aux patients sont essentiellement des diurétiques et l'inhibiteur de l'enzyme de

conversion. La prise en charge comprend au début le contrôle de la tension artérielle et du rythme cardiaque ainsi que l'anémie. En traitant l'hypertension artérielle, la fonction ventriculaire est améliorée et le débit cardiaque est augmenté. La correction de l'anémie permet d'assurer l'apport en oxygène nécessaire pour les tissus. Cette procédure thérapeutique permet de ralentir la progression de la pathologie (**Tableau 3**) :

Type de traitement	Objectif	Mode d'action	Référence
Les diurétiques	<ul style="list-style-type: none"> -Réduire la rétention de l'eau pour diminuer la pression auriculaire -Réduire les signes et les symptômes de la congestion 	<ul style="list-style-type: none"> 1-Les diurétiques doux « <i>Thiazides</i> » : Augmenter l'excrétion du Na⁺ au niveau du tube rénal distal 2- Les diurétiques de l'anse « <i>loop diuretics</i> » : Inhiber la réabsorption de Na⁺ au niveau de l'anse de Henlé 	<ul style="list-style-type: none"> (Faris <i>et al.</i>, 2012) (Faris <i>et al.</i>, 2002)
Les facteurs agissant sur le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (« RAAS »)	<ul style="list-style-type: none"> -Dilater les vaisseaux -Augmenter le débit cardiaque 	<ul style="list-style-type: none"> 1-Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion : Bloquer la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II 2-Les antagonistes des récepteurs de l'aldostérone « <i>Mineralocorticoid/Aldosterone receptor antagonists</i> » : bloquer la vasoconstriction 3- « <i>Angiotensin Receptor Nephilysin Inhibitor</i> » LCZ696 (bloqueur du récepteur de l'angiotensine « Valsartan » et inhibiteur de la Néprilysine « Sacubritil ») : ralentir la dégradation des peptides natriurétiques et réduire la rétention de l'eau et du sodium 	<ul style="list-style-type: none"> (Garg and Yusuf, 1995) (Packer <i>et al.</i>, 1999) (Mangiafico <i>et al.</i>, 2013) (King <i>et al.</i>, 2015)
Les bêtabloquants	-Ralentir la fréquence cardiaque		(Flather <i>et al.</i> , 2005)
Inhibiteur du courant I _f	-Ralentir la fréquence cardiaque	Ivabradine : inhiber le courant I _f dans le nœud sinusal	(Swedberg <i>et al.</i> , 2010)

Tableau 3 : Principaux traitements administrés aux patients de l'IC systolique.

En cas d'IC systolique ventriculaire aiguë, qui représente une situation d'urgence, le processus du traitement consiste à soulager la douleur et corriger les arythmies et l'hypertension. Ainsi, les premiers traitements sont basés sur les diurétiques et la morphine. Cette association soulage la dyspnée, favorise la vasodilatation, et induit une diurèse, qui a comme objectif de baisser la pression. En cas d'échec de ce traitement, la deuxième ligne de médicaments adressés doit améliorer la fonction contractile, et comporte alors des vasodilatateurs et des inotropes. Les vasodilatateurs sont principalement des dilatateurs veineux qui réduisent le retour veineux au cœur pour réduire ainsi la pression auriculaire. Les inotropes stimulent les récepteurs β adrénergiques ce qui augmente la contractilité et améliore le débit cardiaque.

2.2 Insuffisance cardiaque diastolique

2.2.1 Définition et épidémiologie

L'IC diastolique désigne la catégorie des patients ayant des signes et symptômes d'IC mais avec une fraction d'éjection normale ou préservée (>50%). On sait maintenant que 50% des patients atteints d'IC ont une fraction d'éjection normale. Il est préférable de souligner la normalité de la fonction systolique et référencer ce sous-type d'IC comme IC/FEp. Toutefois, la plupart des patients atteints d'IC systolique (avec fraction d'éjection réduite) ont également un dysfonctionnement diastolique, et des anomalies subtiles de la fonction systolique ont été observées chez les patients atteints de l'IC/FEp. D'où la préférence d'indiquer si la FE est normale ou réduite au lieu de parler d'IC systolique ou diastolique.

La prévalence de l'IC/FEp augmente d'environ 1% par an et on prévoit qu'elle deviendra le phénotype d'IC le plus répandu au cours de la prochaine décennie (Owan *et al.*, 2006; Gerber *et al.*, 2015). La description initiale des patients atteints de l'IC/FEp montre une population beaucoup plus âgée, plus susceptible d'avoir une hypertension associée à une grande rigidité artérielle, et plus fréquemment du sexe féminin comparée à celle de l'IC/FEr (Klapholz *et al.*, 2004). De plus, des données récentes ont montré que le taux de comorbidités non cardiaques est plus élevé chez les patients de l'IC/FEp, et est associé à des hospitalisations non liées à l'IC, par rapport aux patients de l'IC/FEr (Ather *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2012). En effet, dans une étude sur 9 000 patients souffrant d'IC, Ather *et al.* ont montré une prévalence plus élevée des maladies pulmonaires chroniques, du diabète, de l'hypertension, des troubles psychiatriques, de l'anémie, de l'obésité, de l'ulcère et du cancer dans le groupe des patients de l'IC/FEp. De plus, la présence de

la fibrillation atriale et le sexe féminin augmentent la probabilité de développer une IC diastolique, tandis que la présence d'une maladie coronarienne, d'une fréquence cardiaque élevée, un taux plus élevé du K⁺, et des changements associés à l'ischémie augmentent le risque de l'IC/FEr (Ho *et al.*, 2012). Par conséquent, il est possible que l'IC/FEp représente plus un ensemble de changements associés au vieillissement qu'une maladie homogène (Phan *et al.*, 2009).

Classification de l'IC diastolique

La classification de NYHA peut aussi s'appliquer aux patients atteints d'IC avec dysfonction diastolique puisqu'ils présentent les mêmes symptômes. Cependant, autre que la sévérité des symptômes, il est important de revenir à la FE : il a été reconnu qu'une zone grise existe entre l'IC/FEp et l'IC/FEr (McMurray *et al.*, 2012). Ces patients ont une FE qui varie de 40 à 49%, d'où le terme IC/FE_m pour moyenne ou modérée. L'identification de ce groupe distinct poussera les chercheurs à évaluer les caractéristiques sous-jacentes, la physiopathologie et le traitement de ces patients. Les patients atteints d'IC/FE_m ont probablement principalement une dysfonction systolique légère, mais avec des caractéristiques de dysfonctionnement diastolique. Ainsi, la dysfonction diastolique peut être classée comme légère (relaxation faiblement altérée), modérée (pseudo-normale) associée à une augmentation des pressions auriculaires gauches de remplissage, ou sévère (remplissage restrictif ; subdivisée en phases réversible et irréversible) (Nagueh *et al.*, 2009).

2.2.2 Physiopathologie de l'IC diastolique

a. Etiologie

Des différences physiopathologiques significatives existent entre les deux sous-types d'IC. De même, ils semblent avoir différents profils épidémiologiques et étiologiques. Il n'y a pas de système de classification unique pour les causes de l'IC diastolique, avec beaucoup de chevauchements entre les catégories potentielles. Beaucoup de patients auront plusieurs pathologies différentes, cardiovasculaires et non cardiovasculaires. Il est à noter que les patients atteints d'IC/FEp sont plus âgés, et plus souvent sont des femmes, avec une hypertension et souffrant de fibrillation atriale, avec un risque d'infarctus du myocarde moins fréquent.

b. Pathogenèse

Pour mieux comprendre comment la dysfonction diastolique se produit, nous devons partir de la physiologie de la diastole. En effet, la diastole peut être divisée en quatre phases, débutant à partir de la fermeture de la valve aortique. La première phase de la diastole est la relaxation isovolumique qui ne contribue pas au remplissage ventriculaire et donc durant laquelle il n'y a pas un changement dans le volume ventriculaire puisque les valves sont fermées. Cependant, un changement dans la forme géométrique de la cavité ventriculaire a lieu, suivi par une chute de la pression ventriculaire qui devient inférieure à celle des oreillettes. Les valvules auriculo-ventriculaires s'ouvrent, permettant le premier remplissage passif (et rapide) (Pouleur, 1990) qui fournit la majeure partie du remplissage ventriculaire (environ 60-90%) ; C'est la deuxième phase. La troisième phase correspond au remplissage lent, mentionné comme diastasis, contribuant seulement à 5% du remplissage total. La phase finale complète les 5 à 35% restants du remplissage ventriculaire grâce à la contraction auriculaire, et constitue le remplissage actif.

Ainsi, deux événements marquent la phase de diastole : la relaxation ventriculaire correspondant au relâchement complet du muscle cardiaque, et le remplissage ventriculaire. Au niveau cellulaire, la **relaxation** isovolumique est un processus dépendant de la concentration calcique et de l'énergie, où les ions calcium sont éliminés du cytoplasme contre un gradient de concentration, permettant leur dissociation du complexe contractile actine-myosine (relaxation active) (Tzschatzsch *et al.*, 2013). Au niveau intégré, elle dépend aussi de la rigidité du VG. Ainsi, plus un cœur est rigide, moins il se relâche. De même, plus la concentration calcique demeure élevée, plus la relaxation est retardée. Ce retard dans la vitesse de relaxation, affecte également la vitesse de chute de la pression ventriculaire gauche, et par suite le **remplissage**. En effet, le premier remplissage passif est dû à la différence de pression créée entre les oreillettes et les ventricules, le deuxième remplissage actif est dû à la contraction auriculaire qui permet le passage du reste du volume sanguin dans les ventricules. Puisque le remplissage dépend des pressions ventriculaires, plus la pression au niveau du ventricule est élevée, moins le gradient de pression entre le ventricule et l'oreillette est grand, induisant ainsi une diminution du premier remplissage passif.

Un autre facteur influençant la vitesse de chute des pressions est la rigidité. Si la rigidité du VG augmente (suite à plusieurs facteurs cités ci-dessous), les pressions ventriculaires augmentent. De plus, le remplissage sera retardé car le cœur se relâche moins. Par conséquent, une relaxation

altérée entraîne une augmentation de la pression de remplissage pour maintenir un volume diastolique adéquat (Borlaug and Paulus, 2011; Phan *et al.*, 2012).

La différence principale entre l'IC/FEr et l'IC/FEp est le remodelage en réponse au stress. Les cœurs de l'IC/FEr subissent une hypertrophie progressive du ventricule, associée à l'allongement des cardiomyocytes et au remodelage de la matrice extracellulaire, aboutissant à la dilatation du cœur (Aurigemma *et al.*, 2006). Cependant, les cœurs de l'IC/FEp s'hypertrophient avec une augmentation marquée de la fibrose, conduisant à un remodelage concentrique sans dilatation ventriculaire.

- La rigidité **passive** du VG est estimée en examinant la relation pression-volume pendant la diastole (**Figure H17**). Dans l'IC/FEp, la courbe de cette relation est décalée vers le haut et vers la droite, de sorte qu'une petite variation de volume entraîne de gros changements de pression, ce qui permet d'identifier une réduction de la compliance de la paroi ventriculaire.

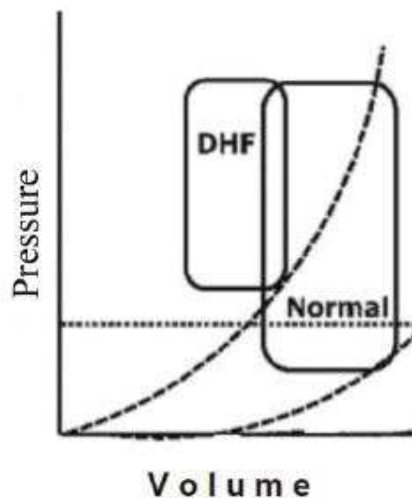


Figure H17 : Relation pression-volume en dysfonction diastolique du VG.

Pour une augmentation donnée du volume du VG, la pression ventriculaire développée par un patient souffrant d'IC diastolique est plus élevée que celle développée chez un sujet normal. Figure d'après (Palmiero *et al.*, 2015).

- Compliance et matrice extracellulaire :

Les facteurs majeurs responsables de cette diminution de la compliance comprennent une modification de la composition de la matrice extracellulaire et/ou une modification de l'expression des protéines du cytosquelette (Bronzwaer and Paulus, 2005). La matrice extracellulaire du cœur est principalement constituée d'un réseau de collagène, mais contient également de l'élastine, de la laminine et de la fibronectine, et les changements dans sa composition ont un impact majeur sur la compliance et la performance du ventricule. En effet, en termes de rigidité de la paroi ventriculaire, deux des processus les plus importants sont la formation des ponts entre les fibres de collagène (« *collagen cross-linking* »), et la transition du collagène de type I au collagène de type III (Aronson, 2003). Il a été démontré récemment que le « *collagen cross-linking* » myocardique est associé à l'hospitalisation des patients souffrant d'une IC hypertensive (Lopez *et al.*, 2016). D'autres travaux ont montré que la fibrose et les modifications de la matrice extracellulaire sont corrélées avec la sévérité de l'IC/FEp : l'activation des métalloprotéinases (MMP) et l'inactivation des inhibiteurs tissulaires du MMP (« *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)* ») induisent la transition de collagène de type I au collagène de type III (Ahmed *et al.*, 2006) (Figure H18). Les taux de marqueurs sérologiques du collagène ont également été étudiés, étant corrélés à la gravité du dysfonctionnement diastolique (Martos *et al.*, 2007). D'autres facteurs comme l'aldostérone accélère également la mise en place de la fibrose et de l'IC/FEp (Mohammed *et al.*, 2010).

- Remodelage du cytosquelette : les changements du cytosquelette contribuent à la rigidité ventriculaire **passive**. La titine, grosse protéine du cytosquelette, est responsable de l'ancrage de la myosine au disque z dans le sarcomère, et contribue à la maintenance de la tension diastolique (Wu *et al.*, 2000; Granzier *et al.*, 2005). Des modifications du ratio de la titine N2B, isoforme plus petite mais plus rigide et de son variant par épissage alternatif, la titine N2BA, isoforme large et compliant, se sont révélées en corrélation avec les changements de la rigidité diastolique. De plus, une étude clinique a montré une diminution du ratio N2BA/N2B dans le myocarde des patients atteints d'IC diastolique par rapport aux patients atteints d'IC systolique (van Heerebeek *et al.*, 2006). Il semble que le niveau de phosphorylation de la titine via la voie de signalisation PKG-oxyde nitrique, modulerait la rigidité de la titine et pourra améliorer le dysfonctionnement diastolique. En effet, Kruger *et al.* ont montré que la titine extraite du VG humain des patients à cardiomyopathie dilatée

présente un niveau de phosphorylation inférieur à celui des patients contrôles (Kruger *et al.*, 2009).

- Altération de la relaxation active : Le dysfonctionnement diastolique peut également résulter d'une altération de la relaxation **active** du myocarde pendant la diastole, un mécanisme « énergie-dépendant » impliquant l'action de plusieurs protéines. La relaxation au niveau des cardiomyocytes dépend de la recapture du Ca^{2+} par le RS et de leur dissociation des myofilaments (Bers, 2002). L'acteur principal dans la recapture du Ca^{2+} est la pompe SERCA2a et l'échangeur NCX. En effet, des souris portant une mutation pour le gène de SERCA2a, présentent une relaxation prolongée du VG tandis qu'une surexpression de la pompe entraîne une relaxation accélérée (Periasamy and Huke, 2001). Le niveau d'expression de SERCA2a diminue avec l'âge dans le myocarde humain et est associé à une relaxation altérée (Cain *et al.*, 1998). Cette altération est plus aggravée en présence d'autres facteurs de risque tels que, l'augmentation de la FC et l'ischémie. La contribution de SERCA2a et d'autres protéines dans l'IC sera développée dans la partie « Homéostasie calcique » (**Figure H18**).

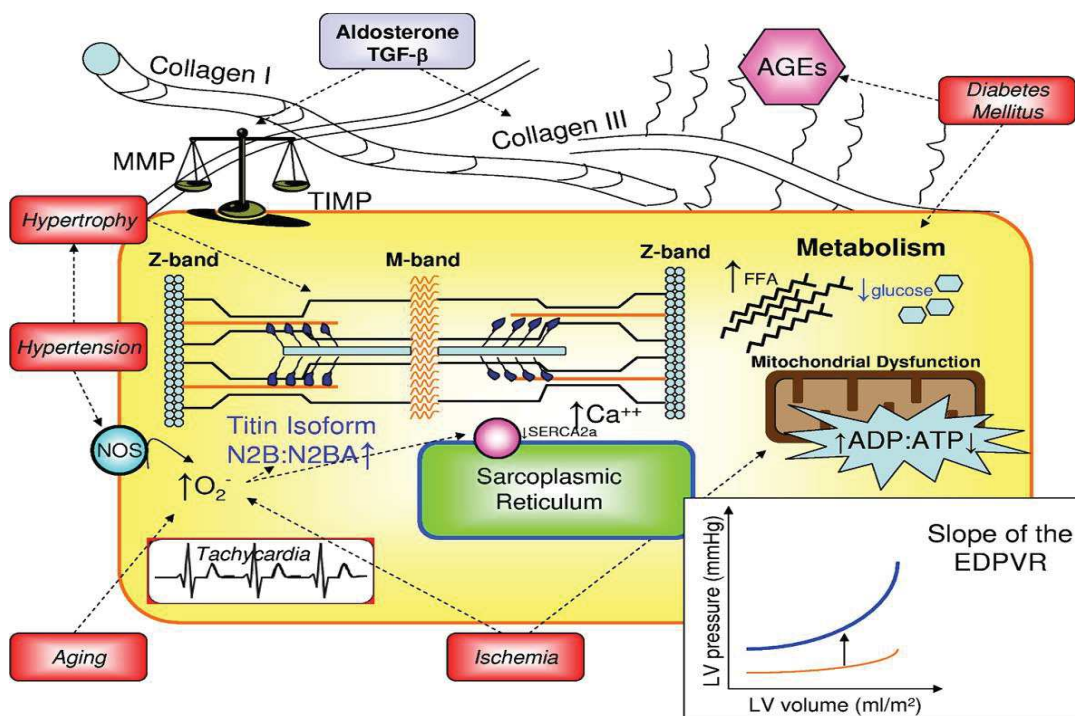


Figure H18 : Schéma simplifié des mécanismes contribuant à l'IC diastolique.

La dysfonction diastolique se manifeste souvent comme une augmentation de la relation pression-volume télédiastolique (« *End Diastolic Pressure Volume Relationship* ») telle que représentée dans le graphique. Les mécanismes conduisant à une dysfonction diastolique sont multiples : une diminution de la relaxation active due à l'altération de l'activité de SERCA2a, changements dans le cytosquelette des myocytes, dans la matrice extracellulaire, accompagnée de l'augmentation des produits glycosylés (« *Advance Glycation Endproducts* » AGE). Des facteurs externes contribuent également à ce processus, telle que l'hypertension, l'hypertrophie, l'activation de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la production de radicaux libres D'après (Wood *et al.*, 2011).

2.2.3 Diagnostic :

Le diagnostic de l'IC/FEp est plus difficile que celui de l'IC/FEr. Les patients atteints de l'IC/FEp ne montrent aucune dilatation du VG, mais ont souvent une augmentation de l'épaisseur de la paroi postérieure du VG et/ou une augmentation accrue du diamètre de l'oreille gauche, comme signe d'augmentation des pressions de remplissage. Un remplissage ventriculaire gauche altéré est un signe supplémentaire de la présence du dysfonctionnement diastolique. Quant aux signes cliniques et les symptômes, ils sont semblables pour tous les patients d'IC, et par suite ils ne sont pas spécifiques à l'IC/FEp. En effet, d'après les « *guidelines* » de la ESC, le diagnostic de l'IC/FEp nécessite les conditions suivantes (Ponikowski *et al.*, 2016) :

- La présence des symptômes et/ou signes typiques de l'IC.
- Une FE du VG normale avec absence de dilatation de VG (considérée comme $\geq 50\%$ ou 40-49% pour l'IC/FEp).
- Taux élevés de peptides natriurétiques : BNP >35 pg/mL et/ou NT-proBNP >125 pg/mL).
- Preuve de la présence d'altérations cardiaques fonctionnelles et structurelles (documentées par la suite).

L'examen commence par les investigations des signes et symptômes et la recherche d'antécédents médicaux (hypertension artérielle, maladies coronaires, cardiotoxicité...). Puis il est suivi par l'examen physique et l'ECG. Les anomalies relevées dans l'ECG sont souvent des anomalies de repolarisation et une fibrillation atriale. Dans le cas de présence d'une anomalie, l'échocardiographie est nécessaire. Si l'échocardiographie confirme la présence d'IC, il est important d'établir l'étiologie et commencer par suite le traitement convenable. Le

critère initial étant l'évaluation de la FE du VG, une FE $\geq 50\%$ est considérée préservée. En cas de présence de preuve initiale d'IC/FEp, d'autres paramètres de la fonction diastolique sont étudiés pour démontrer l'altération structurale et/ou fonctionnelle (rigidité, pression élevée).

a. Vitesses de remplissage, profil d'ondes et temps de décélération (Figure H19) :

L'onde E représente la vitesse du pic de remplissage diastolique précoce, tandis que l'onde A représente la vitesse du pic de remplissage à la contraction auriculaire. Le rapport E/A est utilisé pour caractériser le remplissage du VG. Dans le cas normal, la majorité du remplissage se produit pendant la phase précoce de la diastole, sous l'effet du gradient de pression, de sorte que le rapport E/A est > 1 . Lorsque la relaxation est altérée, le remplissage diastolique précoce diminue progressivement (rigidité accrue, diminution du gradient) et une contraction atriale compensatoire vigoureuse se produit. Cela se traduit par un rapport E/A inversé ($E/A < 1$) reflétant une relaxation retardée. Avec la progression de la maladie et la diminution de la compliance du VG, les pressions de remplissage commencent à augmenter conduisant à une augmentation compensatoire de la pression de l'OG avec une augmentation du remplissage précoce malgré une relaxation altérée, de sorte que le profil de remplissage semble relativement normal (profil pseudo-normal $E/A > 1$) (Appleton *et al.*, 1988). Ce modèle, toutefois, représente des anomalies de la relaxation et se distingue du remplissage normal par un temps de décélération précoce raccourci de l'onde E (« *Deceleration time* »), représentant le temps de retour du pic de l'onde E à l'état basal. Chez les patients avec une diminution sévère de la compliance ventriculaire, la pression auriculaire gauche est nettement élevée et compense avec un remplissage diastolique précoce vigoureux. Ce profil de remplissage restrictif ($E/A \gg 1$) est expliqué par l'augmentation de la pression ventriculaire (Mandinov *et al.*, 2000; Palmiero *et al.*, 2015).

La vitesse de déplacement longitudinal de l'anneau mitral (E' et A'), moins dépendante des conditions de précharge, est déterminée par Doppler tissulaire. Le ratio E'/E' est calculé et utilisé comme indicateur de pression en fin de diastole du VG.

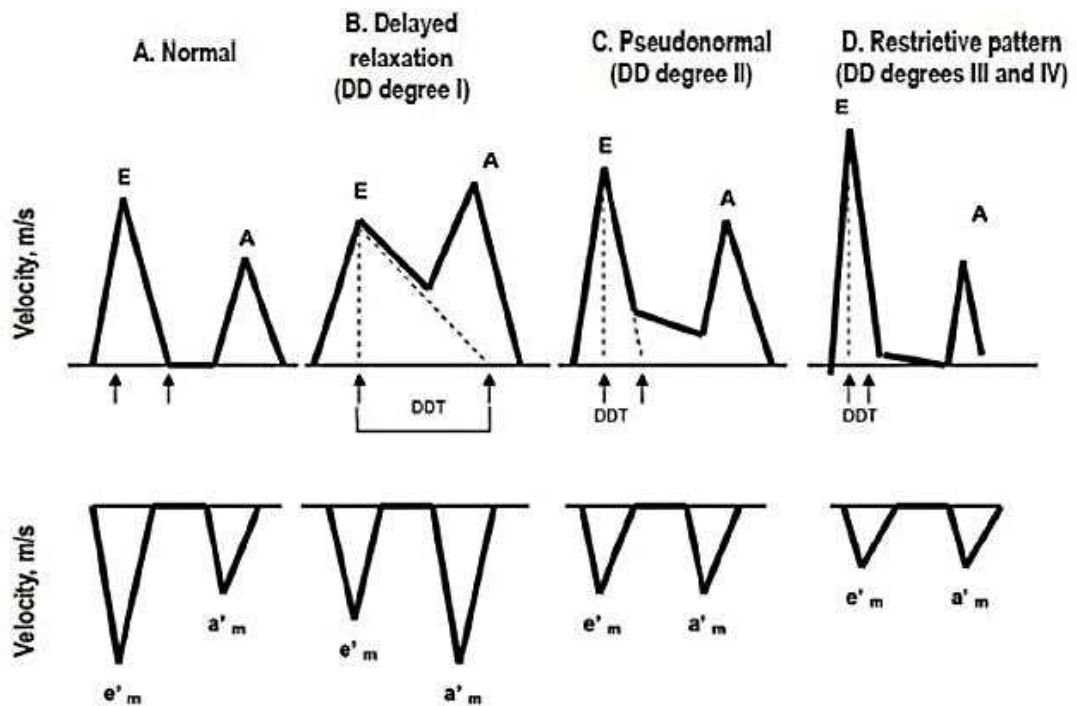


Figure H19 : Représentation schématique du flux mitral (première ligne), et du Doppler tissulaire au niveau de l'anneau mitral dans différents cas.

Dans le cas normal, le ratio $E/A > 1$. La relaxation retardée est représentée par une inversion des ondes E et A. La pseudo-normalisation correspond à un profil $E/A > 1$ avec diminution du temps de décélération. Dans le cas d'une dysfonction diastolique sévère, le ratio $E/A \gg 1$ est accompagné d'une réduction plus forte du temps de décélération. DDT : *Diastolic Deceleration Time* ; Figure d'après (Palmiero *et al.*, 2015).

b. Temps de relaxation isovolumique (IVRT : « Iso Volumic Relaxation Time ») :

Le temps de relaxation isovolumique peut être mesuré par échocardiographie Doppler. Il désigne le temps mesuré entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale. L'IVRT reflète le taux de relaxation myocardique, mais dépend de la post-charge et de la fréquence cardiaque (Shimizu *et al.*, 1998). Normalement, il varie entre 60 et 90 ms. C'est un indice sensible pour détecter une relaxation altérée car il est parmi les premiers paramètres à devenir anormal (Giannuzzi *et al.*, 1994). Le délai dans la relaxation résulte en une augmentation du temps de relaxation (Appleton *et al.*, 1988).

- c. Mesure du diamètre de l'oreillette gauche : L'oreillette gauche joue un rôle important dans la fonction diastolique en modulant le remplissage du VG. L'altération du remplissage est une caractéristique de la dysfonction diastolique. Suite à l'augmentation des pressions diastoliques due au développement d'une rigidité ventriculaire accrue, le premier remplissage passif est diminué. Cette diminution est compensée par une contraction auriculaire plus forte pour permettre le passage du volume sanguin restant au VG, qui se manifestera par l'augmentation du diamètre de l'oreillette gauche, altération structurale clé dans l'IC diastolique (Paulus *et al.*, 2007).

2.2.4 Traitement

Dans la pratique et les essais cliniques, par comparaison aux patients de l'IC/FEr, les patients atteints d'IC/FEp sont également traités par des diurétiques, des bêtabloquants, des MRA, des IEC et des ARB (Solomon *et al.*, 2012; Redfield *et al.*, 2013; Pitt *et al.*, 2014). Cela peut refléter le traitement des comorbidités cardiovasculaires, comme l'hypertension, les maladies coronaires et la fibrillation auriculaire, ou l'extrapolation des résultats des essais effectués pour ces conditions et montrant une réduction de l'IC (Beckett *et al.*, 2008).

Jusqu'à présent, aucun traitement n'a encore démontré, de manière convaincante, sa capacité à réduire la morbidité ou la mortalité chez les patients atteints de l'IC/FEp. Cependant, étant donné que ces patients sont souvent âgés, symptomatiques et ont souvent une mauvaise qualité de vie (Fukuta *et al.*, 2016), le but du traitement administré est d'atténuer les symptômes et d'améliorer le bien-être (Lewis *et al.*, 2007). Bien que des progrès dans le traitement et la réduction de la mortalité a marqué l'IC/FEr, ces traitements n'ont pas montré la même efficacité chez les patients de l'IC/FEp (Owan *et al.*, 2006).

La dysfonction diastolique représente l'altération initiale observée dans l'IC/FEp. Ainsi, les traitements et les thérapies explorés ont visé, soit l'amélioration de la relaxation et la réduction de l'hypertrophie, soit l'amélioration des symptômes.

L'inhibition du « RAAS »

L'inhibition du « RAAS » s'est révélée bénéfique dans le traitement des patients atteints d'IC « systolique ». Quel que soit le moyen utilisé pour inhiber le système RAA, que ce soit en inhibant

l'IEC ou en bloquant le récepteur de l'angiotensine ou de l'aldostérone, des améliorations de la morbidité et de la mortalité ont été observées. En se basant sur ces résultats avantageux, il a été suggéré que le blocage de ce système serait également bénéfique dans la prévention et/ou le traitement de l'IC/FEp.

a- Essais avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC)

Plusieurs études ont évalué le rôle de l'inhibition du système RAA chez les patients atteints de l'IC/FEp. L'administration du Perindopril à des patients d'IC/FEp âgés de 70 ans ou plus a montré des améliorations dans les symptômes et la capacité d'exercice et une diminution du nombre d'hospitalisations au cours de la première année de suivi (Cleland *et al.*, 2006). D'autres molécules ont été utilisées telle que la Ramipril ou la Quinapril, cependant aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traité et le groupe control, pour la capacité d'exercice, la qualité de vie et l'amélioration des symptômes (Zi *et al.*, 2003; Yip *et al.*, 2008).

b- Essais avec des inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II

Le Candesartan chez des patients d'IC avec une FE > 40% et classés II-VI NYHA ne montre pas de nette amélioration nette par rapport au groupe placebo. Cette étude, « *Candesartan in Heart failure : Assessment of Reduction in Mortality and morbidity* » (CHARM)-Preserved trial, a évalué la réduction de la mortalité et de la morbidité chez 3023 patients, dont 1514 ont pris une dose de 32 mg une fois par jour, et 1509 ont formé le groupe placebo (Yusuf *et al.*, 2003). Le taux de mortalité n'a pas été différent entre les groupes. Cependant, moins de patients dans le groupe Candesartan ont été hospitalisés que dans le groupe placebo.

Une autre étude nommée « *The Irbesartan in Heart Failure with Preserved Systolic Function (I-PRESERVE)* », a inclus 4128 patients âgés de 60 ans et plus, dans la classe II-IV selon la NYHA, et avec une FE \geq 45%. Tous les patients avaient été hospitalisés pour l'IC (congestion pulmonaire ou hypertrophie gauche). Ils ont aléatoirement partagé en 2 groupes pour recevoir 300 mg d'Irbesartan par jour ou un placebo (Massie *et al.*, 2008). Tous les paramètres cardiovasculaires ainsi que l'hospitalisation n'ont pas été différents entre les groupes. L'étude « *The Hong Kong DHF study* » a combiné l'Irbesartan et les diurétiques. 150 patients avec une dysfonction diastolique (EF > 45%) ont reçu soit des diurétiques seuls, soit des diurétiques et de l'Irbesartan, soit des diurétiques et du Ramipril (IEC). Les résultats ont montré que la qualité de vie s'est

améliorée dans les trois groupes. Les diurétiques seuls ont significativement amélioré les symptômes, cependant, ni l'Irbésartan ni le Ramipril n'ont présenté d'avantages supplémentaires. L'Irbésartan sur 4128 patients âgés de 60 ans et plus, classe II-IV NYHA, et avec une FE \geq 45% a donné les mêmes résultats que le Candesartan.

Identiquement aux essais de LCZ696 chez les patients de l'IC/FEr, LCZ696 a été administré aux patients de l'IC/FEp. Dans une étude menée par Solomon *et al.*, des patients ayant une dysfonction diastolique avec une insuffisance cardiaque modérée (FE \geq 45%), un taux de NT-proBNP supérieur à 400 pg/ml, ont reçu au hasard le LCZ696 seul ou le valsartan seul pendant 36 semaines (Solomon *et al.*, 2012). Les résultats ont montré que le LCZ696 a réduit le taux du NT-proBNP. Une méta-analyse récente d'essais randomisés contrôlés a inclus 12 études impliquant 3816 patients et ceci afin d'évaluer les avantages du LCZ696 (Zhao *et al.*, 2017). Sept études ont comparé LCZ696 avec le valsartan et 5 études ont comparé LCZ696 avec l'olmésartan. En résumé, LCZ696 a montré une réduction plus grande de la pression artérielle systolique et diastolique que celle qui a été observée avec les ARBs. Cette méta-analyse a révélé que le LCZ696 a une plus grande efficacité antihypertensive.

c- Essais avec l'inhibiteur de l'Aldostérone

Les antagonistes des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MRA) sont connus pour améliorer l'état des patients de l'IC/FEr. En effet, plusieurs études ont évalué l'efficacité des MRA chez les patients avec une dysfonction diastolique asymptomatique, ainsi que chez des patients d'IC/FEp (Pandey *et al.*, 2015). Récemment, l'étude TOPCAT « *Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist* », n'a pas démontré une amélioration de l'état cardiovasculaire général chez les patients de l'IC/FEp (Pfeffer *et al.*, 2015). Un effet bénéfique de la spironolactone réduisant l'épaisseur de la paroi postérieure du VG chez des patients ayant une FE $>$ 50% et un taux de NT-proBNP élevé (Mottram *et al.*, 2004).

En conclusion, l'inhibition du système RAA avec l'utilisation de divers antagonistes n'a pas montré d'effets bénéfiques sur la mortalité de patients avec une IC/FEp, avec des résultats contradictoires concernant la morbidité qui peuvent être dus aux différences dans les critères adoptés dans les différents essais cliniques.

d- Le blocage des récepteurs β adrénergiques :

Partant des bénéfices apportés par l'inhibition du système nerveux sympathique chez les patients en IC systolique, l'inhibition de ce système a fait également l'objet des essais cliniques chez les patients d'IC diastolique. L'hypothèse était, ralentir la fréquence cardiaque devrait prolonger la période de remplissage diastolique et de la relaxation dans un VG rigide. Toutefois, la diminution de la fréquence cardiaque a prolongé la période *diastasis* (période situant entre le remplissage passif et actif) qui ne contribue qu'à un remplissage très faible du remplissage total (Little and Brucks, 2005). De plus, le ralentissement de la fréquence cardiaque a augmenté la prévalence de l'incompétence chronotrope qui est fortement associée à l'intolérance à l'exercice et la diminution du débit cardiaque pendant l'exercice (Phan *et al.*, 2009; Borlaug *et al.*, 2010). Ces données ont remis en question l'utilité des β -bloquants pour le traitement de l'IC diastolique.

Dans l'étude SWEDIC (« *Swedish Doppler-Echocardiographic study* »), les patients ont été traités par le Carvedilol et les paramètres de la fonction diastolique ont été suivis par échocardiographie. Après 6 mois de traitement, une amélioration significative a été observée dans le ratio E/A malgré l'absence du progrès dans d'autres paramètres comme le temps de relaxation isovolumique (Bergstrom *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que le Carvedilol a diminué le taux des peptides natriurétiques avec diminution des symptômes et augmentation de la tolérance à l'exercice (Takeda *et al.*, 2004). Une étude plus récente a montré que le Carvedilol n'a pas influencé le pronostic chez les patients de l'IC/FEp (Yamamoto *et al.*, 2013).

Le Nebivolol, bloquant spécifique du récepteur β_1 et ayant des propriétés vasodilatatrices associées à la modulation du monoxyde d'azote (NO), a induit une augmentation dans le ratio E/A chez des patients souffrant de l'hypertension et de dysfonction diastolique (Nodari *et al.*, 2003). Une plus grande étude a évalué l'effet des β -bloquants sur l'IC diastolique. Elle comprenait 2128 patients âgés de 70 ans et plus ayant été déjà hospitalisés pour l'IC, mais la majorité d'eux présentaient une IC systolique avec FE égale à 35%. Bien que les résultats aient montré une réduction de la mortalité et l'hospitalisation dans le groupe traité par rapport au placebo, aucune différence n'a été détectée dans le groupe des patients avec FE \geq 40%, impliquant que la FE ne présente pas d'influence sur les résultats de mortalité et d'hospitalisation toutes causes confondues (Flather *et al.*, 2005). Conraads *et al.* ont montré que le Nebivolol n'améliore pas la capacité d'exercice chez les patients de l'IC/FEp (Conraads *et al.*, 2012).

Les bénéfices du traitement par les β -bloquants avec leurs propriétés sous-jacentes ne sont pas jusqu'à présent mises en évidence. Des essais sont toujours en cours afin de relever le rôle des β -bloquants dans l'amélioration de l'état des patients de l'IC/FEp.

3. L'homéostasie calcique dans l'IC systolique vs l'IC diastolique

Le Ca^{2+} , est un ion universel, il joue certainement plusieurs rôles dans l'organisme. Au niveau des cardiomyocytes, le Ca^{2+} est un régulateur clé de la fonction cardiaque : il a un rôle crucial dans l'excitabilité membranaire. Il est fortement impliqué dans le couplage excitation-contraction. Dans les conditions physiopathologiques, le Ca^{2+} serait responsable de certaines altérations morphologiques ou fonctionnelles du myocarde, comme dans le développement de l'hypertrophie et la progression vers l'IC.

3.1 Le calcium dans l'IC systolique

Au cours de l'IC systolique, la contraction cardiaque est altérée avec des mouvements de Ca^{2+} intracellulaire modifiés suite à des changements majeurs dans l'expression et/ou la fonction des principales protéines impliqués dans l'homéostasie calcique :

- a) SERCA2a et phospholamban (PLN) : La diminution de la recapture calcique dans le RS contribue fortement à l'altération de la signalisation calcique dans la dysfonction systolique (Limas *et al.*, 1987; Hasenfuss, 1998). C'est un marqueur du début de la défaillance cardiaque. En effet, la diminution de l'activité de la pompe SERCA2a retarde l'élimination du Ca^{2+} cytosolique et par suite la charge normale de Ca^{2+} dans le RS pendant la phase diastolique (Morgan *et al.*, 1990). Cette altération se traduit par une augmentation du Ca^{2+} diastolique, observée dans les cœurs de patients d'IC (Morgan *et al.*, 1990) et par une réduction de la force contractile. L'élévation du Ca^{2+} diastolique est impliquée aussi dans la programmation du remodelage ventriculaire et la genèse des arythmies (ter Keurs, 2012). Plusieurs schémas ont été décrits :

- Généralement, l'expression de SERCA2a est diminuée dans les cœurs des patients de l'IC (Mercadier *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1995). La surexpression de SERCA2a par thérapie génique permet de restaurer l'homéostasie calcique normale et la fonction contractile du cœur dans des modèles animaux (Cutler *et al.*, 2012). Sur l'humain, les essais sont en phase clinique (del Monte *et al.*, 1999; Jaski *et al.*, 2009).
- La diminution de l'activité de SERCA2a peut être attribuée à l'activité inhibitrice accrue du PLN dans sa forme déphosphorylée (Schwinger *et al.*, 1995). Lorsque le PLN est phosphorylé (soit par la PKA au niveau de la ser16 ou par la CaMKII au niveau de la thr17), il s'assemble sous forme de pentamère perdant ainsi l'activité inhibitrice. Les études ont montré que la phosphorylation du PLN diminue dans les cœurs défaillants, induisant une augmentation de l'inhibition de SERCA2a (Schwinger *et al.*, 1995). En effet, la phosphorylation au niveau de la thr17 est diminuée à cause d'une augmentation de la déphosphorylation par la PP2B (ou calcineurine) malgré l'activité augmentée de la CaMKII (Munch *et al.*, 2002). De même, la phosphorylation au niveau de la ser16 est diminuée due à l'augmentation de l'activité de PP1 (Schwinger *et al.*, 1995). De plus, plusieurs mutations au niveau du gène humain du PLN ont été identifiées pouvant altérer l'expression et l'activité du PLN ; (i) deux mutations R9C et R14del semblent renforcer l'inhibition de SERCA2a (Schmitt *et al.*, 2003; Haghghi *et al.*, 2012). Ces mutations ont été associées aux cardiomyopathies dilatées et la mort précoce. (ii) Une autre mutation induisant une perte de fonction du PLN (Leu39stop) et par conséquent enlève l'inhibition exercée sur SERCA2a (Haghghi *et al.*, 2012).

Ces mutations génétiques induites chez les souris ont montré des résultats controversés. En effet, des souris *knockout* pour le PLN présentent une fonction contractile améliorée avec une augmentation de l'affinité de SERCA2a au Ca^{2+} (Luo *et al.*, 1994). Cependant, le taux de mortalité était élevé (Zhang *et al.*, 2010). Ces observations suggèrent qu'une balance entre l'activité de SERCA2a et son inhibiteur PLN est indéniable pour maintenir une activité physiologique normale et la prévention de la cardiomyopathie.

- b) Récepteurs de la ryanodine (RyR2): Dans les conditions physiologiques normales, l'ouverture de RyR2 est déclenchée par le Ca^{2+} cytoplasmique entrant par les canaux Ca^{2+} . L'activité de RyR2 est également régulée par de multiples facteurs, tels la PKA, la CaMKII,

les protéines PP1 et PP2A, la calmoduline et FKBP12.6, qui sont associées à la face cytoplasmique de RyR2. Sur du cœur humain et dans des modèles d'animaux d'IC, la phosphorylation de RyR2 par PKA augmente sa probabilité d'ouverture. Cependant l'hyperphosphorylation de RyR2 par PKA (au niveau de la ser2808) provoque sa dissociation du FKBP12.6 induisant une fuite de Ca^{2+} du RS (Marx *et al.*, 2000; Reiken *et al.*, 2003; Lehnart *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que dans les cœurs défaillants, il existe une augmentation de la sensibilité des canaux RyR au Ca^{2+} faisant des canaux RyR, des canaux « fuyants » et une charge réduite du RS.

- c) Echangeur sodium calcium (NCX) : Dans les cœurs défaillants, il a été montré que l'expression de NCX est augmentée, comme réponse à la diminution de l'activité de SERCA2a (Studer *et al.*, 1994). Ceci induit NCX à travailler dans le mode « reverse » entraînant une surcharge en Ca^{2+} intracellulaire et l'altération de la fonction diastolique (Mattiello *et al.*, 1998; Gaughan *et al.*, 1999). Ainsi, le NCX s'adapte aux altérations de SERCA2a et du PLN tout en contribuant à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire.
- d) Canaux LTCC : Dans la majorité des cas d'IC, l'expression des canaux LTCC semble inchangée ou réduite (Hasenfuss, 1998). En effet, Shröder et al ont démontré une augmentation dans la disponibilité et dans la probabilité d'ouverture des canaux LTCC isolés des cœurs défaillants (Schroder *et al.*, 1998). De plus, une autre étude a rapporté que l'expression des canaux LTCC fut réduite dans l'IC bien que le courant ait été maintenu en raison d'une augmentation de leurs niveaux de phosphorylation (Chen *et al.*, 2002).

3.2 Le calcium dans l'IC diastolique :

Contrairement à l'IC systolique, il y a peu d'informations concernant l'homéostasie calcique, et le CEC de l'IC diastolique. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la surcharge calcique intracellulaire : une augmentation de la sensibilité des sarcomères au Ca^{2+} , une diminution du taux de la recapture du Ca^{2+} dans le RS par SERCA2a et son extrusion par le NCX.

SERCA2a et PLN : Des approches multiples ont été utilisées pour modifier la fonction de PLN et de SERCA2a dans le but d'améliorer la signalisation calcique et par suite la fonction diastolique. L'inactivation du PLN ou la réduction de son expression ont été utilisées dans plusieurs modèles

animaux (ligature aortique) pour enlever l'inhibition de SERCA2a. Des améliorations de la fonction diastolique, y compris la pression diastolique du VG et de la recapture ont été observées (Hoshijima *et al.*, 2002; Iwanaga *et al.*, 2004; Kaye *et al.*, 2007). La surexpression de SERCA2a en vue de l'augmentation du ratio SERCA2a/PLN et l'effet sur la relaxation n'a pas été reporté.

Récepteurs de la ryanodine (RyR2) : Comme décrit précédemment, la fuite à travers le RyR marque l'altération de la fonction diastolique : une augmentation du Ca^{2+} diastolique empêche la relaxation et l'augmentation du transitoire génère des arythmies. Des mutations génétiques dans RyR2 ou dans l'un de ces régulateurs peuvent causer une augmentation de la fuite de Ca^{2+} , une de la libération diastolique de Ca^{2+} , des arythmies et une mort subite (Lehnart *et al.*, 2008; Roux-Buisson *et al.*, 2012).

Echangeur sodium calcium (NCX) : Une augmentation de l'expression du NCX a été corrélée à une amélioration de la fonction diastolique chez des cœurs humains défaillants (Hasenfuss *et al.*, 1999). Dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le lapin, des améliorations des paramètres systoliques ont été observées deux semaines après l'administration d'adénovirus contenant du NCX (Ad-NCX), mais des paramètres diastoliques incluant la pression diastolique du VG n'ont pas été améliorés (Munch *et al.*, 2006).

Problématique et Objectifs

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de mortalité dans les pays développés. Chaque année, 17.7 millions de personnes en meurent ; ce qui constitue 31% de la mortalité globale (Organisation Mondiale de la Santé). L'IC, plus spécifiquement, touche 1-3% de la population. Elle est la principale cause d'hospitalisation chez les adultes (McMurray *et al.*, 2012).

L'IC est une pathologie très hétérogène, manifestée comme une maladie complexe. Elle a longtemps été associée à une altération de la performance systolique du ventricule gauche. Ces dernières années, les cardiologues ont pourtant identifié un "nouveau" sous-type d'IC caractérisé par une altération de la fonction diastolique. Les mécanismes impliqués dans l'induction et la progression de l'IC diastolique restent mal connus ; ce qui rend difficile le diagnostic à un stade précoce et la prise en charge de cette pathologie.

Il est connu actuellement, que les mécanismes qui engendrent la dysfonction diastolique peuvent impliquer des facteurs affectants, soient les cardiomyocytes et/ou la matrice extracellulaire, soit le système vasculaire tels que les peptides natriurétiques (Hogg *et al.*, 2004). Cependant, les déterminants cellulaires des stades très précoces restent mal compris. Au niveau du cardiomyocyte, le Ca^{2+} , est un ion clé de la fonction cardiaque, notamment par son rôle d'acteur majeur dans le couplage excitation-contraction en conditions normales et pathologiques (Piccini *et al.*, 2004). En effet, l'homéostasie calcique se trouve altérée et fortement impliquée dans le développement et la progression de l'IC (Gorski *et al.*, 2015). Au cours de l'IC systolique, la performance contractile cardiaque est réduite. Elle est associée à des mouvements de Ca^{2+} intracellulaire modifiés dus à des changements critiques dans l'expression ou la fonction de certaines protéines de l'homéostasie calcique (SERCA2a, RyR2, NCX). La charge anormale du RS en Ca^{2+} pendant la phase diastolique empêche la libération normale du Ca^{2+} via les RyR2 pendant la systole, affaiblissant ainsi la fonction contractile et allant jusqu'à la genèse des arythmies fatales. Toutefois, il existe peu d'informations concernant l'homéostasie calcique dans l'IC diastolique. Les mécanismes qui soutiennent l'homéostasie calcique restent ambigus et mal connus (Asp *et al.*, 2013). Pour apporter notre pierre à l'édifice des connaissances dans ce domaine, les objectifs du présent travail étaient :

- Evaluer, dans un premier temps, *in vivo*, sur un modèle de rat adulte par constriction de l'aorte abdominale, la dysfonction diastolique grâce à des investigations échocardiographiques à haute résolution. Ce travail a constitué une base importante et critique des travaux puisqu'il constituait un préalable essentiel à une étude sérieuse permettant de cibler les modifications liées spécifiquement à l'IC/FEp.

- Etudier, dans un deuxième temps, les composantes cellulaires et moléculaires impliquées dans la pathogenèse de l'IC/FEp (IC diastolique) plus particulièrement l'homéostasie calcique et les protéines potentiellement impliquées dès les stades les plus précoces de la pathologie, c'est à dire avant l'apparition des premiers symptômes.

Pour faire progresser la prise en charge thérapeutique des patients de l'IC/FEp, la compréhension des mécanismes physiopathologiques s'avère cruciale. Après avoir exploré les aspects de signalisation calcique, il est indéniable que nos données nous ont orienté vers une implication de la signalisation sodique dans l'IC/FEp. Un troisième objectif s'est imposé, à savoir :

- Etudier l'effet de la Ranolazine (inhibiteur des courants sodiques soutenus) sur les paramètres de relaxation au niveau cellulaire.

Matériels et Méthodes

1. Modèle animal et protocole expérimental

Un large éventail de modèles animaux a été utilisé pour étudier les mécanismes de l'IC diastolique, toutefois, ces modèles restent controversés (Conceicao *et al.*, 2016).

Induction de la dysfonction diastolique par surcharge de pression

Parmi les modèles suggérés, nous avons choisi de travailler sur le modèle de sténose aortique chez le rat car ce modèle crée une surcharge de pression et permet de préserver la fraction d'éjection qui est un critère essentiel d'une insuffisance cardiaque diastolique. Les rats utilisés sont des rats mâles albinos non consanguins, souche *Wistar*, provenant des laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Les animaux suivent un rythme quotidien régulier de 12h de luminosité et 12h d'obscurité (période d'activité des rongeurs) et ont accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture. Afin de développer la surcharge de pression, des rats adultes âgés de 6 semaines (150-200 g), ont été anesthésiés avec de la kétamine intrapéritonéale (120 mg/kg) et de la xylazine (8 mg/kg). L'aorte abdominale située au-dessus des artères rénales a été resserrée au niveau supra-rénal. La ligature a été effectuée en attachant le vaisseau contre une aiguille de 21 gauge en appliquant une suture à l'aide d'un fil de soie (**Figure MM1**). L'aiguille a ensuite été retirée. Ce groupe de rats est appelé groupe AAB, pour « *Abdominal Aortic Banding* ». Les rats « contrôles » ou « Sham » ont subi une procédure identique, mais sans ligature de l'aorte abdominale.

Ainsi, l'étude *in vivo* a été menée sur 2 groupes d'animaux, le groupe control désigné par « Sham », et le groupe ayant subi la sténose de l'aorte abdominale désigné par AAB.

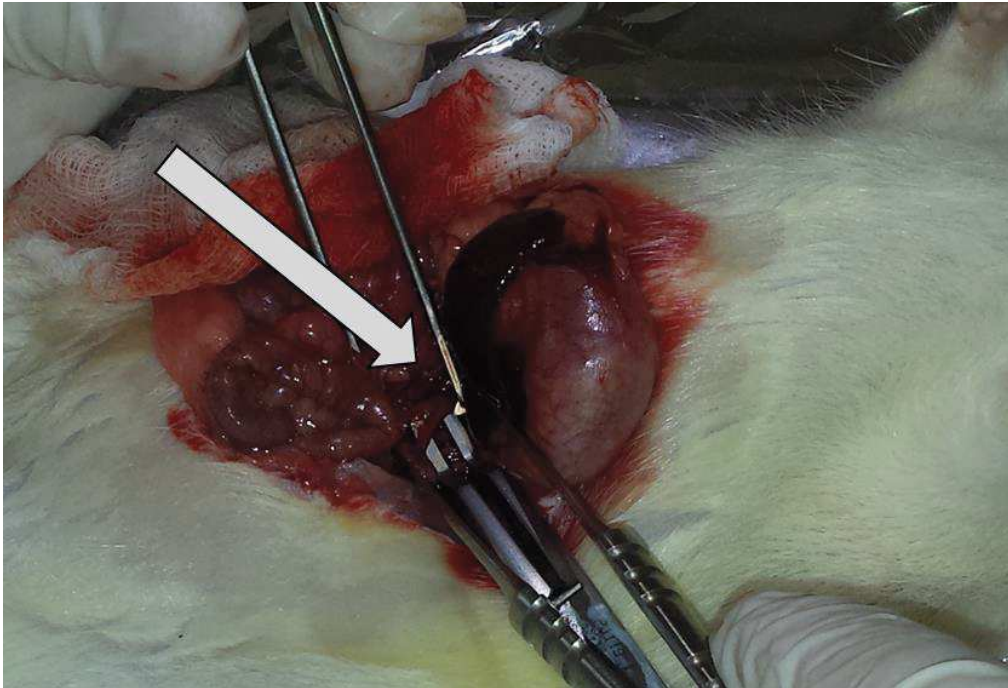


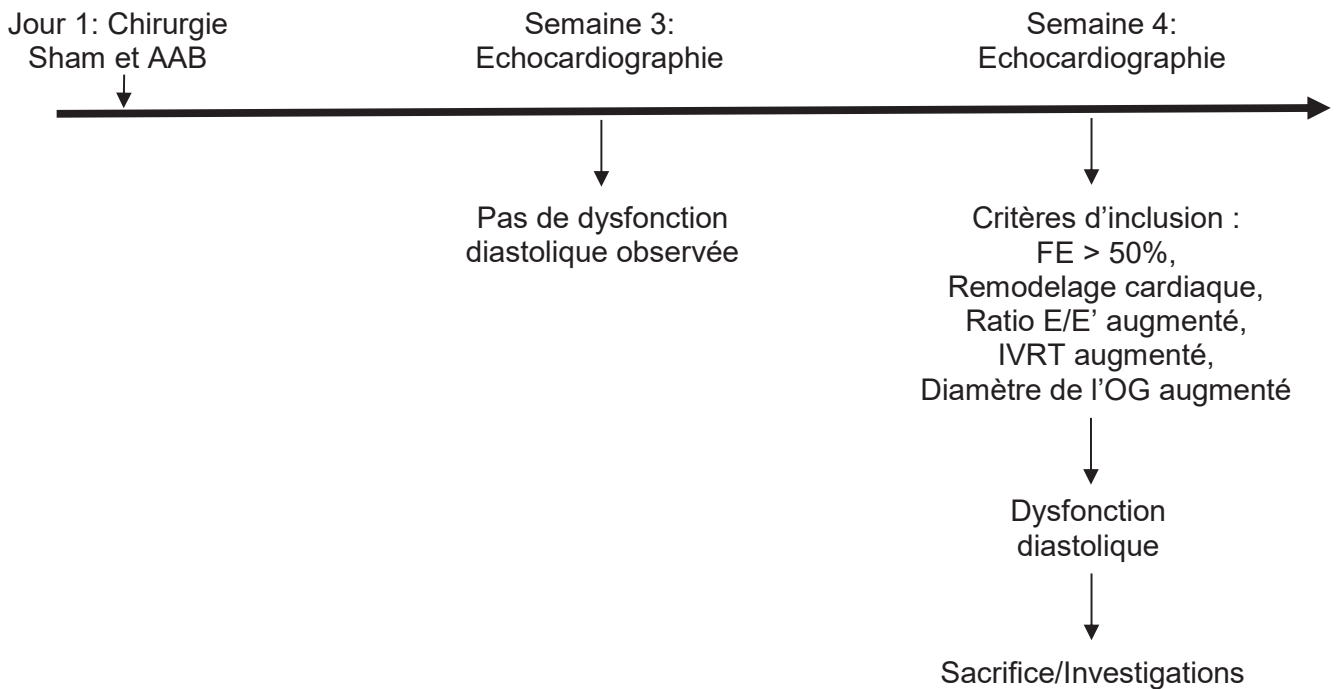
Figure MM 1 : Photographie montrant la Ligature de l'aorte abdominale au niveau supra-rénal juste avant la bifurcation (Flèche blanche).

Tous les protocoles sont conformes à la Directive 2010/63/UE du parlement européen et au conseil du 22 Septembre 2010 pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (accord : A34-172-38, projet APAFIS # 3428).

Protocole expérimental

La morphologie et la fonction cardiaques ont été évaluées par échocardiographie pour identifier un dysfonctionnement diastolique précoce. Le dysfonctionnement diastolique a été observé uniquement à 4 semaines après la chirurgie. Aucune modification claire n'a été démontrée trois semaines après la chirurgie. Les analyses expérimentales ultérieures ont été effectuées uniquement sur des rats caractérisés par une fraction d'éjection préservée et des caractéristiques de dysfonction diastolique (« critères d'inclusion ») 4 semaines après la chirurgie.

Voici, sous forme d'un diagramme, le parcours expérimental suivi dans cette étude :



2. Suivi hémodynamique

2.1 Echocardiographie

Une série d'échocardiographies ont été effectuées à la troisième semaine et la quatrième semaine après la chirurgie, afin de suivre le remodelage cardiaque résultant de la sténose aortique et d'exclure tout animal n'ayant pas développé une dysfonction diastolique. La fonction cardiaque a été évaluée par un système d'échocardiographie à haute résolution (*Vevo 2100, Fujifilm VisualSonics*) accompagné d'une sonde 21 MHz. Les rats, anesthésiés avec 2,5 à 3% d'Isoflurane pour maintenir une fréquence cardiaque physiologique (353 ± 23 bpm), sont placés sur une plaque thermo-chauffante. La température corporelle des animaux est contrôlée à l'aide d'une sonde rectale afin qu'elle soit maintenue à 37°C. Un ECG de surface est également effectué à l'aide d'électrodes placées sur les membres.

La fonction systolique est évaluée avec les mesures classiques du ventricule gauche en images 2D au niveau des muscles papillaires selon une coupe parasternale petit axe et long axe : les épaisseurs des parois antérieures (AWT) et postérieures (PWT), les diamètres du VG (LVID) en fin de diastole et en fin de systole sont obtenus avec des images en mode M. La fraction d'éjection (FE en %) ainsi que la fraction de raccourcissement (FS en %) sont calculées selon la méthode de

Teicholz à partir des volumes et des diamètres de la cavité ventriculaire lors de la diastole et de la systole mesurés selon une coupe parasternale axe long (**Figure MM2**).

Rappelons la formule permettant d'obtenir la FE :

$$FE = (EDV - ESV)/EDV * 100$$

Avec EDV : « *End Diastolic Volume* », volume télédiastolique et ESV : « *End Systolic Volume* ».

La FS est calculée à partir des diamètres du VG :

$$FS = (LVIDd - LVIDs)/LVIDd * 100$$

Avec LVIDd : « *Left ventricular Internal Diameter during Diastole* », diamètre du VG durant la diastole et LVIDs « *Left ventricular Internal Diameter during Systole* », diamètre du VG durant la systole.

L'indice d'épaisseur de paroi (RWT : « *Relative wall thickness* ») a été calculé suivant :

$$RWT = (IVSd + PWTd) / LVIDd$$

Avec IVS : « *Interventricular Septum* », septum inter-ventriculaire ; PWT : « *Posterior Wall Thickness* », épaisseur de la paroi postérieure.

Afin de mieux caractériser la fonction du VG, la FE est également évaluée en traçant la zone endocavitaires en mode B axe long (cine loops). Le volume d'éjection est évalué en mesurant la vitesse d'écoulement de l'aorte (AoVTI). La fonction diastolique du VG est évaluée en utilisant le signal Doppler pulsé du flux mitral et, suivant les recommandations EAE/ASE pour l'évaluation de la fonction diastolique par échocardiographie. La vitesse du pic de remplissage diastolique précoce (E) et la vitesse du pic de remplissage à la contraction auriculaire (A) sont mesurées, et le rapport E/A est calculé pour caractériser le remplissage du VG. La vitesse de déplacement longitudinal de l'anneau mitral (E' et A'), moins dépendant des conditions de précharge, est déterminée par Doppler tissulaire (TDi) et par suite le ratio E/E' est calculé comme indicateur de pression en fin de diastole. En outre, pour caractériser finement le flux du VG, les temps de

décélération de l'onde E (MV decel. Time : « *Mitral Valve Deceleration time* »), de contraction (CT : « *contraction time* »), de relaxation isovolumique (IVRT : « *Iso Volumic Relaxation Time* », et d'éjection (ET : « *Ejection Time* ») sont mesurés pour calculer l'indice de performance myocardique (MPI : « *Myocardial Performance Index* ») d'après la formule :

$$MPI = (IVRT + IVCT) / \text{mitral valve ET}$$

L'oreillette gauche joue un rôle clé dans la fonction diastolique en modulant le remplissage du VG, et une rigidité a été rapportée chez les patients en IC/FEp. Par conséquent, un suivi du remodelage de l'OG a été effectué en mesurant le diamètre de l'oreillette suivant un axe long (mode M). Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata pour chaque animal. La détection d'altérations précoces est une étape clé de l'étude. Les animaux ayant les critères d'inclusion cités précédemment sont retenus pour la suite de l'étude.

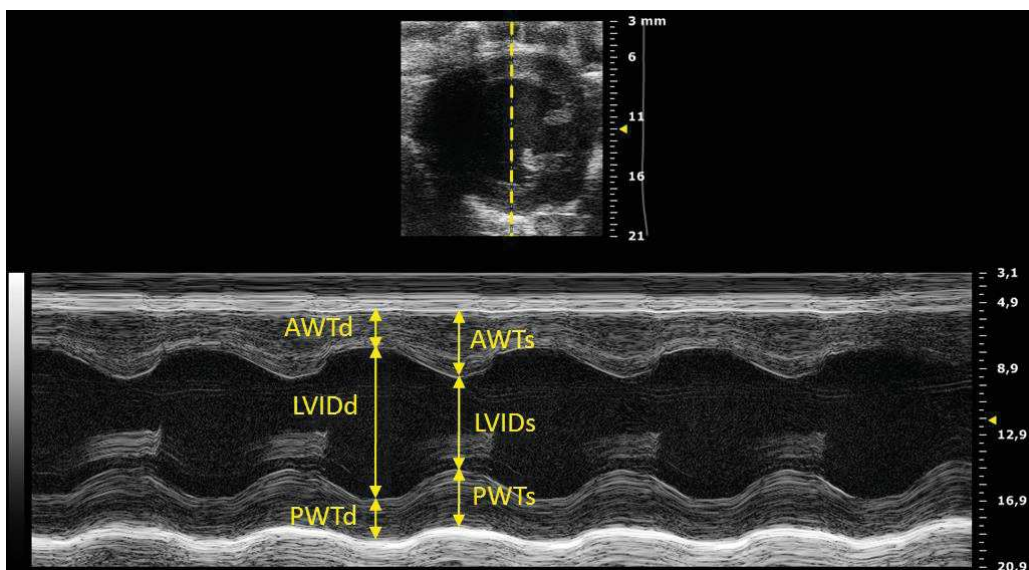


Figure MM 2 : Illustration d'échocardiographie réalisée au niveau du VG chez un rat Sham, montrant la cavité cardiaque en phase de diastole (panneau supérieur). Coupe parasternale montrant les mesures réalisées en phase de diastole et systole (panneau inférieur). Illustrations acquises lors des travaux réalisés dans notre laboratoire.

2.2 Mesure des pressions artérielle et intra-ventriculaires

Les rats ont été anesthésiés avec de l'Isoflurane (1,5-2,5%) et placés en décubitus dorsal sur un plateau thermo-chauffant automatique. La température corporelle, mesurée par une sonde rectale, a été maintenue à 37 ° C tout au long de la procédure. Des mesures invasives de la pression artérielle et de la pression intra-ventriculaire systoliques et diastoliques gauches ont été effectuées en utilisant un cathéter à pression à micro-pointes (modèle : SPR407, 2F ; *Millar Instruments, Houston, Tx*), introduit dans l'artère carotide droite (**Figure MM3**). Le cathéter a ensuite été avancé dans le VG pour mesurer les pressions systolique et diastolique. Les mesures analogiques de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ont été collectées avec un module MP35 (*Biopac System, Gotela, Santa-Barbara, CA*). Les données ont été traitées à l'aide du logiciel « *BIOPAC Lab Pro 3.7* ». Après les mesures hémodynamiques, les cœurs ont été excisés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide, puis conservés à -80 °C. Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire, Pôle Sport et Recherche, UFR Sciences, Technologies Santé, Université d'AVIGNON.

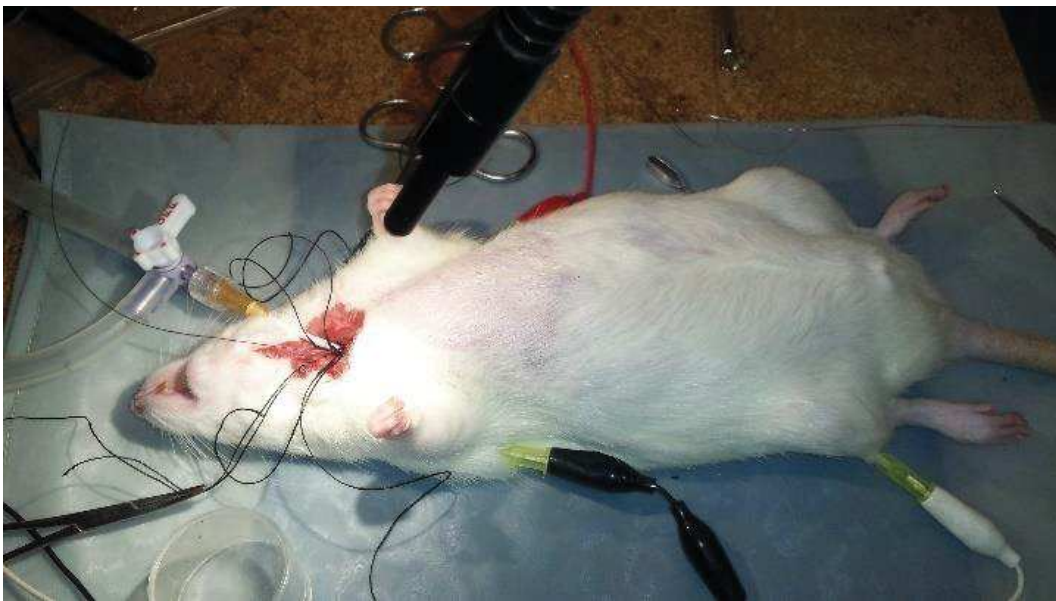


Figure MM 3 : Photographie prise au Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire au moment de la mesure des pressions artérielles et intra-ventriculaires.

La mesure invasive a été effectuée sur les rats ayant la cage thoracique intacte fermée. Les électrodes placées sur l'animal ont fourni un enregistrement ECG tout au long de l'expérience pour le suivi de l'activité électrique du cœur.

3. Etude in vitro sur des cardiomyocytes isolés

3.1 Isolement et dissociation enzymatique des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont été isolés enzymatiquement à partir du VG selon la technique de Langendorff, mis au point par Oscar Langendorff en 1895. Elle permet d'obtenir des cellules ventriculaires fraîchement isolées des cœurs des rats contrôles « Sham » et AAB. Le but est de mener l'étude sur des cellules « fraîches » ayant conservées la fonctionnalité native.

Le principe de cette technique consiste à perfuser le cœur avec une solution en canulant l'aorte. La solution de perfusion coule dans les coronaires, la valve aortique étant fermée sous l'effet de pression. La pompe péristaltique reliée au système assure une pression positive à débit constant (4 ml de solution/min). Le système est également relié à un bain-marie afin de maintenir le système à température physiologique de 37°C (**Figure MM4**).

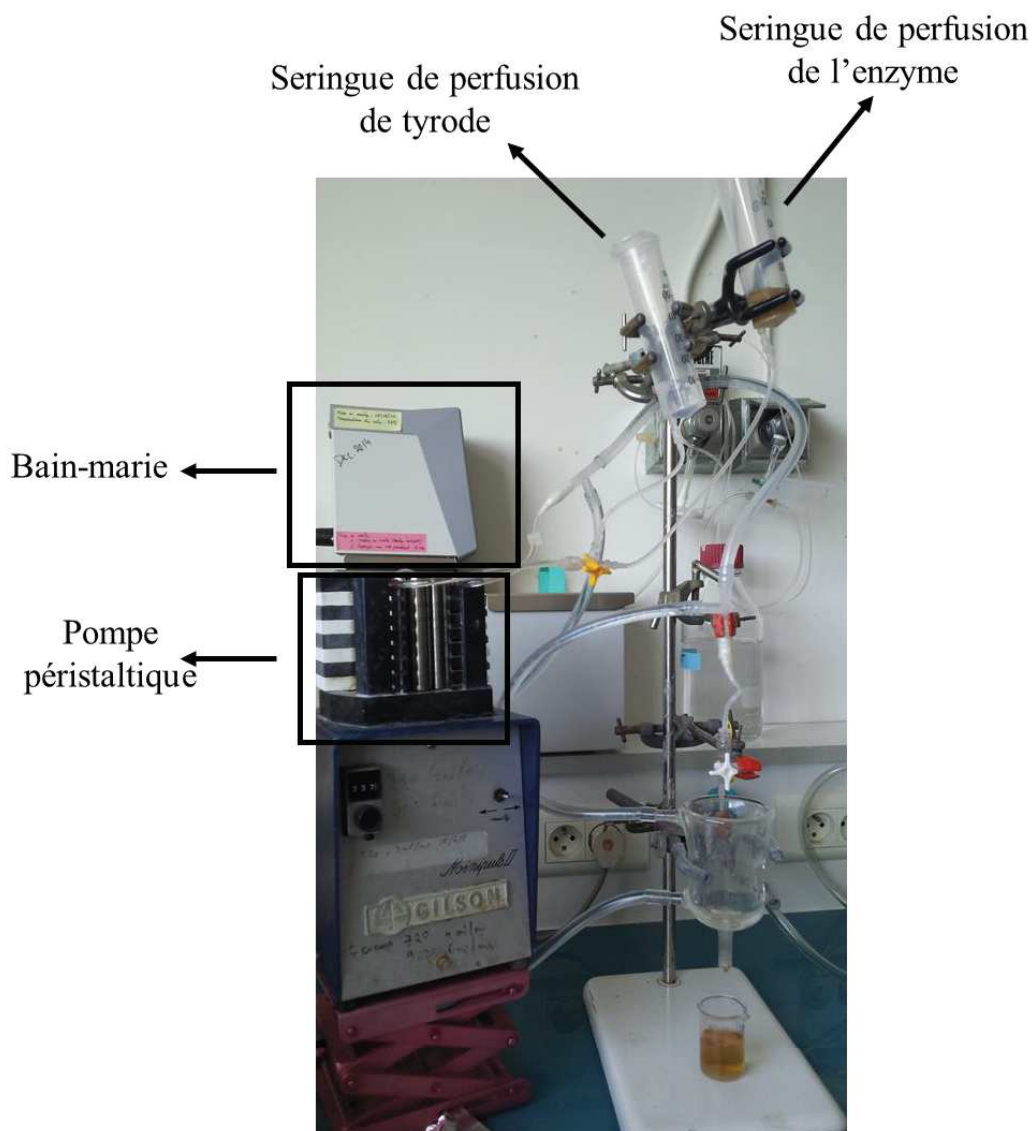


Figure MM 4 : Dispositif du système de perfusion de Langendorff utilisé dans notre laboratoire.

La dissociation cellulaire comprend plusieurs étapes :

1. Dissection : La première étape consiste à prélever le cœur du rat. L'animal est pesé et puis reçoit une dose létale intrapéritonéale de pentobarbital sodique avec de l'héparine pour éviter la coagulation sanguine. Une incision est réalisée au niveau du thorax et le cœur est prélevé en vérifiant que la coupe ait lieu bien au-dessus de l'aorte afin d'avoir une longueur suffisante pour la canulation. Le cœur est ensuite rincé dans la solution de dissociation (116 mM de NaCl,

6 mM de KCl, 4 mM de NaHCO₃, 1,5 mM de KH₂PO₄, 1,7 mM de MgCl₂, 21 mM d'HEPES, 20 mM de taurine et 12 mM de glucose, pH 7,15) dépourvue de Ca²⁺. Le cœur est séparé de tout autre organe ou tissu et est ensuite pesé.

2. Canulation : Une fois l'artère dégagée, le cœur est canulé jusqu'à la base de l'aorte. Le cœur est tout d'abord attaché à la canule par un clamp puis fixé à l'aide d'un fil (**Figure MM5**). Le rinçage s'effectue par la perfusion de la solution de dissociation à laquelle est ajouté un inhibiteur de protéases, l'E-64d (10 μM, Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) pour éviter toute dégradation protéique susceptible d'endommager les cellules. La solution de dissociation est placée dans une des 2 seringues et perfusée jusqu'à ce que les coronaires soient vidés du sang (**Figure MM4**).

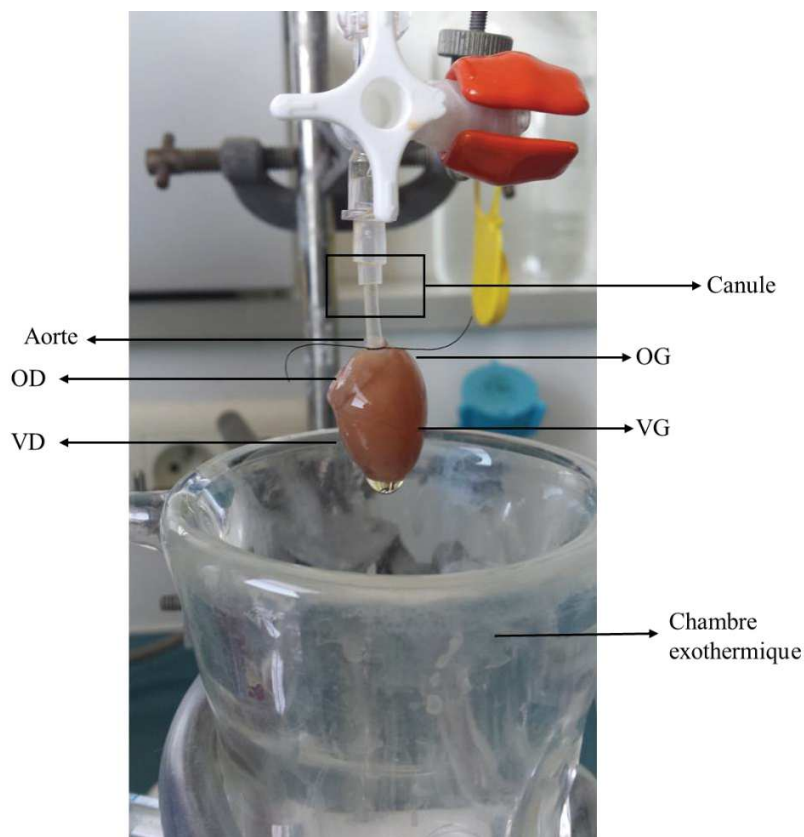


Figure MM 5 : Photographie du cœur de rat canulé en cours de digestion enzymatique.

3. Digestion enzymatique : Après l'étape du rinçage débute la digestion enzymatique. La solution de dissociation contenant la collagénase de type VI (*Worthington, Entraigues, France*) est versée dans la deuxième seringue. Le cœur est perfusé ainsi par la solution enzymatique dont le rôle est de dégrader les liaisons intercellulaires de la matrice extracellulaire assurées principalement par le collagène. Le temps de digestion dépend de l'échantillon (cœur sain ou remodelé) mais dure environ entre 20 et 30 minutes. Pour vérifier la digestion, on insère une pince aux extrémités fines dans la paroi du cœur ; aucune résistance ne doit être relevée avec la présence d'un aspect filamenteux et d'une couleur assez claire au niveau du ventricule.

4. Dissociation mécanique : Le cœur est ensuite détaché de la canule en coupant au-dessus des oreillettes et puis placé dans une boîte de pétri contenant la même solution mais à laquelle est ajoutée de l'albumine de sérum bovin (BSA 15mM) et du 2,3-butanédione monoxime (BDM 10 mM), toujours en absence de Ca^{2+} . Les oreillettes et le ventricule droits sont ensuite séparés du ventricule gauche. Le VG est alors découpé en petits morceaux et des aspirations successives à l'aide d'une pipette pasteur sont effectuées pour libérer les cellules. La solution contenant les cellules est ensuite déposée sur un filtre en nylon afin de retenir les morceaux non dissociés.

5. Retour calcique : La présence du Ca^{2+} est indispensable pour conserver l'homéostasie cellulaire. Un retour calcique brutal est nuisible pour les cellules. Pour cette raison, le retour s'effectue graduellement. Les cellules sont placées successivement dans les solutions de dissociation contenant des concentrations calciques croissantes ; 0.15 mM, 0.3 mM, 0.6 mM, et 1 mM avec des concentrations de BDM décroissantes.

3.2 Mesure des paramètres de la contraction et du transitoire calcique

L'évaluation de la contractilité et du flux calcique dans les cellules fraîchement dissociées est une étape clé dans notre étude. Les variations du flux calcique et de la contraction du sarcomère suivant les variations de fluorescence ont été enregistrées avec le système spectrofluorimétrique IonOptix® (Milton, USA) relié à un microscope photonique inversé (Zeiss, objectif x40 à huile, 0,36 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) équipé d'une caméra numérique (250 Hz) et de deux photomultiplicateurs.

L'ensemble est disposé sur une table antivibratoire afin de limiter les artéfacts de manipulation (**Figure MM6**).



Figure MM 6 : Le système IonOptix. Image obtenue d'après www.ionoptix.com

Pour ce faire, les cardiomyocytes sont tout d'abord incubés en présence de la sonde fluorescente « Indo-1AM » (pendant 10 minutes). L'Indo-1AM est une sonde calcique ratiométrique qui est excitée dans l'UV à une longueur d'onde de $\lambda = 350$ nm. Elle émet à une longueur d'onde $\lambda = 405$ nm lorsqu'elle est liée au Ca^{2+} et à une longueur d'onde $\lambda = 480$ nm lorsqu'elle n'est pas liée au Ca^{2+} . Le groupement acétoxyméthylester (AM) rend la sonde lipophile lui permettant de traverser la membrane plasmique où des estérases intracellulaires clivent le groupement, piégeant la sonde dans le cytoplasme.

Les cellules sont ensuite transférées dans la solution de Tyrode d'acquisition des données expérimentales (140 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 , 5 mM d'HEPES, 1,8 mM de CaCl_2 et 11 mM de glucose, pH 7,4). Les cardiomyocytes sont ensuite placés dans une cuve à fond de lame en verre (MatTek corporation) où deux électrodes de platine assurent la stimulation électrique de champ. L'excitation de l'indo-1AM est assurée par une lampe Xénon (75W, λ_{300} nm à λ_{700} nm). Le logiciel *IonWizard* couplé au système détermine le ratio de fluorescences λ_{405} nm/ λ_{480} nm afin de fournir une approximation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (comprise

entre 5 nM et 30 μ M). L'expérimentation est effectuée dans la lumière rouge pour ne pas altérer la fluorescence émise par la sonde qui présente un pouvoir chélateur important sur le Ca^{2+} .

Concernant la mesure de la contraction, les cellules sélectionnées doivent présenter une striation nette (représentant les sarcomères) et une apparence de bâtonnets avec des bordures non arrondies reflétant le bon état de la cellule. Une fenêtre d'acquisition en temps réel permet de sélectionner une zone sarcomérique (Figure MM7). La mesure s'appuie sur l'alternance de bandes claires et sombres définies par les myofilaments contenus dans la fenêtre, cette alternance pouvant être assimilée à une fonction périodique T dans l'espace. Une transformée de Fourier rapide (FFT pour *Fast Fourier Transformation*) est appliquée par le système sur cette période T et transforme le signal en son inverse, soit une fréquence 1/T. La FFT transforme le signal périodique en un spectre de fréquences dont la valeur fondamentale est inversement proportionnelle à la distance moyenne entre deux sarcomères. L'acquisition est réalisée toutes les 10 ms (120 Hz), durée nettement inférieure à la durée de la contraction d'un cardiomyocyte de rongeur qui est de l'ordre de 200 à 300 ms.

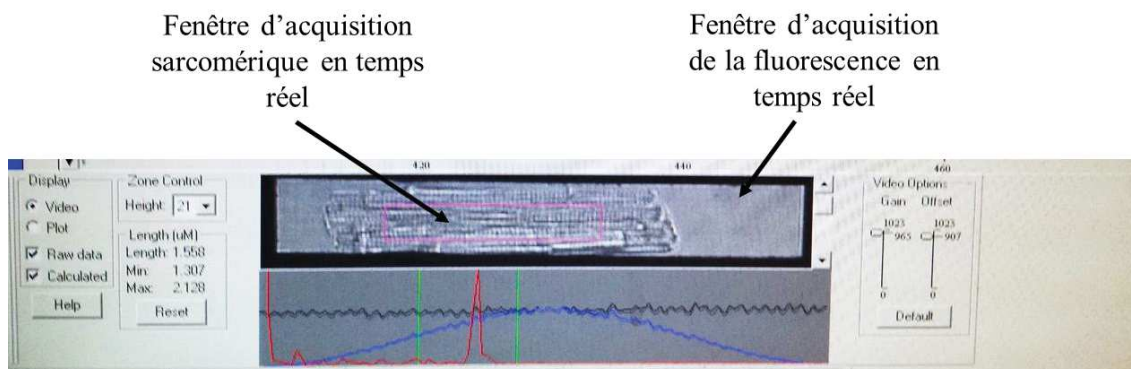


Figure MM 7 : Acquisition obtenue lors de nos travaux. Le cardiomyocyte ventriculaire du rat en présence de l'indo-1AM.

Avant de commencer l'enregistrement, une stimulation de la cellule sélectionnée est effectuée pour assurer le bon conditionnement du milieu (10 à 15 secondes). Les cellules sont stimulées tout d'abord à 0,5 Hz et puis à 1 Hz et ceci suivant un protocole particulier qui consiste en une stimulation pendant des périodes de 20 secondes, suivies de 10 secondes de repos (à 0.5 Hz) et des

stimulations pendant des périodes de 10 secondes, suivies de 10 secondes de repos (à 1 Hz). La période de repos est nécessaire pour permettre la visualisation d'évènements calciques ectopiques en diastole ; évènements considérés comme potentiellement arythmogènes.

En fin d'enregistrement, un "puff" (application nette, et rapide et maintenue directement dans l'environnement de la cellule) de caféine (agoniste puissant du RyR2, 10 mM) est appliqué en absence de stimulation électrique afin de vider le RS. Les mêmes enregistrements ont été effectués en présence d'Isoprotérénol (0.1 mM ajouté en puff). La concentration de Ca^{2+} cytosolique a été obtenue en mesurant le rapport de fluorescence F_{405}/F_{480} . Les données ont été analysées à l'aide du logiciel *IonWizard 6.4*. (**Figure MM8**).

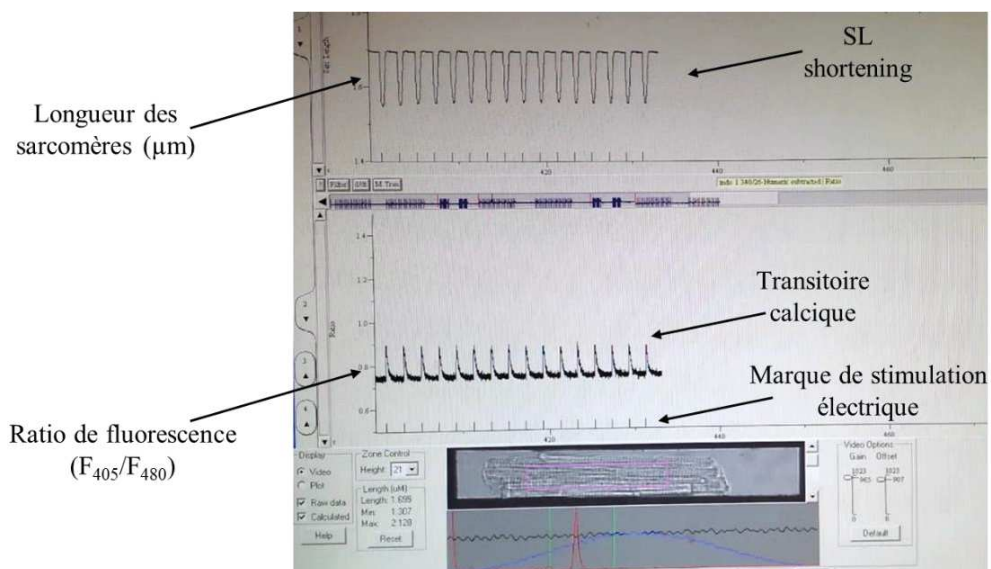


Figure MM 8 : Les enregistrements des variations de fluorescences ainsi que les variations de la longueur des sarcomères en temps réel acquis grâce au système d'IonOptix dans notre laboratoire.

3.3 Mesures des libérations spontanées de Ca^{2+} en diastole : les Ca^{2+} sparks

Pour observer les événements calciques de plus près, l'activité de RyR2 a été évalué en enregistrant les libérations spontanées de Ca^{2+} en diastole (ou Ca^{2+} sparks pour étincelles de Ca^{2+}) dans les cardiomyocytes quiescents par imagerie confocale. Les mesures ont été réalisées en microscopie à fluorescence par l'intermédiaire d'un microscope confocal inversé à balayage laser (*Zeiss*

LSM510 Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany), avec un objectif x63/1,4 à immersion dans l'eau couplé à une lampe Argon. La microscopie confocale permet d'obtenir des images nettes à de faibles profondeurs de champ grâce à la présence d'un sténopé (*pinhole*) devant le détecteur.

Les sparks Ca^{2+} correspondant aux fuites calciques émises par RyR2 ont été quantifiés dans les cardiomyocytes fraîchement isolés préalablement chargés avec une sonde calcique non ratiométrique, le fluo-4AM (4 μM , *Molecular Probes, USA*). Tout comme pour l'indo-1AM, le groupement AM permet au fluo-4AM de traverser la membrane cytoplasmique. Le fluo-4AM lie le Ca^{2+} intracellulaire avec une affinité plus importante que celle de l'indo-1AM ce qui nous permet de détecter de faibles mouvements calciques tels que les Ca^{2+} sparks. Le fluo-4AM possède une seule longueur d'onde d'excitation $\lambda = 488 \text{ nm}$ et l'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe-haut de 505 nm lorsque la sonde est liée au Ca^{2+} .

Les cardiomyocytes isolés sont placés dans une cuve à fond de lame de verre (*MatTek corporation*) contenant une solution physiologique de Tyrode d'acquisition (même composition de celle utilisée en IonOptix, 1 mM de CaCl_2). La cellule sélectionnée est tout d'abord observée en option « fast XY » sous stimulation du laser (observation en temps réel de la fluorescence) afin d'effectuer la mise au point. Le cardiomyocyte a été ensuite stimulés à 1 Hz avec des impulsions de courant de 1 ms délivrées par l'intermédiaire de deux électrodes de platine, une de chaque côté de la chambre de perfusion ; ceci afin de rééquilibrer les échanges calciques et l'homéostasie ionique suite à la longue période de repos inhérente au processus d'isolement des myocytes. Pendant la période de repos qui suit la stimulation, le cardiomyocyte est balayé linéairement de façon répétée sur toute la longueur de la cellule à des intervalles de 1,5 ms pendant un maximum de 6 secondes. L'intensité du laser a été réduite à 5% pour éviter le « *photobleaching* » et les dommages cellulaires. Les diagrammes de balayage linéaire ont été construits en empilant des lignes d'émission, correspondant à des balayages d'excitation en temps réel. Une moyenne de Ca^{2+} sparks a été déterminée par l'intensité de chaque ligne de balayage séquentiel et en traçant l'intensité moyenne (de 10 enregistrements) en fonction du temps. Le *plug-in SparkMaster* pour le logiciel *ImageJ* a été utilisé pour détecter et analyser les Ca^{2+} sparks (**Figure MM9**).

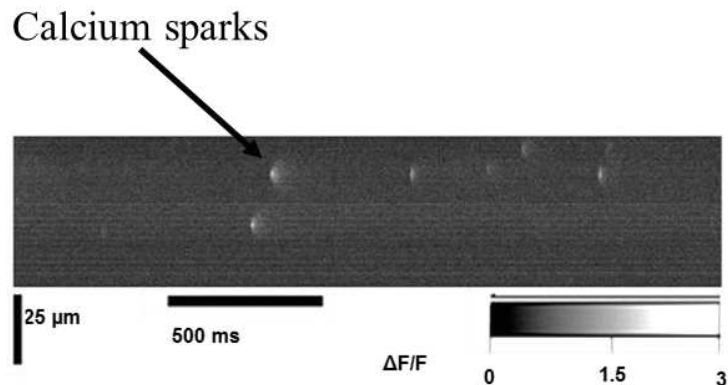


Figure MM 9 : Acquisition obtenue par microscopie confocale en mode line scan en présence de fluo-4AM où des Ca^{2+} sparks peuvent être mesurés. L'acquisition est obtenue au cours de nos travaux.

3.4 Etude de la fonction contractile des cardiomyocytes : mesure des forces passive et active dans les cardiomyocytes perméabilisés

Les forces, active et passive, ont été mesurées dans des cardiomyocytes isolés perméabilisés. Un fragment de myocarde congelé du VG (environ 25 mg) a été décongelé dans une solution intracellulaire relaxante ou « pCa 9 » ($[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-9}$ M) sur glace, contenant des antiprotéases et 1% de Triton X100 (pH = 7.1, ajusté avec de l'acide acétique) pendant 5 min (voir **Tableau 4** pour la composition de la solution). Le tissu a été coupé en petits morceaux avec des ciseaux et fragmenté à l'aide d'un homogénéisateur de tissu (Ultra-Turrax, 3000 tour/min) pendant 2 à 3 secondes. Le broya est ensuite filtré afin de séparer les tissus non dissociés des cellules. La suspension de cellules obtenue est perméabilisée à température ambiante avec de la solution relaxante contenant 0.3 % de Triton X100, pendant 5 min sous agitation. Pour éliminer le Triton X100, les cellules sont ensuite rincées 3 fois par lavages successifs avec de la solution relaxante froide. Les cellules sont maintenues dans la glace dans la solution relaxante pour la suite des expérimentations.

La cellule perméabilisée est attachée à deux pointes en acier à l'aide de micromanipulateur (modèle MP 285, *Sutter Instrument, Novato, USA*) avec de la colle optique (NOA 63, *Norland products Inc, North Brunswick, NJ*) qui se polymérise suite à l'exposition aux UV pendant 2 minutes. La

pointe de gauche est reliée à un capteur de force (modèle AE801, *SensoNor a.s., Horten, Norvège*) qui mesure la tension isométrique développée par la cellule en réponse aux différentes solutions activatrices (tension active), ou en réponse à un changement de longueur de la cellule (tension passive) (voir Tableau 4 pour la composition de la solution). La longueur du sarcomère est mesurée en temps réel à une fréquence 60 Hz avec le système IonOptix® (Milton, MA, USA), en utilisant la transformée de Fourier rapide sur les images vidéo de la cellule. La force a été normalisée par rapport à la section transversale mesurée par imagerie avec un système IonOptix® (Milton, MA, USA) connecté à un microscope à fluorescence inversé. Les forces actives ont été mesurées soit en perfusant les cellules avec des concentrations calciques croissantes (de 1 nM à 32 μ M) à 1,9 et 2,3 μ m de longueur. La tension passive est mesurée en étirant les cellules de 1,9 à 2,3 μ m dans la solution relaxante.

	Solution relaxante (pCa 9)	Solution activatrice (pCa 4.5)
Imidazole	30 mM	30 mM
Na-acetate	10 mM	10 mM
K-acetate	120 mM	120 mM
Mg-Acetate	4.2 mM	4.2 mM
CaK₂ EGTA	0.04 mM	10 mM
K₂ EGTA	10 mM	10 mM
Na₂ ATP	3.3 mM	3.3 mM
Créatine-P	12 mM	12 mM
Dithiothréitol	0.3 mM	0.3 mM
PMSF	0.5 mM	0.5 mM
Leupeptine	0.04 mM	0.04 mM
E64	0.01 mM	0.01 mM
pH	7.1	7.1

Tableau 4 : Composition de la solution relaxante et de la solution activatrice.

La tension active est ensuite normalisée par la tension active maximale pour établir la tension relative développée par la cellule pour chaque pCa. Les tensions relatives sont ensuite représentées en fonction de chaque pCa. Cette relation est décrite par une fonction de type sigmoïde qui est lissée avec une équation de Hill modifiée :

Tension relative = $[Ca^{2+}]^{n_H} / (K + [Ca^{2+}]^{n_H})$, où K est la constante d'affinité, n_H est le coefficient de Hill et $[Ca^{2+}]$ est la concentration en calcium (**Figure MM10**).

Cette équation permet d'évaluer la concentration à laquelle la cellule génère 50% de sa force maximale (pCa_{50}), le nombre de Hill (n_H) qui représente la coopérativité des ponts actine-myosine. Ces analyses mathématiques sont faites à l'aide du logiciel Origin ProLab ®.

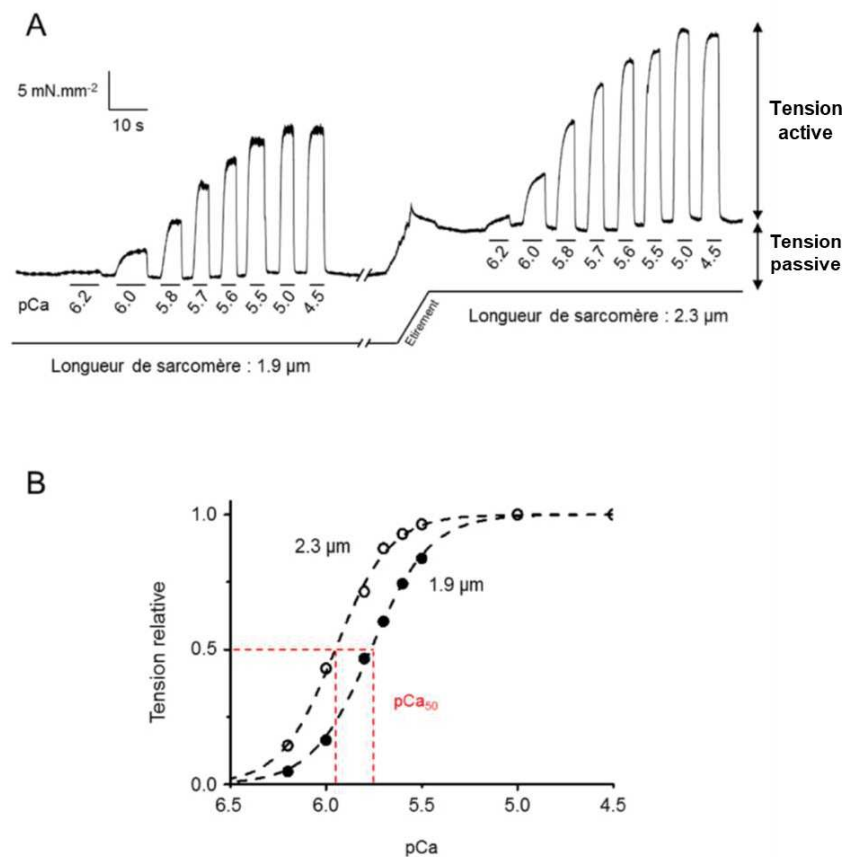


Figure MM 10 : A : Mesure des tensions active et passive en fonction de la longueur de sarcomère ; B : Mesure de la tension relative en fonction de pCa.

3.5 Etude électrophysiologique – Technique de patch clamp

Principe et configuration

Introduite par Neher et Sakmann en 1976 puis améliorée par Hamill et collaborateurs en 1981, la technique de patch clamp, permet d'enregistrer les courants électriques transitant par les canaux ioniques présents au niveau de la membrane cellulaire (Neher and Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981). Elle consiste à isoler électriquement une portion de membrane ou « patch » à l'extrémité d'une micropipette de verre. Une légère aspiration à l'intérieur de la pipette permet de créer un scellement étroit ou « seal » entre la membrane et la pipette, ce qui augmente la résistance électrique jusqu'à 1-10 G Ω . La formation du « seal » est essentielle pour maintenir une stabilité électrique et mécanique entre la pipette et la cellule et empêcher la diffusion libre des ions entre les milieux extracellulaires et intra-pipette (configuration cellule-attachée). Une fois le scellement obtenu, la membrane cellulaire est rompue en réalisant une deuxième aspiration intra-pipette afin d'enregistrer l'ensemble des courants ioniques traversant la membrane cellulaire (configuration cellule entière).

Dispositif

L'approche de la pipette de patch se fait à l'aide d'un microscope inversé à vision binoculaire. Le microscope, le micromanipulateur ainsi que le système de perfusion sont placés dans une cage de Faraday. L'ensemble est mis à la terre pour limiter les parasites électriques. Le système est amorti par une table antivibratoire afin d'éviter toutes perturbations mécaniques extérieures.

Les micropipettes sont étirées à partir de verres capillaires borosilicatés à l'aide d'une étireuse de micropipette verticale (Sutter Instruments, CA, Etats Unis). Les réglages de l'étireuse sont tels que la résistance électrique des pipettes est de ≈ 2 M Ω . La pipette est ensuite fixée sur la tête de l'amplificateur (Axopatch 200B, Axon Instruments) de façon à ce qu'un fil d'Ag/AgCl soit mis en contact avec le liquide intra-pipette. Le potentiel est appliqué entre le fil Ag/AgCl et une électrode de référence placée dans le milieu extracellulaire contenu dans la boîte de pétri. La pipette et le fil d'Ag/AgCl sont connectés à l'amplificateur Axopatch 200B qui permet d'amplifier les courants transmembranaires avant d'être enregistrés informatiquement.

Les courants enregistrés sont, par la suite, transférés via une carte de conversion analogique/digitale (*digidata 1440A analogue-to-digital*), à un ordinateur chargé d'un programme d'acquisition *pClamp 10 (Axon)* et des programmes d'analyse *Clampfit 10.2 (Axon Instruments)*.

Solutions

- Composition du milieu intra-pipette (contenant 100 nM de Ca^{2+} libre) : KCl : 120 mmol/L ; EGTA : 8 mmol/L ; HEPES : 10 mmol/L ; MgCl_2 : 6,8 mmol/L ; CaCl_2 : 3 mmol/L ; ATPNa2 : 4 mmol/L ; GTPNa2 : 0,4 mmol/L ; pH = 7,2

- Composition du milieu extracellulaire : NaCl : 130 mmol/L ; KCl : 4 mmol/L ; MgCl_2 : 1,8 mmol/L ; CaCl_2 : 1,8 mmol/L ; HEPES : 10 mmol/L ; glucose : 11 mmol/L ; pH = 7,4

4. Etudes biochimiques : Quantification de l'expression protéique : Western Blot

La technique du western blot permet de quantifier et de comparer le profil d'expression des protéines. Les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la nitrosylation, l'oxydation ou l'ubiquitinylation peuvent être également détectées.

La technique de western blot comprend plusieurs étapes :

1. L'extraction protéique : La première étape du western blot consiste à extraire les protéines contenues dans l'échantillon, dans notre cas, le VG des rats, prélevé au sacrifice et conservé à -80°C. Afin d'obtenir une concentration suffisante de protéines, 50 mg de tissus sont pesés au départ en évitant la décongélation des échantillons. Pour extraire les protéines, l'échantillon est placé dans un tampon de lyse contenant : 10 mM de Tris maléate pH= 6, 35 mM de NaF, 1 mM de Na_3VO_4 , 1% de Triton et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1X *SigmaFAST*). Pour induire la lyse, un polytron® manuel refroidi dans de la glace préalablement est utilisé afin de broyer mécaniquement les tissus. Le volume de tampon pour 1 mg de tissu est de 20 μL . Le tissu est mixé au polytron à vitesse maximale pendant 5 à 10 secondes. Toutes les étapes citées sont effectuées à froid afin de limiter la dégradation des protéines induite par la lyse cellulaire. Les échantillons sont ensuite centrifugés et les surnageants contenant les protéines sont récupérés. Les lysats sont ensuite

dosés en duplicata par l'intermédiaire d'un kit commercial RC-DC (*Reducing agent Compatible-Détergent Compatible*) (*Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France*) et mesurés par spectrophotométrie à l'aide d'une courbe étalon avec des concentrations croissantes de BSA.

2. La migration : Avant de déposer les échantillons dans le gel, les protéines subissent une étape initiale de dénaturation à l'aide d'un tampon « Laemmli ». Ce tampon contient principalement une coloration au bleu de Bromophénol, du glycérol qui augmente la densité de l'échantillon (crucial pour le dépôt), du β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures et du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) détergent qui charge négativement les protéines pour permettre la séparation de ces dernières par électrophorèse donc en fonction de leur poids moléculaire. Un chauffage à 95°C pendant 5 minutes assure la dénaturation des protéines. Les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide en gradient 4% / 20%. Les protéines sont séparées par électrophorèse dans un tampon tris-glycine-SDS (SDS-PAGE : « *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ») pendant 30 minutes à 70 Volts et puis pendant une heure à 150 Volts. Un marqueur de poids moléculaire (*Thermo Scientific, Illkirch, France*) sert de repère visuel lors de la migration.

3. Le transfert : Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (*GE Healthcare, USA*) selon la méthode de transfert liquide à froid dans un tampon tris-glycine. Le tampon contient de l'éthanol ce qui favorise l'ancrage des protéines sur la membrane. Cette étape est réalisée à 100 Volts pendant 60 minutes.

3. La saturation et la révélation : Une fois le transfert effectué, les membranes de nitrocellulose sont alors saturées dans du « *Starting Block buffer* » (TBS) pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation. La saturation permet le recouvrement des séquences aspécifiques limitant ainsi les détections croisées et un « bruit de fond » trop élevé lors de la révélation finale. Ensuite, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires afin de détecter les protéines d'intérêt. La reconnaissance des protéines se fait grâce aux fractions variables de l'anticorps, spécifiques d'un épitope (anticorps monoclonaux, souvent plus spécifiques) ou de plusieurs épitopes (anticorps polyclonaux) présents dans la séquence protéique. Les anticorps primaires sont dilués dans le « *Starting Block blocking buffer* » pur et à la dilution recommandée par le fournisseur. Les

membranes sont incubées 24h en présence des anticorps primaires à 4°C sous agitation. Ensuite, des lavages successifs, sont effectués, avec du PBS /Tween à température ambiante. La révélation est réalisée par l'utilisation d'anticorps secondaires fluorescents dans les infrarouges (IRdye800® ou IRdye700®) spécifiques de la fraction constante de l'anticorps primaire à l'aide du système Odyssey® (*LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA*) par lecture de la fluorescence émise par la membrane.

Pour la détection des protéines nitrosylés, les échantillons ont été incubés au préalable avec les anticorps primaires et le tampon RIPA (10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% Triton- X100 5mM NaF, 1mM Na₃VO₄, et inhibiteurs des protéases) pendant une heure à 4°C. Ensuite les complexes immuns ont été incubés avec des billes de protéine G Sepharose (*Sigma-Aldrich*) à 4°C pendant une heure. Les protéines ont été séparées sur SDS / PAGE comme décrit ci-dessus.

Les signaux présents sur la même membrane ont été analysés à l'aide du logiciel *Odyssey V3.0* et les intensités obtenues pour chaque échantillon sont comparées à l'intensité d'une protéine de ménage (Tubuline) de ces mêmes échantillons. Les résultats représentent la moyenne de trois western blot répétés pour chaque échantillon.

Liste des anticorps utilisés :

Anti-FKBPI2.6 : Anticorps primaire ReD SYSTEM, dilution 1:500

Anti-NCX : Anticorps primaire SWANT, dilution 1:1000

Anti-PLN : Anticorps primaire ABCAM, dilution 1 :1000

Anti-PLN phospho-Thr17 : Anticorps primaire (forme phosphorylée) BADRILLA, dilution 1:1000

Anti-RyR : Anticorps primaire ABCAM, dilution 1:500

Anti-RyR2 phospho-Ser2814 : Anticorps primaire (forme phosphorylée) BADRILLA, dilution 1:500

Anti-SNO RyR : Anticorps primaire (nitrosylé) ABCAM, dilution 1:1000

Anti-SERCA2A : Anticorps primaire BADRILLA, dilution 1:1000

Anti-Tubulin : Anticorps secondaire Santa Cruz Biotechnology, dilution 1 :1000

5. Histologie

Les VG de cœurs de rats Sham et AAB, conservés à -80°C, sont coupés au microtome par tranches de 10 µm d'épaisseur. Les lames sont conservées à -80°C jusqu'au moment de la coloration. Une fois placées à température ambiante, les cryosections sont fixées avec un bain de PFA 4% à température ambiante pendant une heure. Les cryocoupes sont ensuite incubées 24 h dans une solution de Bouin (*Sigma-Aldrich*) à température ambiante pour intensifier la coloration et augmenter les contrastes des composants du tissu. Le lendemain, les cryocoupes sont lavées 2 minutes sous l'eau courante pour éliminer la couleur jaune et puis rincées rapidement à l'eau distillée milliQ. Le marquage à l'Hématoxyline de Harris (*Sigma-Aldrich*) s'effectue en incubant les cryocoupes dans l'hématoxyline de Harris pendant 3 minutes. Pour éliminer la solution de Harris un lavage à l'eau courante est réalisé suivi d'un lavage à l'eau distillée milliQ. La coloration du cytoplasme se fait grâce à l'incubation dans la solution de *Biedritch Scarlet-Acid Fuscine* pour marquer les fibres en rouge. Après l'élimination du produit et les lavages successifs, la coloration du collagène s'effectue plaçant les cryocoupes dans un bain de solution d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique (1 Volume d'acide phosphotungstique, 1 Volume d'acide phosphomolybdique, 2 Volumes d'eau distillée MilliQ) (*Sigma-Aldrich*). Après l'incubation la solution est éliminée sans rinçage et puis les lamelles sont incubées dans la solution de bleu

d'aniline pendant 5 minutes pour colorer le collagène en bleu. Après le lavage, les lamelles sont placées dans l'acide acétique glacial à 0.1% (préparé au moment même). La dernière étape après le lavage consiste à déshydrater en rinçant avec des bains successifs d'éthanol 70, 90,100% puis laisser les lamelles sécher à l'air. Enfin, les lamelles sont montées sur lame avec une goutte de liquide de montage *EUKITT* contenant du xylène. Les lames sont conservées à température ambiante. L'observation se fait après séchage et la quantification a été faite en utilisant le logiciel *ImageJ*.

6. Analyses Statistiques

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 5.01* et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du même logiciel. Toutes les analyses statistiques ont été appliquées sur les données brutes obtenues :

- 1-Western blot : moyenne de minimum trois dépôts répétés pour chaque échantillon et dans nos différentes conditions expérimentales
- 2-Mesure des transitoires calciques sur cellule isolée : minimum dix cellules par animal et par condition
- 3-Mesure des Ca²⁺ sparks sur cellule isolée : moyenne de minimum dix acquisitions par cellule et dix cellules minimum par animal

Le test statistique de Student (ou *student t-test*) a été appliqué pour la comparaison des deux groupes (Sham et AAB. Dans le but de comparer le nombre de cellules arythmiques, le test de Fisher a été utilisé (*Fisher's exact-test*).

Une $p \leq 0,05$ est considérée comme significative. N représente le nombre d'animaux et n, le nombre de cellules. Les données sont présentées sous forme moyennes \pm *Standard error of mean* (SEM). *, **, *** respectivement $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$. L'absence d'Astérix représente l'absence de significativité.

Résultats

Résultats 1 : Etude de l'homéostasie calcique chez un modèle d'IC/FEp

Altération précoce de l'homéostasie calcique dans l'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection presque normale induite par surcharge de pression

Introduction : Malgré les progrès médicaux, les maladies cardiovasculaires restent l'une des principales causes de mortalité dans le monde, et où l'IC constitue la cause majeure. L'IC, résulte de l'impossibilité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Il s'agit d'une pathologie hétérogène et complexe. L'IC a longtemps été associée à une altération de la fonction systolique du VG, principalement caractérisée par une FE réduite. Au cours des dernières années, un sous-type d'IC à FE préservée (IC/FEp) a été identifié et caractérisé par la présence d'une dysfonction diastolique. On sait maintenant que 50% des patients atteints d'IC ont une FE normale. Il existe donc deux populations de patients souffrant d'IC : ceux avec une fraction d'éjection réduite (IC/FEr) ou IC systolique, et ceux avec une fraction d'éjection préservée (IC/FEp) ou IC diastolique. Si la physiopathologie de l'IC/FEr est assez évaluée, cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents de l'IC/FEp demeurent à ce jour mal élucidés.

L'objectif de cette étude, est, dans un premier temps, de reproduire et de valider, *in vivo*, sur le rat adulte, le modèle d'IC/FEp, pour que dans un second temps, pouvoir évaluer sur ce même modèle, *in vitro*, les composantes cellulaires et moléculaires impliquées dans la dysfonction diastolique. Plus spécifiquement, nous étudierons le statut de l'homéostasie calcique et les protéines potentiellement impliquées dès les stades les plus précoces de la pathologie.

Le modèle de sténose aortique chez le rat a été utilisé. Des rats mâles adultes ont subi une sténose de l'aorte abdominale (groupe AAB). Leur fonction cardiaque a été suivie par échocardiographie et par mesure des pressions intraventriculaires à 4 semaines post-chirurgie, et en comparaison à un groupe contrôle (groupe Sham). Les rats présentant une altération diastolique avec une FE préservée ont été inclus dans la suite du travail. Les paramètres étudiés sont :

- La rigidité passive et active et la sensibilité au Ca^{2+} des cardiomyocytes
- Le transitoire calcique

- La contraction des cardiomyocytes
- Le « calcium Sparks »
- Le potentiel d'action et le courant ionique potassique
- Le niveau d'expression des protéines calciques impliquées dans le CEC

Résultats : À l'échocardiographie, les cœurs de ces animaux avaient une fraction d'éjection supérieure à 50%, une tension artérielle élevée, une congestion pulmonaire, une hypertrophie concentrique avec une augmentation de la masse du ventricule gauche, une rigidité myocardique, une relaxation et un remplissage ventriculaire passif altérés, une dilatation auriculaire et une hypertrophie cardiomyocytaire. La contraction mesurée sur des cardiomyocytes isolés ainsi que le transitoire calcique sont augmentés. De plus, on note une surcharge en calcium diastolique probablement due à une fuite à travers les canaux RyR2 et à un dysfonctionnement de l'échangeur NCX. Le niveau d'expression des protéines SERCA2a et NCX reste inchangé, avec un remodelage compensatoire de la forme phosphorylée du PLN et du rapport PLN/SERCA2a.

Article : Ce travail a été publié dans le journal Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease (ELS).



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis

Early calcium handling imbalance in pressure overload-induced heart failure with nearly normal left ventricular ejection fraction

Sarah Rouhana^{a,b,1}, Charlotte Farah^{a,1}, Jerome Roy^a, Amanda Finan^a, Glaucy Rodrigues de Araujo^{a,c}, Patrice Bideaux^a, Valérie Scheuermann^a, Youakim Saliba^b, Cyril Reboul^d, Olivier Cazorla^a, Franck Aimond^a, Sylvain Richard^{a*}, Jérôme Thireau^a, Nassim Fares^b

^aPhyMedExp, Université de Montpellier, INSERM, CNRS, France

^bUniversité Saint Joseph, Beyrouth, Lebanon

^cCiPharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^dUniversité Avignon, LAPEC EA4278, Avignon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Heart failure with preserved ejection fraction
Hypertension
Cardiomyocytes
Calcium

ABSTRACT

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a common clinical syndrome associated with high morbidity and mortality. Therapeutic options are limited due to a lack of knowledge of the pathology and its evolution. We investigated the cellular phenotype and Ca^{2+} handling in hearts recapitulating HFpEF criteria. HFpEF was induced in a portion of male *Wistar* rats four weeks after abdominal aortic banding. These animals had nearly normal ejection fraction and presented elevated blood pressure, lung congestion, concentric hypertrophy, increased LV mass, wall stiffness, impaired active relaxation and passive filling of the left ventricle, enlarged left atrium, and cardiomyocyte hypertrophy. Left ventricular cell contraction was stronger and the Ca^{2+} transient larger. Ca^{2+} cycling was modified with a RyR2 mediated Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum and impaired Ca^{2+} extrusion through the Sodium/Calcium exchanger (NCX), which promoted an increase in diastolic Ca^{2+} . The Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) and NCX protein levels were unchanged. The phospholamban (PLN) to SERCA2a ratio was augmented in favor of an inhibitory effect on the SERCA2a activity. Conversely, PLN phosphorylation at the calmodulin-dependent kinase II (CaMKII)-specific site (PLN-Thr17), which promotes SERCA2A activity, was increased as well, suggesting an adaptive compensation of Ca^{2+} cycling. Altogether our findings show that cardiac remodeling in hearts with a HFpEF status differs from that known for heart failure with reduced ejection fraction. These data also underscore the interdependence between systolic and diastolic “adaptations” of Ca^{2+} cycling with complex compensative interactions between Ca^{2+} handling partner and regulatory proteins.

1. Introduction

Heart failure (HF) has historically been defined by the inability of the myocardium to pump blood normally due to an impaired systolic contractile performance of the left ventricle (LV). Recently, cardiologists have identified a subtype of HF presenting clinical signs and symptoms of HF but with normal or nearly normal left ventricular

ejection fraction (LVEF) [1–4]. In fact, half of all patients with HF are classified as having diastolic dysfunction and a relatively preserved EF (HFpEF). The diagnosis of HFpEF underlines the quasi-normal systolic function (EF > 50%) and allows the discrimination from HF patients with reduced EF (HFrEF) [2,3]. Patients with HFpEF are commonly older than HFrEF patients and often present co-morbidities such as hypertension, obesity, diabetes mellitus, anemia, and atrial fibrillation.

* Corresponding author at: Inserm 1046 - UMR CNRS 9214 – Université de Montpellier, Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles, CHU Arnaud de Villeneuve, Bâtiment Crastes de Paulet, 371 avenue du doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail addresses: charlotte.farah@uclouvain.be (C. Farah), amanda.finan-marchi@inserm.fr (A. Finan), patrice.bideaux@inserm.fr (P. Bideaux), valerie.scheuermann@inserm.fr (V. Scheuermann), youakim.saliba@usj.edu.lb (Y. Saliba), cyril.reboul@univ-avignon.fr (C. Reboul), olivier.cazorla@inserm.fr (O. Cazorla), franck.aimond@inserm.fr (F. Aimond), sylvain.richard@inserm.fr (S. Richard), jerome.thireau@inserm.fr (J. Thireau), nassim.fares@usj.edu.lb (N. Fares).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2018.08.005>

Received 29 December 2017; Received in revised form 13 July 2018; Accepted 2 August 2018
0925-4439/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Rouhana, S., BBA - Molecular Basis of Disease (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2018.08.005>

Diastolic dysfunction in HFpEF has been frequently associated with LV hypertrophy in response to systemic hypertension [5,6]. A specific, effective therapy has not yet been identified to treat HFpEF [7–9]. Management to delay disease progression is limited to diuretics, treatment of hypertension, and care of lung function abnormalities and other comorbidities [7,10–12]. Identification of targetable mechanisms involved in the pathogenesis and progression of HFpEF is still a major challenge [13].

The heart of HFpEF patients exhibits structural alterations including cardiac hypertrophy, interstitial fibrosis, and coronary capillary rarefaction [14]. These alterations may contribute to increased LV passive stiffness, impaired relaxation, elevated LV end-diastolic pressure, and enlarged left atrium (LA) due to increased filling pressures [3,4,15]. The underlying mechanisms are diverse and complex, involving systemic inflammation, oxidative stress, coronary microvascular endothelial dysfunction, infiltration by activated macrophages, reactive interstitial fibrosis, changes in the extracellular matrix, and modifications in the phenotype of cardiomyocytes resulting from the myocardial remodeling [9]. Changes in both collagen and titin organization/structure/isoform contribute to the development of passive stiffness [16]. Hypophosphorylation of myofilament proteins and increased Ca^{2+} sensitivity have also been reported, suggesting that functional impairment at the cardiomyocyte level is an early event [17]. Abnormal intracellular Ca^{2+} cycling, in relation with impaired intracellular Ca^{2+} decline following systole and diastolic Ca^{2+} overload, respectively, may also compromise relaxation and myocyte stiffness [18,19]. The purpose of this study was to investigate the cellular phenotype and Ca^{2+} handling mechanisms in an experimental model presenting common characteristics of HFpEF and relevant to systemic hypertension. This approach provided a unique access to cellular and molecular functions not accessible in human. Four weeks after surgery, a portion of rats submitted to chronic pressure overload induced by abdominal aortic banding (AAB), recapitulated criteria of preclinical models of HFpEF [20] including lung congestion, concentric hypertrophy, increased LV mass, impaired active relaxation, impaired passive filling, enlarged LA, and cardiomyocytes hypertrophy. The results show stronger contraction of LV myocytes associated with critical alterations in Ca^{2+} cycling and opposing effects on various Ca^{2+} handling proteins possibly to maintain normal contraction.

2. Materials and methods

2.1. Experimental model of chronic pressure-overload

Male *Wistar* rats (weight, 150–200 g; 6 weeks) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). All protocols complied with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 for the protection of animals used for scientific purposes (agreement: A34-172-38; project APAFIS #3428). Animals were housed in a temperature-regulated room (12 h day/12 h night cycle) with *ad libitum* access to food and water. Surgery was performed according to standard procedures. Rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine (120 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). The abdominal aorta adjacent to renal arteries was constricted at the suprarenal level by a silk suture ligature to tie off the vessel against a 21-gauge needle that was subsequently removed (AAB group). Sham-operated rats underwent an identical procedure, but without abdominal aorta ligation.

2.2. Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed 4 weeks after surgery using a Vevo 2100 high resolution ultrasound system (Fujifilm Visualsonics), equipped with a 21 MHz transducer. Rats were anesthetized with 2.5% isoflurane in 100% oxygen (heart rate: 353 ± 23 bpm). Left ventricular (LV) parasternal long axis 2D view in

M-mode was performed at the level of papillary muscle to assess LV wall thicknesses and internal diameters, allowing the calculation of the fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) by the Teicholz method. The relative wall thickness index (RWT) was calculated as $\text{RWT} = (\text{IVSd} + \text{PWTd}) / \text{LVIDd}$ (with IVS: inter-ventricular septum; PWT: posterior wall thickness; LVID: LV internal diameter; d, in diastole). EF was also calculated (%) from a B-mode parasternal long axis view by tracing endocardial end-diastolic and end-systolic borders to estimate LV volumes. To assess LV diastolic function, mitral inflow was recorded by a pulsed-wave Doppler in the apical four-chamber view by placing the sample at the tip of the mitral valves. Peak early (E) and late atrial contraction (A) mitral inflow waves were measured and the E/A ratio was calculated. Mitral valve deceleration time (MV decel), iso-volumic relaxation, and contraction times (IVRT and IVCT respectively) as well as the mitral valve ejection time (MV ET) were measured to calculate the myocardial performance index (MPI) as $\text{MPI} = (\text{IVRT} + \text{IVCT}) / \text{MV ET}$. Tissue Doppler imaging of the mitral annulus was performed to assess the early diastolic myocardial relaxation velocity waves (e'). The E/ e' ratio was calculated as an index of the LV filling pressure. The left atrium (LA) diameter was measured in a right parasternal long axis view. Pulsed-wave Doppler of the ascending aortic blood flow was recorded permitting measurement of the velocity time integral (AoVTI). All measurements were quantified and averaged for three cardiac cycles.

2.3. In vivo hemodynamic investigations

Experiments were performed in intact closed-chest rats as described [21,22]. Rats were anesthetized (isoflurane 1.5–2.5%) and placed in a supine position on an automatic heating pad. Body temperature, measured via a rectal probe, was maintained at 37 °C throughout the procedure. Invasive measurements of both arterial and left intraventricular pressure were performed using a 2F microtip pressure catheter (SPR407, Millar Instruments, Houston, Tx) introduced in the right carotid artery. The catheter was subsequently advanced into the LV to measure systolic and end-diastolic pressures. The analog outputs of the arterial pressure and heart rate were collected with an MP35 module (Biopac System, Gotele, Santa-Barbara, CA). Data were processed using BIOPAC Lab Pro 3.7 software.

2.4. Interstitial fibrosis

Quantification of interstitial fibrosis was performed using Masson's trichrome staining of the left ventricle from sham and AAB rats. Cryosections were fixed with 4% PFA (paraformaldehyde) for 1 h at room temperature, followed by incubation in Bouin's solution overnight. The following day, the tissue samples were washed under running tap water for 2 min and rinsed with distilled water. Sections were stained in Harris Hematoxylin solution for 3 min, rinsed under running tap water for 10 min, and then rinsed with distilled water for 1 min. The Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin solution was added for 5 min followed by a rinse with distilled water. The stain was differentiated in phosphotungstic/phosphomolybdic acid solution for 10 min; transferred directly into aniline blue solution for 5 min; rinsed with distilled water; differentiated in 1% acetic acid for 1 min, rinsed with distilled water and dehydrated, cleared and mounted on a coverslip.

2.5. Single myocytes isolation

LV cardiomyocytes were isolated by enzymatic digestion as described [23,24]. Briefly, hearts were quickly removed and cannulated through the aorta to a retrograde perfusion Langendorff system. Hearts were perfused with a free Ca^{2+} physiological Tyrode solution (in mM: NaCl, 116; KCl, 6; NaHCO_3 , 4; KH_2PO_4 , 1.5; MgCl_2 , 1.7; HEPES, 21; taurine 20, and, glucose 12; pH, 7.15) containing a protease inhibitor (E-64d, 10 μM , Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) at a

constant flow perfusion rate. Hearts were then perfused with type IV collagenase (Worthington, France) solution and LV myocytes collected in a Ca^{2+} free solution, dissected, and mechanically dispersed. The Ca^{2+} concentration was increased gradually to 1 mM and cells maintained in a physiological solution at 37 °C for 30 min before further processing. Only quiescent cells were used for experiments.

2.6. Force measurements in permeabilized cardiomyocytes

Active and passive forces were measured in single permeabilized cardiomyocytes. The procedures have been described [25]. Myocytes were attached to a piezoresistive strain gauge (AE801 sensor, Memsap, Crolle, France) and to a stepper motor driven micromanipulator (MP-285, Sutter Instrument Company, Novato CA, USA) with thin needles and optical glue (NOA 63, Norland products Inc., North Brunswick, NJ) that polymerized with 2 min UV illumination. Sarcomere Length (SL) was determined online throughout the experiment at 50 Hz by using a Fast Fourier Transform algorithm on the video images of the cell. Force was normalized to the cross-sectional area measured by imaging with an IonOptix® system (Milton, MA, USA) connected to an inverted fluorescence microscope. Active and passive forces were measured either by perfusing the cells with different Ca^{2+} containing solutions at a given length (1.9 and 2.3 μm SL) or by stretching the cells from 1.9 to 2.3 μm SL in relaxing solution, respectively [25]. For each cell, the relationship ascribed by sigmoid curves between force and pCa was fitted to the relative force-pCa relationships by non-linear squares analysis. The curves were of a modified form of the Hill equation: relative force = $[\text{Ca}^{2+}]_i^n / (K^n + [\text{Ca}^{2+}]_i^n)$ where nH is the Hill coefficient and K a compound association constant. The pCa_{50} , pCa for half maximal activation, equals $-(\log_{10} K) / nH$ [25].

2.7. Cell shortening and calcium transients

Single cell contractility and intracellular Ca^{2+} were measured using the IonOptix® system (Milton, MA, USA) on freshly isolated LV myocytes incubated in a physiological tyrode solution (in mM: NaCl, 140; KCl, 4; MgCl_2 , 1; HEPES, 5; CaCl_2 , 1.8; glucose, 11; pH, 7.4). Myocytes were loaded with the ratiometric Ca^{2+} dye indo-1 AM at room temperature for 10 min (2 μM , Life technologies, St-Aubin, France). Cell shortening and Ca^{2+} transients were evoked by means of electrical-field stimulation with 1-ms current pulses delivered via two platinum electrodes. Cells were paced at 0.5 Hz during periods of 20 s, followed by 10 s resting periods. This experimental challenge also allowed the assessment of spontaneous Ca^{2+} events, either during pacing or resting periods. We used caffeine (10 mM) to deplete SR Ca^{2+} stores and evaluate SR Ca^{2+} content [26–28]. NCX activity was assessed based on kinetics analysis of the decay of the Ca^{2+} transient evoked by caffeine [26,29]. Cells were stimulated until steady-state twitches and Ca^{2+} transients were achieved. Pacing was discontinued before sustained application of caffeine. The cytosolic Ca^{2+} concentration was obtained by measuring the fluorescence ratio F405/F480. Data were analyzed using IonWizard 6.4 software.

2.8. Ca^{2+} sparks

To observe the activity of RyR2, Ca^{2+} sparks were recorded in quiescent LV myocytes by means of confocal imaging (Zeiss LSM510 Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) with a 63 \times water-immersion objective (NA: 1.2) and use of Ca^{2+} indicator Fluo-4-AM (4 μM) (Molecular Probes, USA). The dye was excited at 488 nm and the fluorescence emission was collected through a 505-nm long-pass filter. LV myocytes were field-stimulated at 1 Hz with 1-ms current pulses delivered via two platinum electrodes, one on each side of the perfusion chamber. During the rest period that followed stimulation, myocytes were repetitively scanned along the entire length of the cell at 1.5 ms intervals, for a maximum of 6 s. The laser intensity was reduced to 5%

maximum to decrease cell damage and dye bleaching. Line scan diagrams were constructed by stacking emission lines, corresponding to excitation scans, in temporal order. An average of the Ca^{2+} sparks was determined by the intensity of each sequential scan line and plotting the mean intensity as a function of time. The SparkMaster plug-in for ImageJ software was used to detect and analyze Ca^{2+} sparks.

2.9. Protein analysis

Proteins were extracted from the LV of Sham and AAB rats. Tissues were lysed in lysis buffer containing Tris maleate 10 mM (pH 6.8), NaF 35 mM, triton 1%, Na_3VO_4 1 mM and protease inhibitors (complete Protease Cocktail inhibitor, ROCHE) and homogenized with a manual polytron® instrument. Then the tissues underwent a rotated agitation for 45 min and the protein concentration was determined with the DC Protein Assay (Biorad, USA). Proteins were separated by 4%–20% gradient sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, USA) for 1 h at 100 V. The membranes were blocked and then incubated overnight with primary antibodies NCX (1:1000, SWANT), SERCA2A (1:1000, BADRILLA), PLN (1:1000, ABCAM), anti-PLN phospho-Thr17 (1:1000, BADRILLA), RyR (1:500, ABCAM), SNO RyR (1:1000, ABCAM), anti-RyR2 phospho-Ser2814, 1:500 (produced against RyR2 phospho-Ser2814 in rabbit), and FKBP12.6 (1:500, ReD SYSTEM) at 4 °C. An anti-RyR antibody (ABCAM) was used to immunoprecipitate RyR2 to analyze RyR2 S-nitrosylation and FKBP12.6. The samples were incubated with the antibody and RIPA buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton- ×100 5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , and protease inhibitors) for 1 h at 4 °C. The immune complexes were incubated with protein G Sepharose beads (Sigma-Aldrich) at 4 °C for 1 h. Proteins were separated on SDS/PAGE. The protein levels were expressed relative to Tubulin content using anti-Tubulin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Immunodetection was carried out using specific fluorescent (infrared-labeled) secondary antibodies and the immunoblots developed were quantified with the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosystems, USA).

2.10. Cellular electrophysiological recordings

Whole-cell patch clamp recordings were performed on single LV myocytes using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments), interfaced to a Dell microcomputer with a Digidata 1440A Series analog/digital interface (Axon), and pClamp 10 (Axon) software. Recording pipettes ($\approx 2 \text{ M}\Omega$) were filled with a Ca^{2+} rich (100 nM free Ca^{2+}) intracellular solution containing (in mmol/L): KCl 120; EGTA 8; HEPES 10; MgCl_2 6.8; CaCl_2 3; ATPNa_2 4 and GTPNa_2 0.4 (pH 7.2). The bath solution contained (in mmol/L): NaCl 130; KCl 4; MgCl_2 1.8; CaCl_2 1.8; HEPES 10; glucose 11 (pH 7.4). In the current-clamp mode, action potentials (AP) were evoked by brief (1–2 ms) depolarizing current injections delivered at 1 Hz. Resting membrane potential, AP amplitude and AP durations at 20% (APD20), 50% (APD50) and 90% (APD90) repolarization were measured. In the voltage-clamp mode, outward voltage-gated outward K^+ currents were evoked during 4.5 s voltage steps to potentials between -40 and $+50$ mV (10 mV increment) from a holding potential (HP) of -80 mV. The inward rectifying K^+ current, I_{K1} , was recorded by 450 ms depolarizations between -120 and -40 mV (10 mV increment) from a HP of -80 mV. Leak currents (< 10 pA) were not corrected. Current amplitudes were normalized to whole-cell membrane capacitance, and current densities (pA/pF) are reported. Data were compiled and analyzed using Clampfit 10.2 (Axon Instruments).

2.11. Statistical analysis

All numerical data are given as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism 5.01 for

windows). Student *t*-test was used for the comparison of two groups. The number of arrhythmic cells data was analyzed by Fisher's exact test. A *p* value ≤ 0.05 was determined as statistically significant.

3. Results

3.1. Heart function and morphology

Six week-old male *Wistar* rats were submitted to AAB-induced pressure overload and compared to age-matched Sham animals following the protocol shown in supplementary Fig. S1. Invasive hemodynamic measurements 4 weeks after surgery confirmed that AAB resulted in increased systolic, diastolic and mean arterial blood pressures in intact closed-chest anesthetized rats (supplementary Fig. S2). These increases were associated with a marked increase in LV end-diastolic pressure and LV end-systolic pressure. Both the heart weight-to-body weight (HW/BW) and the heart weight-to-tibia length ratios (HW/TL) were also increased in AAB rats (Table 1). Signs of cardiac interstitial fibrosis were observed in some, but not all, hearts from AAB rats, suggesting that the fibrotic process was not yet fully established (supplementary Fig. S3).

Follow-up of heart morphology and functional evaluation by Doppler echocardiography and Tissue Doppler Imaging (TDI) revealed that four weeks after surgery was the minimal time required for the animals to develop features of HFpEF after AAB. This time point was thus chosen for experimental investigations. We excluded AAB animals (15/44) with an EF $< 55\%$ to ensure a margin threshold for further investigation [20]. The remaining AAB animals (29/44) still exhibited a concentric hypertrophy characterized by increases in LV posterior wall thickness (Table 2) and relative wall thickness (RWT) index (Fig. 1A). Noteworthy, AAB animals presented a nearly normal EF (Sham: $71 \pm 2\%$, $n = 16$; AAB: $62 \pm 2\%$, $n = 29$; see Table 1) and velocity time integral of the ascending aortic blood flow (AoVTI) reflecting cardiac output (Fig. 1B,C).

To evaluate diastolic function, we investigated sensitive characteristics of the transmitral inflow pattern. The E/A ratio, reflecting the early passive (E-wave) and late atrial contraction (A-wave) components of the LV filling, was unchanged in AAB vs. Sham (Fig. 1D), possibly reflecting an intermediate stage with both impaired LV relaxation and reduced filling in diastole (trend to decrease) and opposing increase in left atrial (LA) pressure (pseudo-normalization). The LV filling inflow waves profile was clearly modified, with an increase of the velocity of both the E and A waves (Fig. 1E-F) and a decrease of the mitral valve deceleration time (Fig. 1G). In some AAB animals, a total fusion of the E wave with the A wave was observed (Fig. 1H, bottom panel), indicating LV filling deterioration. The isovolumic relaxation time (IVRT) was prolonged indicating impaired LV relaxation (Fig. 1I). The isovolumic contraction time (IVCT; Table 1) was increased, likely resulting from aortic constriction-induced increase of the post-charge. Consequently, the myocardial performance index (MPI or Tei Index = (IVRT + IVCT)/mitral valve ejection time), notably used to assess global heart dysfunction and for prognostic information in patients with HFpEF [30,31], was increased (Fig. 1J). The LA pressure was

Table 1
Cardiac hypertrophy and lung congestion 4 weeks after AAB.

	Sham (N = 16)	AAB (N = 29)
HW/BW (g/kg)	0.04 ± 0.01	$0.06 \pm 0.02^{***}$
HW/TL (g/cm)	0.45 ± 0.01	$0.65 \pm 0.02^{***}$
LW/BW (mg/g)	3.0 ± 0.1	$3.5 \pm 0.05^*$

HW: heart weight; BW: body weight; LW: lung weight; TL: tibia length. Results are expressed as mean \pm SEM. Student *t*-test was used to compare groups. AAB vs. Sham.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$.

Table 2
Evaluation of heart morphology and function by transthoracic echocardiography 4 weeks after AAB.

	Sham (N = 16)	AAB (N = 29)
LV morphology and Systolic function		
HR (bpm)	362 ± 4	$348 \pm 5^*$
IVSs (mm)	2.8 ± 0.09	$3.2 \pm 0.06^{***}$
LVIDd (mm)	8.0 ± 0.13	$8.4 \pm 0.14^*$
LVIDs (mm)	4.6 ± 0.13	$5.5 \pm 0.15^{***}$
PWTd (mm)	1.8 ± 0.05	$2.3 \pm 0.07^{***}$
PWTs (mm)	2.9 ± 0.06	$3.3 \pm 0.09^{***}$
EF (%)	71 ± 1	$62 \pm 2^{***}$
FS (%)	42 ± 1	$35 \pm 1^{***}$
EF (%) B-mode	74 ± 1	$65 \pm 2^{***}$
RWT	0.44 ± 0.01	$0.52 \pm 0.01^{***}$
Ao VTI (mm)	83 ± 2	$77 \pm 2^*$
Diastolic function		
E wave (mm/s)	987 ± 32	$1163 \pm 37^{**}$
A wave (mm/s)	712 ± 33	$925 \pm 88^{***}$
E/A	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
MV Decel (ms)	33 ± 1	$28 \pm 1^*$
IVCT (ms)	16 ± 1	$23 \pm 2^{**}$
IVRT (ms)	16 ± 1	$22 \pm 1^{***}$
MV ET (ms)	58 ± 2	$63 \pm 1^*$
MPI	0.56 ± 0.03	$0.73 \pm 0.05^*$
e' wave (mm/s)	64 ± 5	64 ± 5
E/e'	16.3 ± 1.2	$21.2 \pm 1.8^*$
LA (mm)	4.8 ± 0.1	$6.1 \pm 0.2^{***}$

HR: heart rate; IVSd: Inter-ventricular septum thickness in diastole; IVSs: Inter-ventricular septum thickness in systole; LVIDd: left ventricular internal diameter in diastole; LVIDs: left ventricular internal diameter in systole; PWTd: posterior wall thickness in diastole; PWTs: posterior wall thickness in systole; EF: ejection fraction measured by Teicholz method; FS: fractional shortening measured by Teicholz method; EF B-mode: ejection fraction measured by Simpson method in B-mode; RWT: relative wall thickness, calculated as $RWT = (IVSd + IVSs) / LVIDd$; Ao VTI: aortic flow velocity time integral; E wave: peak velocity of early left ventricular filling wave; A wave: peak velocity of late atrial contraction left ventricular filling wave; E/A: ratio of E wave on A wave; MV Decel: mitral valve deceleration time; IVCT: isovolumic contraction time; IVRT: isovolumic relaxation time; MV ET: mitral valve ejection time; MPI: myocardial performance index, calculated as $MPI = (IVRT + IVCT) / MV ET$; e' wave: early diastolic mitral annulus tissue velocity peak; E/e': ratio of E wave on e' wave; LA: left atrium diameter. Results are expressed as mean \pm SEM. Student *t*-test was used to compare groups. AAB vs. Sham.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

also higher in AAB hearts, as indicated by the increase in the E/e' ratio (peak mitral inflow velocity/tissue Doppler peak diastolic mitral annulus velocity) (Fig. 1K). Due to chronic pressure, the LA was dramatically enlarged in AAB hearts (Fig. 1L), as expected for compensation of LV relaxation impairment and increased LV filling pressure. The lung weight-to-body weight ratio (LW/BW), a sensitive marker for pulmonary edema, was also increased (Table 1) despite preserved fractional shortening, consistent with a HFpEF status [32]. Therefore, 4 weeks post-surgery, our AAB model presented signatures in line with HFpEF abnormalities of active relaxation and passive ventricular filling and pseudo-normal systolic function. Thus, we ensured that all of the AAB animals investigated further at the cellular level had echocardiographic signatures of HFpEF to enhance robustness of the model.

3.2. Force generation in single cardiomyocytes

We investigated both the Ca^{2+} -activated force and the passive force of single, permeabilized LV myocytes as described [23,33]. The relationship established between the Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} -activated force showed no difference in the maximal isometric tension normalized to the cross-sectional area in AAB animals compared to

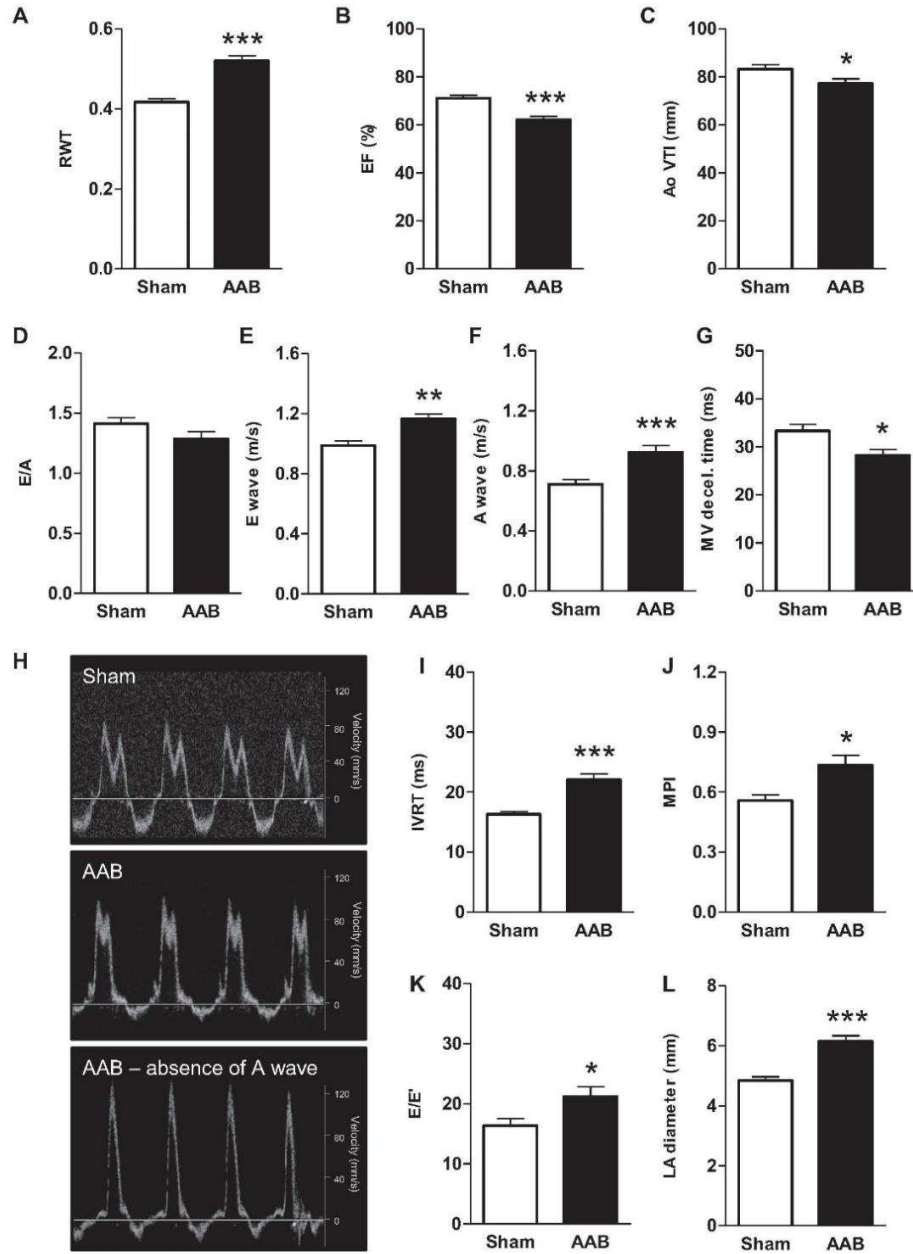


Fig. 1. Left ventricle morphology and function determined by transthoracic echocardiography in AAB rats 4 weeks post-surgery. (A) Relative wall thickness (RWT = anterior wall thickness in diastole (AWTd) + posterior wall thickness in diastole (PWTd)/Left ventricular internal diameter in diastole (LVIDd)). (B) Ejection fraction (EF); (C): Aortic velocity time integral (Ao VTI). (D) Ratio of early mitral inflow wave velocity peak (E) on atrial contraction inflow wave velocity peak (A). (E) Early mitral inflow wave velocity peak (E); (F) Atrial contraction inflow wave velocity peak (A). (G) Mitral valve deceleration time (MV decel.). (H) Illustrations of mitral blood inflow waves in M-mode view. (I) Isovolumic relaxation time (IVRT). (J) Myocardial performance index (MPI = (IVRT + IVCT) / mitral valve ejection time (MV ET)). (K) Ratio of E wave on early diastolic mitral annulus tissue velocity peak E' (E/e'). (L) Left atrium (LA) diameter. Results are expressed as mean \pm SEM for Sham rats (N = 16), and AAB rats (N = 29). Student *t*-test was used to compare the two groups. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, AAB vs. Sham.

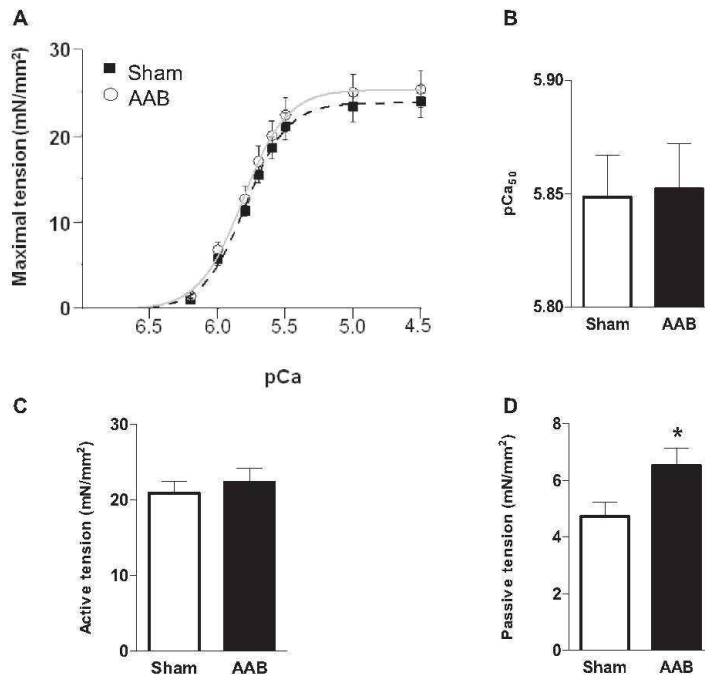


Fig. 2. Maximal active and passive tensions of permeabilized LV myocytes from AAB rats. (A) Relationship between maximal Ca^{2+} -activated tension (mN/mm^2) and intracellular Ca^{2+} measured at $2.3 \mu\text{m}$ sarcomere length. (B) The pCa at which half the maximal tension developed (pCa_{50} , where $\text{pCa} = -\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$) determines an index of myofilament Ca^{2+} sensitivity. (C) Active tension. (D) Passive tension. Results are expressed as mean \pm SEM for Sham $n = 21$ cells and AAB $n = 20$ cells from 4 hearts each. Student t -test was used to compare the two groups. * $p < 0.05$, AAB vs. Sham.

Sham. The steepness of tension- pCa curves (modified nHill coefficient), the pCa_{50} and the maximal Ca^{2+} -activated tension were similar in AAB and Sham animals, (Fig. 2A–C) indicating that, for a given amount of Ca^{2+} , the force generated by the myofilaments was unchanged. By contrast, the passive tension developed by myocytes after a stretch at the same sarcomere length (SL) was higher in the AAB group than in the Sham group (Fig. 2D), highlighting stiffer cardiomyocytes in AAB animals.

3.3. Cell contraction and Ca^{2+} handling in single cardiomyocytes

We evaluated excitation-contraction coupling (ECC) by assessing the relationship between SL variations and intracellular Ca^{2+} transients in paced single intact LV myocytes. In the AAB group (vs. Sham), the resting SL was unchanged (Fig. 3A, B) whereas SL shortening, an index of contraction, was increased (Fig. 3C). In line with this higher contractile performance, the velocity of cell contraction, calculated by the first derivative of cell shortening ($\Delta\text{SL}/\Delta\text{time}$), was increased (Fig. 3D) while the velocity of relaxation was unchanged (Fig. 3E). This positive inotropy was associated with an increase in the amplitude of the Ca^{2+} transient (Fig. 3F, G), a delay in the Ca^{2+} transient decay (Fig. 3H) and a moderate elevation of diastolic Ca^{2+} (Fig. 3I). As Ca^{2+} transient amplitude depends on the Ca^{2+} reuptake by the SR, we estimated the SR Ca^{2+} content by triggering maximal Ca^{2+} release instantaneously upon rapid caffeine application (10 mM) (Fig. 3J). Sustained caffeine application evoked Ca^{2+} transients of comparable amplitude in the Sham and AAB groups (Fig. 3K), suggesting similar SR Ca^{2+} content in the two groups. However, the decay was slower in the AAB group (4.82 ± 0.62 s, $n = 19$) than in the Sham group (2.66 ± 0.18 s, $n = 13$; $p = 0.009$; Fig. 3J, L). Taken together, these data underscore significant functional modifications of the ECC and of Ca^{2+} handling in LV cardiomyocytes from AAB animals 4 weeks after surgery.

3.4. Abnormal Ca^{2+} transients and spontaneous Ca^{2+} waves in single cardiomyocytes

We paced indo-loaded LV myocytes with trains of stimulation at 0.5 Hz, interrupted by resting periods to simulate a relaxing state. During pacing, all cells exhibited spatially uniform Ca^{2+} transients in the Sham group whereas AAB cells showed irregular Ca^{2+} transients in 16% of cells (Fig. 4A). During diastolic periods, abnormal events seen as spontaneous Ca^{2+} waves occurred (Fig. 4B). While this type of event was rare in the Sham group (3% of cells), spontaneous Ca^{2+} waves occurred in nearly half of the cells (46%) from the AAB group, underscoring dynamic instabilities in Ca^{2+} cycling (Fig. 4B). Spontaneous Ca^{2+} waves during diastolic periods can result from abnormal openings of the ryanodine receptor 2 (RyR2) generating microscopic Ca^{2+} events referred to as Ca^{2+} sparks [34–37]. We visualized Ca^{2+} sparks by means of confocal microscopy using the fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 to evaluate the leakiness of RyR2. AAB cardiomyocytes had an increase of Ca^{2+} spark frequency compared to Sham (Fig. 4C). Irregular Ca^{2+} transients, abnormal Ca^{2+} waves in diastole, and a higher frequency of Ca^{2+} sparks through RyR2 further confirmed alterations of Ca^{2+} handling in AAB cardiomyocytes.

We next explored the expression of proteins potentially implicated in the modifications of Ca^{2+} handling and the promotion of abnormal spontaneous Ca^{2+} events in AAB rats (Fig. 5). The sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a), the phospholamban (PLN) and the Sodium/Calcium exchanger (NCX) protein levels were not significantly modified in AAB hearts (Fig. 5A–D). By contrast, the phospholamban (PLN) to SERCA2a ratio was augmented (Fig. 5E), reflecting an inhibitory effect on the SERCA2a activity. However, PLN phosphorylation at the calmodulin-dependent kinase II (CaMKII)-specific site (PLN-Thr17), which promotes SERCA2a activity, was increased as well (Fig. 5F). The RyR2 protein and its post-translational modifications have been largely implicated as one of the molecular mechanism(s) responsible for the higher occurrence of Ca^{2+} sparks. In

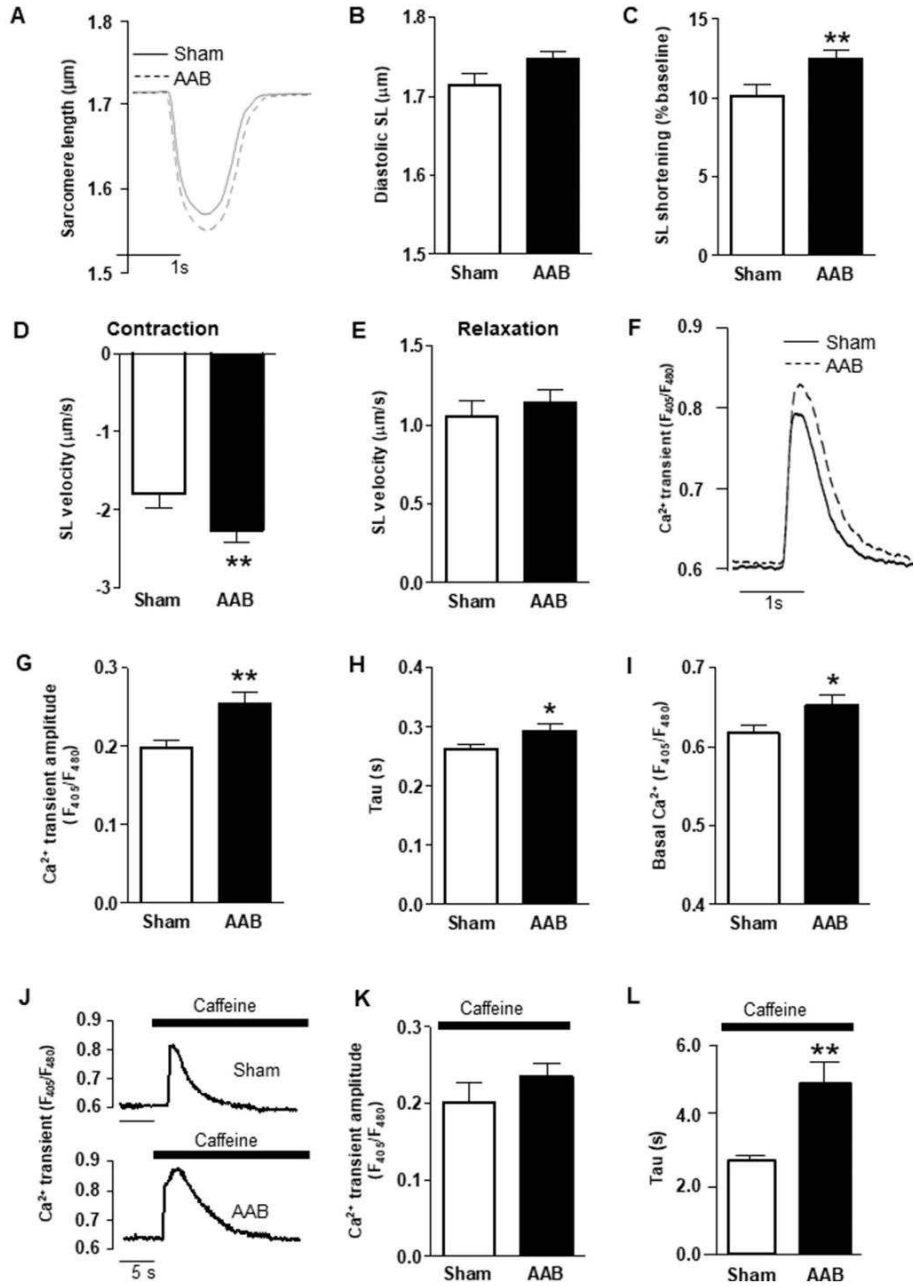


Fig. 3. Enhanced contraction and modified Ca^{2+} handling in intact LV myocytes from AAB rats. (A) Representative contraction evoked by electrical field stimulation as measured from sarcomere length (SL) shortening at 0.5 Hz in intact LV myocytes. (B) Diastolic SL. (C) Shortening during contraction. (D) Contraction velocity. (E) Relaxation velocity; (F) Representative Ca^{2+} transients evoked by electrical field stimulation in intact LV myocytes loaded with indo-1 AM. (G) Ca^{2+} transient amplitude. (H) Ca^{2+} transient decay. (I) Diastolic intracellular Ca^{2+} . (J) Transient increases in intracellular Ca^{2+} triggered by caffeine (10 mM) application. (K) Amplitude of the Ca^{2+} rise triggered by caffeine. (L) Decay of the Ca^{2+} transient evoked by caffeine. In all panels, results are expressed as mean \pm SEM. In panels A–I, for Sham, $n = 29$ cells (6 hearts); for AAB, $n = 37$ cells (7 hearts). In panel K and L, for Sham, $n = 13$ cells (5 hearts); for AAB, $n = 19$ cells (6 hearts). Student t -test was used to compare the two groups. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, AAB vs. Sham.

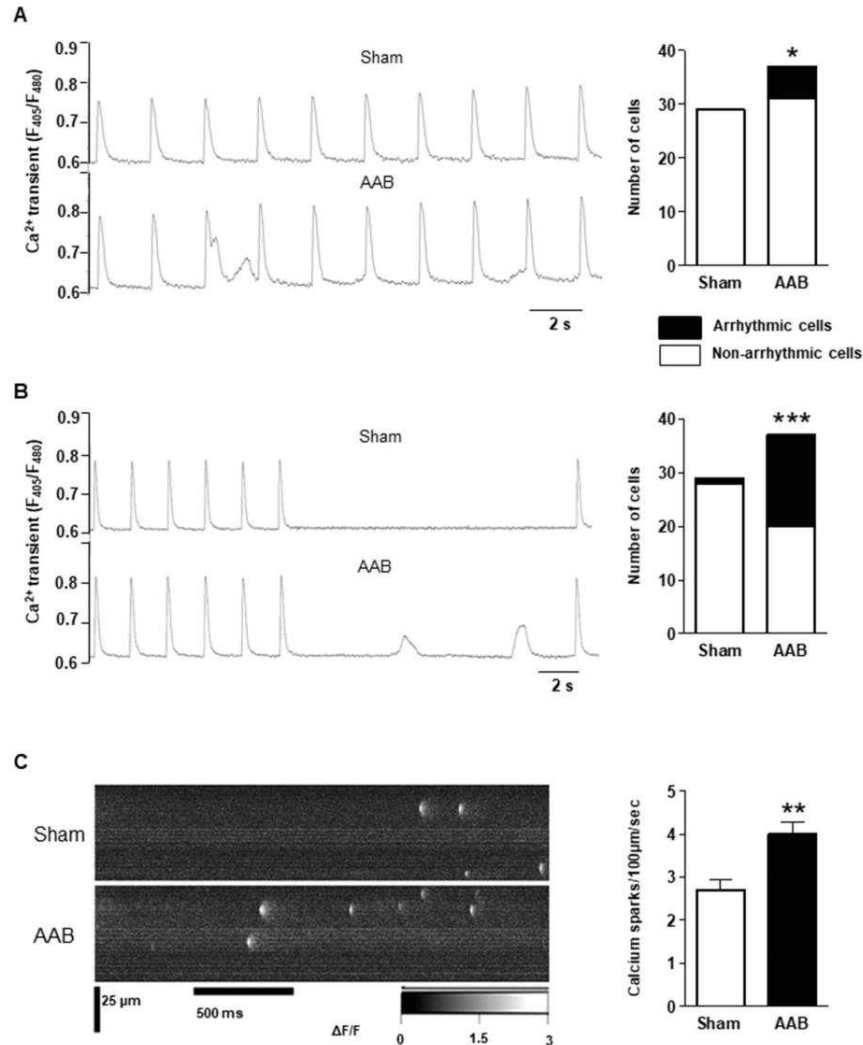


Fig. 4. Irregular Ca^{2+} transients, abnormal Ca^{2+} waves, and a high occurrence of Ca^{2+} sparks in intact LV myocytes from AAB rats. (A) Representative Ca^{2+} transients evoked during pacing in LV cardiomyocytes freshly isolated from Sham and AAB rats; Right panel: total number of cells recorded (white), number of cells with at least one irregular Ca^{2+} transient during the pacing period (black). (B) Spontaneous Ca^{2+} waves during a resting (or quiescent) period in LV cardiomyocytes freshly isolated from Sham and AAB rats; Right panel: total number of cells recorded (white), number of cells with at least one abnormal Ca^{2+} wave (black). In A and B panels, results are expressed as total number of cells for Sham $n = 29$ cells (6 hearts) AAB $n = 37$ cells (7 hearts). Fisher's exact test was used to compare the two groups. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, AAB vs. Sham. (C) Left panel: typical line-scan confocal images of spontaneous Ca^{2+} sparks recorded in a line-scan mode in Fluo-4 AM loaded LV cardiomyocytes; right panel: mean frequency of Ca^{2+} sparks measured for Sham $n = 22$ cells ($N = 3$ hearts) and AAB $n = 27$ cells (4 hearts). Student t -test was used to compare the two groups. ** $p < 0.01$, AAB vs. Sham.

AAB hearts, RyR2 protein expression was unchanged and no modifications in the phosphorylation at the CaMKII site (Ser2814), the FKBP12.6/RyR2 ratio, and the S-nitrosylation of RyR2 could be detected (Fig. 5G–J).

3.5. Action potential and cellular electrical activity

An essential parameter for the excitation-contraction coupling is cellular electrical activity. We recorded action potentials (AP) and whole-cell ionic currents by means of the patch-clamp technique in

single LV myocytes. Cell capacitance, an indicator of cell size, was increased (Fig. 6A) in line with an increase of cell area (supplementary Fig. S4). In AAB LV myocytes, the AP waveform was not substantially modified (Fig. 6B,C) in contrast with the marked prolongation of the repolarizing plateau phase in various models of HF [38–41], yet both a prolongation of the late repolarization (APD90) and a slight depolarization of the resting membrane potential were observed (Fig. 6C). Cardiac AP repolarization is driven by K^+ currents. Fig. 6D shows typical K^+ currents recorded in voltage-clamp conditions in the presence of inward Na^+ and Ca^{2+} current inhibitors [38]. In line with the lack of

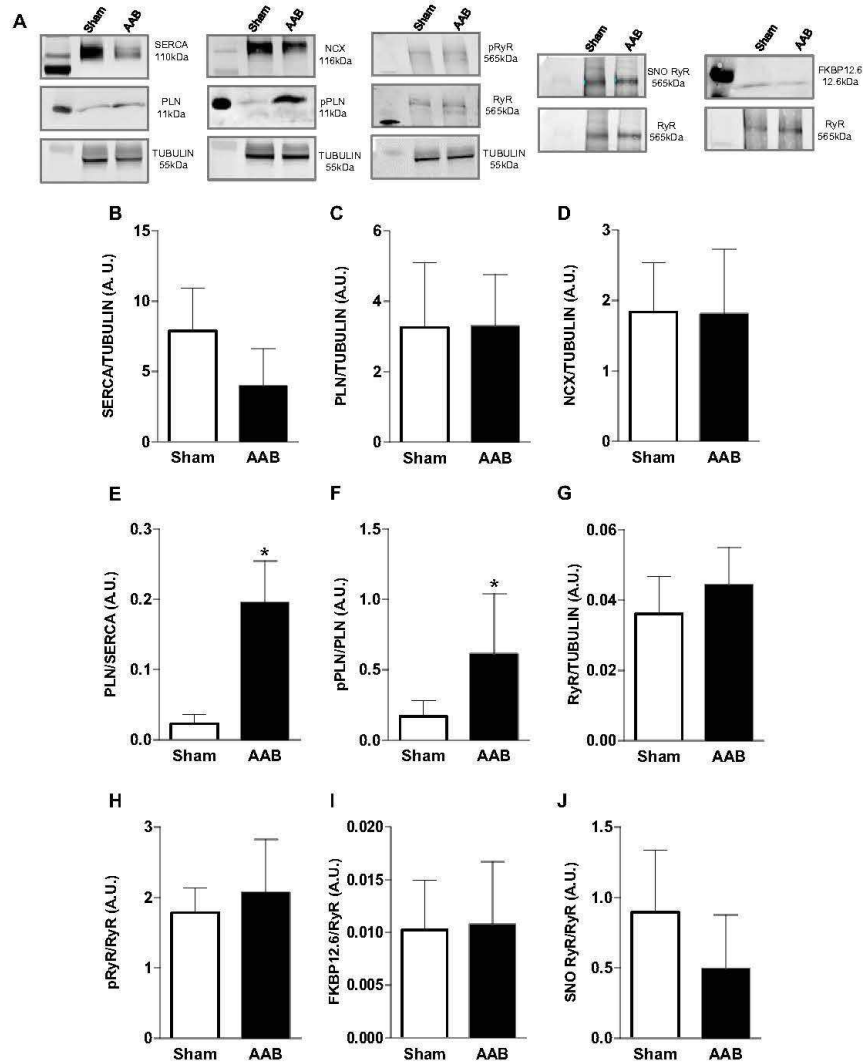


Fig. 5. Expression of Ca^{2+} handling proteins in the LV of AAB rats 4 weeks post-surgery. Western blots and overall results of experiments showing: (A) representative bands for each protein analyzed, (B) the expression of SERCA2a, (C) the expression of PLN, (D) the expression of the Sodium/Calcium exchanger (NCX), (E) the PLN to SERCA2a ratio, (F) the CaMKII-phosphorylated (Thr17)-PLN to PLN ratio, (G) the expression of the Ryanodine Receptor (RyR2), (H) the CaMKII-phosphorylated (Ser2814) RyR2 to RyR2 ratio, (I) the FKBP12.6 to RyR2 ratio, and (J) the S-nitrosylated RyR2 to RyR2 ratio. Protein levels were normalized to Tubulin content. The analyses were performed using Odyssey 3.0 image analysis software (LI-COR Biosciences). The blots are representative of 3 independent experiments (made in triplicate) using 3 hearts for the Sham group and 3 hearts for the AAB group. Student *t*-test was used to compare the two groups. **p* < 0.05, AAB vs. Sham.

effect on the AP plateau, the main I_{to} and I_{Ks} K^{+} currents were similar in AAB and Sham. However, I_{K1} contributing to the resting membrane potential and the late repolarization of the AP was reduced at potentials close to the resting membrane in AAB cardiomyocytes (Fig. 6E), which could result from elevated diastolic Ca^{2+} .

4. Discussion

In this study, we show that adaptive modifications of Ca^{2+} cycling through the hypertrophic response to chronic high blood pressure overload play a critical role during early development of heart failure

with nearly-normal ejection fraction (HFpEF). Four weeks after AAB, rat hearts were characterized by an increase of LV mass and concentric LV hypertrophy, a preserved systolic function, and other criteria used for preclinical models of HFpEF including elevated blood pressure, lung congestion, impaired active relaxation, impaired passive filling, enlarged left atrium, and cardiomyocyte hypertrophy [20]. We relied on all of these criteria to ensure investigations on a homogenous population of animals. This approach provided unique access to cardiac cellular and molecular functions not accessible in human patients. The AAB animals presented stiffer cardiomyocytes with stronger contraction and increased Ca^{2+} transient. Ca^{2+} cycling was characterized by SR

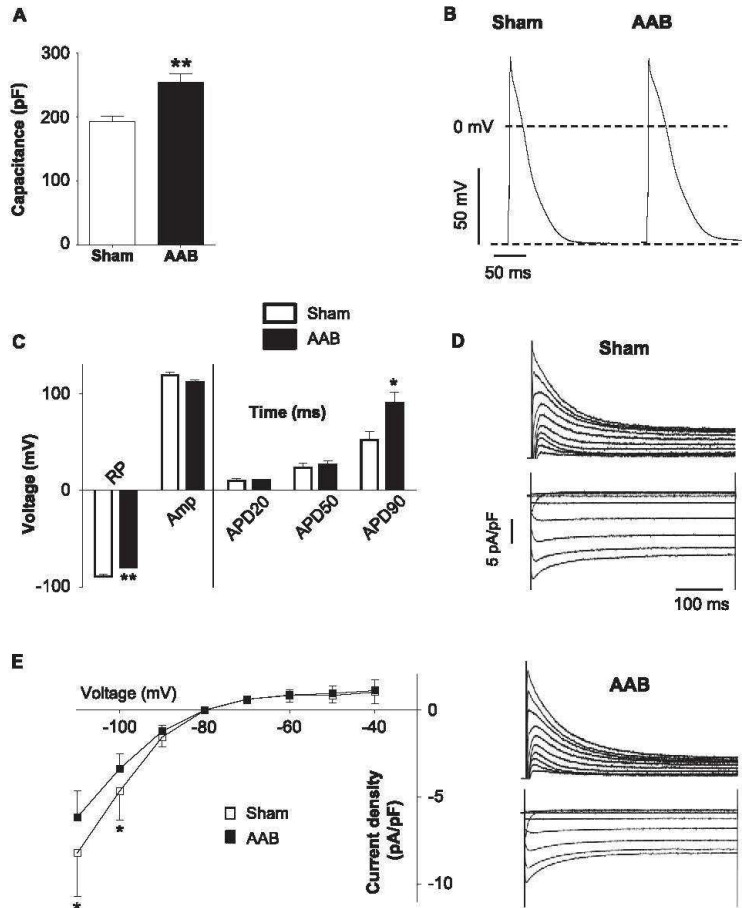


Fig. 6. Electrophysiological properties of LV myocytes from AAB rats. (A) Cell capacitance (in pF) of single myocytes from Sham ($n = 15$) and AAB ($n = 17$). (B) Representative action potential (AP) waveforms recorded in single LV myocytes isolated from Sham (left) and AAB (right) rats. (C) AP properties in Sham ($n = 15$) and AAB ($n = 15$). (D) Representative inward and outward voltage K^+ current recorded from LV myocytes isolated from Sham (top) and AAB (bottom) rats. RP: resting potential (mV); Amp: AP amplitude (mV); APD20, 50, 90: AP durations at 20%, 50% or 90% repolarization (ms). (E) Mean density-to-voltage relationships for I_{K1} recorded in single myocytes from Sham ($n = 14$, white squares) and AAB ($n = 16$, black squares) rats. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. Sham.

Ca^{2+} leak through RyR2, impaired Ca^{2+} extrusion through NCX, and increased PLN/SERCA and pPLN/PLN ratios. The latter protein change may aid in the compensation of the higher PLN/SERCA ratio to rescue SR- Ca^{2+} re-uptake by SERCA2a.

We were able to reproduce clinical facets of HFpEF at a defined time point in the AAB rat model. LV hypertrophy is frequently associated with global diastolic dysfunction and HFpEF in experimental and clinical studies [42]. LV hypertrophy and diastolic dysfunction are common cardiac complications of hypertension, which has stimulated the use of experimental models based on pressure overload [4,5,43–45]. Here, chronic pressure overload promoted early functional and structural cardiac features consistent with HFpEF-like characteristics. Four weeks post-banding, despite only moderate changes in EF, the hearts presented a reduced cardiac performance index (reflected in the increased MPI index) with diastolic dysfunction. The hearts had higher LV filling pressure (estimated by the E/e' ratio), prolonged isovolumic relaxation time (IVRT), and reduced early mitral annulus velocity in line with a rise of LV wall stiffness and impaired active relaxation. These results are consistent with a recent publication on the same model but at a later time point [46]. AAB rats also presented structural, surrogate markers of HFpEF such as concentric LV remodeling and hypertrophy, LA enlargement, and pulmonary edema [20,47–49]. The heterogeneity of interstitial fibrosis among AAB hearts was in line with various degrees

of interstitial fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy evidenced in HFpEF patients [14,19,50,51]. Fibrosis may develop later, suggesting that early signs of HFpEF both *in vivo* and at the cellular level precede fibrosis. These results, taken together, supported this animal model and our selective approach as a robust method for cellular investigations of HFpEF.

Myocardial remodeling in HFpEF differs from that of HFrEF driven primarily by cardiomyocyte death [52]. Although diastolic dysfunction in HFpEF has multiple origins at non-cardiomyocyte levels [53], cardiac cells are the main effector of the contraction/relaxation cycling involved in proper heart pump function. A major finding in our study was evidence that AAB LV cardiomyocytes had a different functional phenotype than controls and HFrEF, particularly in regards to excitation-contraction coupling. The electrical phenotype of the cardiomyocytes was quasi normal, contrasting with the marked AP plateau prolongation and blunting of repolarizing potassium currents I_K , in particular I_{Kr} , reported in compensated hypertrophy and/or end-stage failing human, canine and rat hearts [38–41,54,55]. The positive inotropy of the cardiomyocytes also contrasted sharply with the depressed contraction in HFrEF due mainly to reduced Ca^{2+} transient, reflecting lower SR Ca^{2+} content. This is due to depressed SR Ca^{2+} uptake, resulting from blunted SERCA2a activity (reduced SERCA2a protein and dephosphorylated PLN), and SR Ca^{2+} leak through RyR2 channels [56–58].

Despite opposite functional impacts on cell contraction and Ca^{2+} transient, some of the Ca^{2+} cycling defects seen in HF were however identified in our study. They involved delayed Ca^{2+} transient decay, augmented diastolic Ca^{2+} , irregular Ca^{2+} transients during pacing, Ca^{2+} leakage through RyR2 and aberrant spontaneous diastolic Ca^{2+} waves. Although these effects collectively contribute to SR Ca^{2+} depletion and cause defective cardiac excitation-contraction coupling in HFpEF, this was not the case in our model.

The single, hypertrophic, stiffer LV myocytes (Figs. 6A and 2D) unveiled functional modifications including stronger and faster contractions with delayed relaxation (Fig. 3C,D,H). This positive, cellular inotropy was determined primarily by an increase in Ca^{2+} transient amplitude rather than by an amplified Ca^{2+} sensitivity of the contractile proteins. At the cellular level, our findings of stiffer and hypertrophic LV myocytes were consistent with various reports on HFpEF in human and rodents [17,46,50,51,59,60] and explain in part the increased LV wall stiffness and impaired relaxation of the heart. The force developed by the myocytes depends on both the amount of Ca^{2+} released by the SR after excitation and the Ca^{2+} sensitivity of the contractile machinery. Here, single cell contractions were stronger with both a shorter delay for activation and a delayed relaxation, which was consistent with the increased Ca^{2+} transient amplitude and in line with other studies showing enhanced Ca^{2+} mobilization, particularly during early stages of pressure overload-induced hypertrophy [17,61]. Delayed Ca^{2+} extrusion from the cytosol due to impaired NCX activity (Fig. 3J,L) was also a likely contributor. Enhanced Ca^{2+} cycling between the SR and the cytosol was shown to occur even before hypertrophy development, i.e. during the very first days following AAB [61]. Here, the positive inotropic-like adaptive effect occurred in absence of marked AP plateau prolongation, as confirmed by a lack of modification in the main repolarizing K^+ currents (except I_{Kr}), which was consistent with unchanged L-type Ca^{2+} current. It also did not involve enhanced Ca^{2+} sensitivity of contractile proteins. It remains unclear why the augmented contraction of individual cells did not increase global heart function. Possibilities may include a loss of cardiomyocytes, although this is mainly a HFpEF characteristic, or more likely a variety of non-cardiomyocyte factors as recently reviewed [52].

Four weeks after AAB, Ca^{2+} cycling was characterized by at least four changes occurring in parallel with potentially opposite effects: (i) Ca^{2+} leakage through RyR2 (Fig. 4C); (ii) impaired Ca^{2+} extrusion through NCX (Fig. 3J,L); (iii) increased PLN/SERCA ratio (Fig. 5D), and, (iv) increased pPLN/PLN ratio (Fig. 5E), that may compensate the higher PLN/SERCA ratio to rescue SR Ca^{2+} re-uptake by SERCA2a. Of note, SERCA2a protein abundance was unchanged (Fig. 5A). In normal conditions, Ca^{2+} removal from the cytosol by the SERCA2a pump prevails over NCX activity. As the decline of the Ca^{2+} transient evoked by a caffeine challenge is an index of NCX activity, our results were consistent with an impaired Ca^{2+} extrusion from the cells through the NCX forward mode [62,63]. This was however unrelated to changes in NCX protein expression. Slower decay time of the caffeine-induced Ca^{2+} transient may reflect changes in Na^+ gradient [64] due to elevated intracellular $[\text{Na}^+]$ involving possibly factors such as late Na^+ currents, electrogenic Na^+-K^+ ATPase or Na^+ co-transport. Impaired NCX-dependent Ca^{2+} extrusion has been explained by a shift towards an increased reverse mode activity (Ca^{2+} influx), yet this was excluded in a recent study in human hearts of patients with hypertensive heart disease and HFpEF [60,65]. Leaky RyR2 (late Ca^{2+} sparks) [66] associated with both impaired Ca^{2+} extrusion through NCX and increased PLN/SERCA ratio altogether could contribute to the delay in the decay of the Ca^{2+} transient (Fig. 3H) and elevate diastolic Ca^{2+} (Fig. 3I).

PLN has a primary role in the regulation of SERCA2a activity and thereby is a major determinant of cardiac contractility and relaxation. Dephosphorylated PLN inhibits SERCA2a activity whereas PLN phosphorylation at either Ser16 by PKA or Thr17 by CaMKII reverses this inhibition [67]. The PLN/SERCA2a ratio in AAB cardiomyocytes was increased, which is expected to inhibit SERCA2a activity and decrease

SR Ca^{2+} reuptake as seen in pathophysiological conditions [68,69]. Remarkably, we detected an increased pPLN/PLN ratio in AAB hearts, i.e. PLN was phosphorylated at the CaMKII-specific site (PLN-Thr17). Activation of this CaMKII-specific site (PLN-Thr17) has complex effects. It has been closely associated with an increase in the relaxant effect of a β -adrenergic response [70] but also with reduced β -adrenergic responsiveness in a feline model of chronic pressure overload-induced cardiac hypertrophy [71]. This mechanism may also act as a cardiac beat-by-beat frequency-decoder whereas PKA-mediated phosphorylation (PLN-Ser16) instead responds to exercise, stress or “fight and flight” situations [72]. It may reflect a versatile, adaptive role of PLN and its phosphorylated form to counterbalance impaired NCX activity and RyR2-mediated SR Ca^{2+} leak in an attempt to maintain normal Ca^{2+} cycling in different physiological demands. The exact implications of the increased phosphorylated state of PLN in our model deserve further explorations.

If the cell and the SR are overloaded with Ca^{2+} then abnormal Ca^{2+} transients (Fig. 4A) and spontaneous Ca^{2+} waves (Fig. 4B) are expected to appear [63]. A high occurrence of Ca^{2+} sparks, fueling SR Ca^{2+} leak and cytosolic Ca^{2+} overload, was an unexpected early signature in our model. Late SR Ca^{2+} leak, occurring after an initial slowing of Ca^{2+} transient decay, has been proposed to be a consequence rather than a cause of diastolic dysfunction in a rat model of chronic kidney disease (CKD) with HFpEF [60]. Post-translational modifications of RyR2, such as nitrosylation and CaMKII-dependent phosphorylation, can lead to SR Ca^{2+} leakage [58,73,74] but they were not detected here (Fig. 5). Increased cytosolic Ca^{2+} , in addition to maintained luminal Ca^{2+} , is expected to increase the likelihood of spontaneous release events. Ca^{2+} dependent blockade of the inward rectifier current I_{Kr} resulting from the rise in diastolic Ca^{2+} may contribute to the occurrence of the abnormal cellular Ca^{2+} events [24,75,76]. Importantly, the Ca^{2+} leak identified here may not only provide a pro-arrhythmogenic substrate but could also be involved in the progression of HFpEF. Beneficial effects of enhanced SR Ca^{2+} uptake through PLN phosphorylation may be lost when associated with SR Ca^{2+} leak [67]. In addition, Ca^{2+} sensitive signaling factors involved in cardiac hypertrophy are known to respond to sustained changes in diastolic Ca^{2+} concentration [77].

The current study was constrained by a number of limitations. First, the replication of human HFpEF in animal models is difficult. However, there is a need for such investigations with an emerging interest for preclinical models including rodents [20,43,78,79] [80]. A recent review reported a set of clinical criteria helping to define animal models of HFpEF [20], that we applied to this work. Various models of HFpEF exist where both advantages and disadvantages are evident [43]. In particular, the models have different etiologies and temporal progression of the disease. For example, in the comparison of Ca^{2+} handling in different models including human, there are both similarities and disparities underlining complexity and multimodal adaptation to different insults [18,46,60,61,65]. As highlighted by Primessnig and collaborators, “findings should be interpreted in this context and need to be validated in HFpEF of different aetiology”. A second limitation related to the study is related to neurohormonal activation. This is generally considered a characteristic of systolic HF, but may also be involved in HFpEF [81,82]. There is extensive literature establishing that the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays a role in inducing hypertrophy during pressure overload. Diminished blood pressure distal to the constriction transiently stimulates the secretion of renin to increase blood pressure shortly (3 days) after constriction [83]. Angiotensin receptor inhibition does not reverse the effects of banding, and removal of banding does reduce hypertrophy suggesting that angiotensin does not play a major role in causing pressure overload-induced hypertrophy or in maintaining such hypertrophy [84]. Whether RAAS activation and its extent due to the constriction itself and/or related to the progression of the pathology was involved in our experimental conditions was not investigated in the current study. Third, despite a trend, we found no statistical difference in the amplitude of

caffeine-evoked Ca^{2+} transient content between Sham and AAB (Fig. 3K) using caffeine challenge. Indo-1, which we used here, is a high-affinity Ca^{2+} indicator of choice for qualitative comparisons and detection of changes in diastolic Ca^{2+} . However, it may have some limitation for the detection of differences in peak Ca^{2+} between groups in the caffeine experiments. Moderate-affinity dyes, such as the fluo-4 analog fluo-5F, have been preferred by some authors for the detection of variations of cytosolic Ca^{2+} during caffeine challenge [27,29].

In summary, cardiomyocytes, the main effectors of cardiac contraction, play a critical role in a sequence of events induced by chronic cardiac pressure overload triggering concentric hypertrophy, then inducing a heart status recapitulating criteria of HFpEF. We underscored the relationship between early systolic adaptations of Ca^{2+} handling and subsequent maladaptive diastolic changes [42]. We have identified different adaptations of Ca^{2+} handling that may be, presumably, beneficial or detrimental such as impaired NCX activity, Ca^{2+} leak through RyR2 channels dual together with a dual effect on the PLN/pPLN system regulating SERCA2a activity. These effects promote elevated cytosolic Ca^{2+} , which could contribute to impaired relaxation in addition to myocardial stiffness. This may also initiate further deterioration of Ca^{2+} homeostasis in the progression of the disease. This approach here provides an interesting access to identify cellular and molecular dysfunctions not accessible in human with a potential for drug testing. All these aspects warrant further investigation to compare HFpEF of different etiologies [60] and identify the most relevant target proteins.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

We thank the small animal imaging platform of Montpellier (IPAM; <http://www.ipam.cnrs.fr>) for access to the echocardiography.

Funding sources

This work was supported by the Bilateral Research Collaborative program between France and Lebanon (PHC CEDRE 2015, N° 32955NG to SRo, SRi and NF), the Research Council of Saint Joseph University of Beirut (travel, SRo), the *Fondation de France* (N° 2013-00038586 to SR and JT), and the Bilateral Research Collaborative program CAPES-COFECUB between Brazil and France (n°768/13 to SR; post-doctoral grant to GRdA).

Conflict of interests

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.005>.

References

- [1] E. Braunwald, The war against heart failure: the Lancet lecture, *Lancet Lond. Engl.* 385 (2015) 812–824.
- [2] W.J. Paulus, C. Tschöpe, J.E. Sanderson, C. Rusconi, F.A. Flachskampf, F.E. Rademakers, et al., How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology, *Eur. Heart J.* 28 (2007) 2539–2550.
- [3] P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, H. Bueno, J.G.F. Cleland, A.J.S. Coats, et al., 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart

- failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC, *Eur. Heart J.* (2016), <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>.
- [4] M.A. Ul-Haq, C. Wong, D.L. Hare, Heart failure with preserved ejection fraction: an insight into its prevalence, predictors, and implications of early detection, *Rev. Cardiovasc. Med.* 16 (2015) 20–27.
- [5] F.H. Messerli, S.F. Rimoldi, S. Bangalore, The transition from hypertension to heart failure: contemporary update, *JACC Heart Fail.* 5 (2017) 543–551.
- [6] L.-M. Wu, D.L. An, Q.-Y. Yao, Y.Z. Ou, Q. Lu, M. Jiang, et al., Hypertrophic cardiomyopathy and left ventricular hypertrophy in hypertensive heart disease with mildly reduced or preserved ejection fraction: insight from altered mechanics and native T1 mapping, *Clin. Radiol.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.crad.2017.04.019>.
- [7] J. Butler, G.C. Fonarow, M.R. Zile, C.S. Lam, L. Roessig, E.B. Schelbert, et al., Developing therapies for heart failure with preserved ejection fraction: current state and future directions, *JACC Heart Fail.* 2 (2014) 97–112.
- [8] J.E. Ho, P. Gona, M.J. Pencina, J.V. Tu, P.C. Austin, R.S. Vasan, et al., Discriminating clinical features of heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in the community, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 1734–1741.
- [9] S.J. Shah, D.W. Kitzman, B.A. Borlaug, L. van Heerebeek, M.R. Zile, D.A. Kass, et al., Phenotype-specific treatment of heart failure with preserved ejection fraction: a multiorgan roadmap, *Circulation* 134 (2016) 73–90.
- [10] A.S. Desai, Heart failure with preserved ejection fraction: time for a new approach? *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 272–274.
- [11] M. Galderisi, Diastolic dysfunction and diastolic heart failure: diagnostic, prognostic and therapeutic aspects, *Cardiovasc. Ultrasound* 3 (2005) 9.
- [12] A.A. Oktay, S.J. Shah, Diagnosis and management of heart failure with preserved ejection fraction: 10 key lessons, *Curr. Cardiol. Rev.* 11 (2015) 42–52.
- [13] S.-H. Wan, M.W. Vogel, H.H. Chen, Preclinical diastolic dysfunction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 63 (2014) 407–416.
- [14] S.F. Mohammed, S. Hussain, S.A. Mirzoyev, W.D. Edwards, J.J. Maleszewski, M.M. Redfield, Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction, *Circulation* 131 (2015) 550–559.
- [15] L. van Heerebeek, W.J. Paulus, Understanding heart failure with preserved ejection fraction: where are we today? *Neth. Hear. J.* 24 (2016) 227–236.
- [16] M.R. Zile, C.F. Baicu, J.S. Ikonomidou, R.E. Stroud, P.J. Nietert, A.D. Bradshaw, et al., Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin, *Circulation* 131 (2015) 1247–1259.
- [17] N. Hamdani, C. Franssen, A. Lourenço, I. Falcão-Pires, D. Fontoura, S. Leite, et al., Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model, *Circ. Heart Fail.* 6 (2013) 1239–1249.
- [18] I. Adeniran, D.H. MacIver, J.C. Hancock, H. Zhang, Abnormal calcium homeostasis in heart failure with preserved ejection fraction is related to both reduced contractile function and incomplete relaxation: an electromechanically detailed biophysical modeling study, *Front. Physiol.* 6 (2015) 78.
- [19] A. Borbidy, J. van der Velden, Z. Papp, J.G.F. Bronzwaer, I. Eides, G.J.M. Stienen, et al., Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure, *Circulation* 111 (2005) 774–781.
- [20] M. Valero-Muñoz, W. Backman, F. Sam, Murine models of heart failure with preserved ejection fraction: a ‘fishing expedition’, *JACC Basic Transl. Sci.* 2 (2017) 770–789.
- [21] D. Vitiello, J. Boissière, G. Doucende, S. Gayraud, A. Polge, P. Faure, et al., β -Adrenergic receptors desensitization is not involved in exercise-induced cardiac fatigue: NADPH oxidase-induced oxidative stress as a new trigger, *J. Appl. Physiol.* (1985) 111 (2011) 1242–1248.
- [22] I. Mercier, M. Pham-Dang, R. Clement, H. Gosselin, F. Colombo, J.-L. Rouleau, et al., Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET(A) receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis, *Br. J. Pharmacol.* 136 (2002) 685–692.
- [23] O. Cazorla, S. Szilagyi, J.-Y. Le Guennec, G. Vassort, A. Lacampagne, Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction, *FASEB J.* 19 (2005) 88–90.
- [24] J. Fauconnier, A. Lacampagne, J.-M. Rauzier, G. Vassort, S. Richard, Ca^{2+} -dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc. Res.* 68 (2005) 204–212.
- [25] L. Andre, J. Boissière, C. Reboul, R. Perrier, S. Zalvidea, G. Meyer, et al., Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181 (2010) 587–595.
- [26] F. Hohendanner, S. Walther, J.T. Maxwell, S. Kettlewell, S. Awad, G.L. Smith, et al., Inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca^{2+} release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts, *J. Physiol.* 593 (2015) 1459–1477.
- [27] N. MacQuaide, J. Dempster, G.L. Smith, Assessment of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion during spontaneous Ca^{2+} waves in isolated permeabilized rabbit ventricular cardiomyocytes, *Biophys. J.* 96 (2009) 2744–2754.
- [28] J. Thireau, S. Zalvidea, P. Meschin, J.-L. Pasquie, F. Aimond, S. Richard, ACE inhibitor delapril prevents Ca^{2+} -dependent blunting of IK1 and ventricular arrhythmia in ischemic heart disease, *Curr. Mol. Med.* 15 (2015) 642–651.
- [29] N. MacQuaide, J. Dempster, G.L. Smith, Measurement and modeling of Ca^{2+} waves in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes, *Biophys. J.* 93 (2007) 2581–2595.
- [30] H. Kim, H.-J. Yoon, H.-S. Park, Y.-K. Cho, C.-W. Nam, S.-H. Hur, et al., Usefulness of tissue Doppler imaging-myocardial performance index in the evaluation of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction, *Clin. Cardiol.* 34 (2011) 494–499.
- [31] C. Tei, L.H. Ling, D.O. Hodge, K.R. Bailey, J.K. Oh, R.J. Rodeheffer, et al., New

- index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function—a study in normals and dilated cardiomyopathy, *J. Cardiol.* 26 (1995) 357–366.
- [32] T.D. Nguyen, Y. Shingu, M. Schwarzer, A. Schrepper, T. Doenst, The E-wave deceleration rate E/DT outperforms the tissue Doppler-derived index E/e' in characterizing lung remodeling in heart failure with preserved ejection fraction, *PLoS One* 8 (2013) e82077.
- [33] O. Cazorla, Y. Wu, T.C. Irving, H. Granzier, Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes, *Circ. Res.* 88 (2001) 1028–1035.
- [34] H. Cheng, W.J. Lederer, Calcium sparks, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 1491–1545.
- [35] J. Fauconnier, J. Thireau, S. Reiken, C. Cassan, S. Richard, S. Matecki, et al., Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 1559–1564.
- [36] J. Thireau, S. Karam, S. Roberge, J. Roussel, F. Aimond, C. Cassan, et al., β -adrenergic blockade combined with subcutaneous B-type natriuretic peptide: a promising approach to reduce ventricular arrhythmia in heart failure? *Heart Br. Card. Soc.* 100 (2014) 833–841.
- [37] M. Fernández-Velasco, A. Rueda, N. Rizzi, J.-P. Benitah, B. Colombi, C. Napolitano, et al., Increased Ca^{2+} sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circ. Res.* 104 (2009) 201–209 (12p following 209).
- [38] F. Aimond, J.L. Alvarez, J.M. Rauzier, P. Lorente, G. Vassort, Ionic basis of ventricular arrhythmias in remodeled rat heart during long-term myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.* 42 (1999) 402–415.
- [39] S. Käbb, H.B. Nuss, N. Chiamvimonvat, B. O'Rourke, P.H. Pak, D.A. Kass, et al., Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure, *Circ. Res.* 78 (1996) 262–273.
- [40] S. Richard, F. Leclercq, S. Lemaire, C. Piot, J. Nargeot, Ca^{2+} currents in compensated hypertrophy and heart failure, *Cardiovasc. Res.* 37 (1998) 300–311.
- [41] E. Pernier, B.-G. Kerfant, N. Lalevee, P. Bideaux, M.F. Rossier, S. Richard, et al., Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction, *Circulation* 110 (2004) 776–783.
- [42] F.R. Heinzel, F. Hohendanner, G. Jin, S. Sedej, F. Edelmann, Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction, *J. Appl. Physiol.* (1985) 119 (2015) 1233–1242.
- [43] G. Conceição, I. Heino, A.P. Lourenço, D.J. Duncker, I. Falcão-Pires, Animal models of heart failure with preserved ejection fraction, *Neth. Hear. J.* 24 (2016) 275–286.
- [44] M. Klapholz, M. Maurer, A.M. Lowe, F. Messineo, J.S. Meisner, J. Mitchell, et al., Hospitalization for heart failure in the presence of a normal left ventricular ejection fraction: results of the New York Heart Failure Registry, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 1432–1438.
- [45] A.A. Oktay, S.J. Shah, Current perspectives on systemic hypertension in heart failure with preserved ejection fraction, *Curr. Cardiol. Rep.* 16 (2014) 545.
- [46] Å.T. Røe, J.M. Aronson, K. Skårådal, N. Hamdani, W.A. Linke, H.E. Danielsen, et al., Increased passive stiffness promotes diastolic dysfunction despite improved Ca^{2+} handling during left ventricular concentric hypertrophy, *Cardiovasc. Res.* (2017), <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx087>.
- [47] S.R. Houser, K.B. Margulies, A.M. Murphy, F.G. Spinale, G.S. Francis, S.D. Prabhu, et al., Animal models of heart failure, *Circ. Res.* 111 (2012) 131–150.
- [48] B.M. Massie, P.E. Carson, J.J. McMurray, M. Komajda, R. McKelvie, M.R. Zile, et al., Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 2456–2467.
- [49] A.M. Shah, B. Claggett, N.K. Sweitzer, S.J. Shah, I.S. Anand, E. O'Meara, et al., Cardiac structure and function and prognosis in heart failure with preserved ejection fraction: findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial, *Circ Heart Fail.* 7 (2014) 740–751.
- [50] L. van Heerebeek, A. Borbély, H.W.M. Niessen, J.G.F. Bronzwaer, J. van der Velden, G.J.M. Stienen, et al., Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure, *Circulation* 113 (2006) 1966–1973.
- [51] L. van Heerebeek, N. Hamdani, M.L. Handoko, I. Falcão-Pires, R.J. Musters, K. Kupreishvili, et al., Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension, *Circulation* 117 (2008) 43–51.
- [52] W.J. Paulus, C. Tschöpe, A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 263–271.
- [53] C. Tschöpe, S. Van Linthout, New insights in (inter)cellular mechanisms by heart failure with preserved ejection fraction, *Curr. Heart Fail. Rep.* 11 (2014) 436–444.
- [54] D.J. Beuckelmann, M. Näbauer, E. Erdmann, Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure, *Circulation* 85 (1992) 1046–1055.
- [55] R. Cornet, R. Wilders, A.O. Verkerk, R.F. Wiegman, D. Benoist, O. Bernus, Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1832) 2432–2441.
- [56] M. Lindner, M.C. Brandt, H. Sauer, J. Hescheler, T. Böhle, D.J. Beuckelmann, Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure, *Cell Calcium* 31 (2002) 175–182.
- [57] M. Luo, M.E. Anderson, Ca^{2+} cycling in heart failure, *Circ. Res.* 113 (2013) 690–708.
- [58] S.O. Marx, A.R. Marks, Dysfunctional ryanodine receptors in the heart: new insights into complex cardiovascular diseases, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 58 (2013) 225–231.
- [59] M. Methawasin, J.G. Strom, R.E. Slater, V. Fernandez, C. Saripalli, H. Granzier, Experimentally increasing the compliance of titin through RNA binding motif-20 (RBM20) inhibition improves diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction, *Circulation* 134 (2016) 1085–1099.
- [60] U. Primessnig, P. Schönleitner, A. Höll, S. Pfeiffer, T. Bracic, T. Rau, et al., Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction, *Eur. J. Heart Fail.* 18 (2016) 987–997.
- [61] B.M.R. Carvalho, R.A. Bassani, K.G. Franchini, J.W.M. Bassani, Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload-induced hypertrophy, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H1803–H1813.
- [62] D.A. Eisner, A.W. Trafford, M.E. Diaz, C.L. Overend, S.C. O'Neill, The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation, *Cardiovasc. Res.* 38 (1998) 589–604.
- [63] L.A. Venetucci, A.W. Trafford, S.C. O'Neill, D.A. Eisner, Na/Ca exchange: regulator of intracellular calcium and source of arrhythmias in the heart, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099 (2007) 315–325.
- [64] B.C. Willis, S.V. Pandit, D. Ponce-Balbuena, M. Zaroso, G. Guerrero-Serna, B. Limbu, et al., Constitutive intracellular Na^{+} 4, *Circulation* 133 (2016) 2348–2359.
- [65] K.E. Runte, S.P. Bell, D.E. Selby, T.N. Häußler, T. Ashikaga, M.M. LeWinter, et al., Relaxation and the role of calcium in isolated contracting myocardium from patients with hypertensive heart disease and heart failure with preserved ejection fraction, *Circ Heart Fail.* 10 (2017), <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004311>.
- [66] E.D. Fowler, C.H.T. Kong, J.C. Hancock, M.B. Cannell, Late Ca^{2+} sparks and ripples during the systolic Ca^{2+} transient in heart muscle cells, *Circ. Res.* 122 (2018) 473–478.
- [67] A. Mattiazzi, E.G. Kranias, The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 5.
- [68] G. Chu, E.G. Kranias, Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models, *Basic Res. Cardiol.* 97 (Suppl. 1) (2002) 143–148.
- [69] A.G. Brittan, K.S. Ginsburg, G. Chu, A. Yatani, B.M. Wolska, A.G. Schmidt, et al., Chronic SR Ca^{2+} -ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca^{2+} transport, *Circ. Res.* 92 (2003) 769–776.
- [70] A. Mattiazzi, C. Mundiña-Wellenmann, C. Guoxiang, L. Vittone, E. Kranias, Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions, *Cardiovasc. Res.* 68 (2005) 366–375.
- [71] G.D. Mills, H. Kubo, D.M. Harris, R.M. Berretta, V. Piacentino, S.R. Houser, Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H61–H70.
- [72] D. Hagemann, R.-P. Xiao, Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart, *Trends Cardiovasc. Med.* 12 (2002) 51–56.
- [73] A.R. Marks, Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 46–52.
- [74] X. Ai, J.W. Curran, T.R. Shannon, D.M. Bers, S.M. Pogwizd, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure, *Circ. Res.* 97 (2005) 1314–1322.
- [75] D. Eisner, Calcium in the heart: from physiology to disease, *Exp. Physiol.* 99 (2014) 1273–1282.
- [76] D.A. Eisner, T. Kashimura, S.C. O'Neill, L.A. Venetucci, A.W. Trafford, What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46 (2009) 474–481.
- [77] S.A. Goonasekera, J.D. Molkenkin, Unraveling the secrets of a double life: Contractile versus signaling Ca^{2+} in a cardiac myocyte, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 317–322.
- [78] S. Horgan, C. Watson, N. Glezeva, J. Baugh, Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction, *J. Card. Fail.* 20 (2014) 984–995.
- [79] G. Tarone, J.-L. Balligand, J. Bauersachs, A. Clerf, L. De Windt, S. Heymans, et al., Targeting myocardial remodeling to develop novel therapies for heart failure: a position paper from the working group on myocardial function of the European Society of Cardiology, *Eur. J. Heart Fail.* 16 (2014) 494–508.
- [80] M. Schnelle, N. Catibog, M. Zhang, A.A. Nabeebaccus, G. Anderson, D.A. Richards, et al., Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 114 (2018) 20–28.
- [81] G. Güder, J. Bauersachs, S. Prantz, D. Weismann, B. Allolio, G. Ertl, et al., Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure, *Circulation* 115 (2007) 1754–1761.
- [82] D.W. Kitzman, W.C. Little, P.H. Brubaker, R.T. Anderson, W.G. Hundley, C.T. Marburger, et al., Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure, *JAMA* 288 (2002) 2144–2150.
- [83] K.M. Baker, M.I. Chelmin, S.K. Wixson, J.F. Aceto, Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats, *Am. J. Phys.* 259 (1990) H324–H332.
- [84] R. Mohabir, S.D. Young, A.M. Strosberg, Role of angiotensin in pressure overload-induced hypertrophy in rats: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors, an ATI receptor antagonist, and surgical reversal, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23 (1994) 291–299.

Supplementary Data & Materials

Early calcium handling imbalance in pressure overload-induced heart failure with nearly normal left ventricular ejection fraction.

Sarah Rouhana^{1,2,*}, Charlotte Farah^{1,*}, Jerome Roy¹, Amanda Finan¹, Glaucy Rodrigues de Araujo^{1,3}, Patrice Bideaux¹, Valérie Scheuermann¹, Youakim Saliba², Cyril Reboul⁴, Olivier Cazorla¹, Franck Aimond¹, Sylvain Richard^{1,¥}, Jérôme Thireau¹, Nassim Fares²

Running title: Ca²⁺ handling in heart diastolic dysfunction

1: Université de Montpellier, CNRS UMR 9214, INSERM U1046, Montpellier, France

2 : Université Saint Joseph, Beyrouth, Liban

3 : CiPharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil)

4 : Université Avignon, LAPEC EA4278, Avignon, France

¥ corresponding author: Sylvain Richard

Inserm 1046 - UMR CNRS 9214 – Université de Montpellier
Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles
CHU Arnaud de Villeneuve, Bâtiment Crastes de Paulet
371 avenue du doyen Gaston Giraud
34295 MONTPELLIER Cedex 5, (FRANCE)
Phone: +33 467 415 241
Fax: +33 467 415 242
Email: sylvain.richard@inserm.fr

Suppl. figure S1

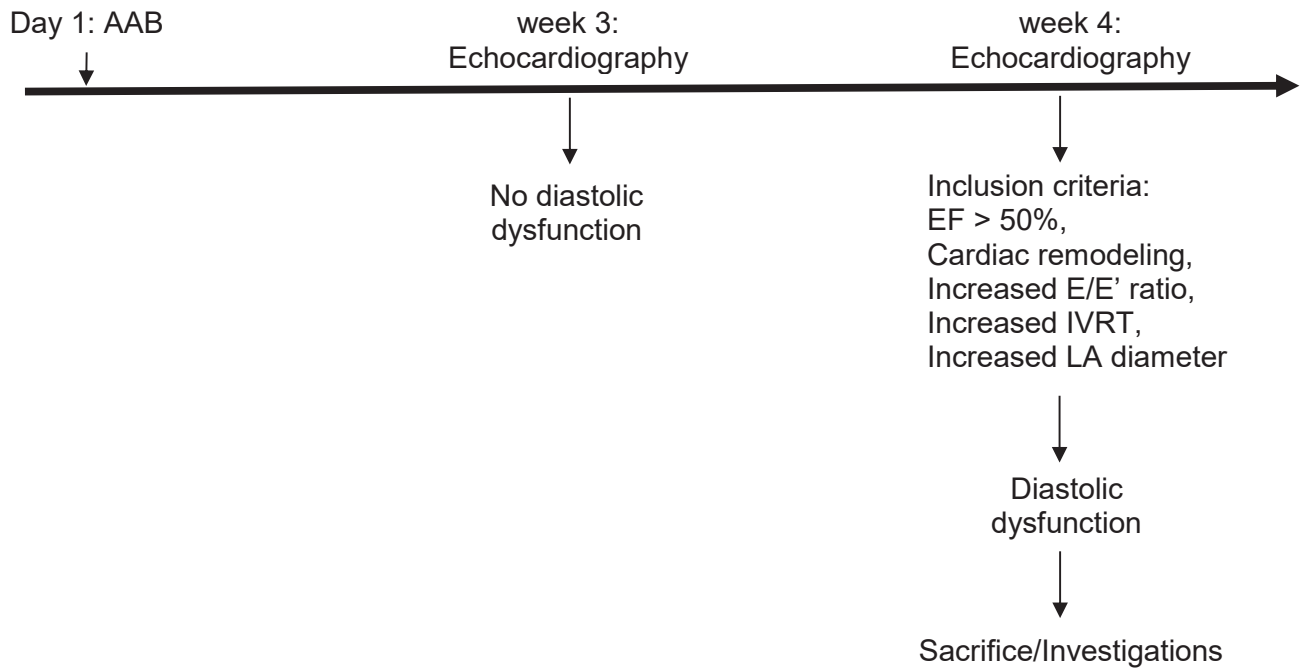


Figure 1S

Experimental procedure and echocardiographic evaluation in AAB rats.

Cardiac morphology and function were evaluated by echocardiographic analysis to identify early diastolic dysfunction. Diastolic dysfunction was observed consistently only at 4 weeks after AAB surgery. No clear alterations were evidenced three weeks post-surgery. Further experimental analyses were performed only on rats characterized with preserved ejection fraction (EF) and features of diastolic dysfunction (inclusion criteria) 4 weeks after AAB.

Suppl. figure S2

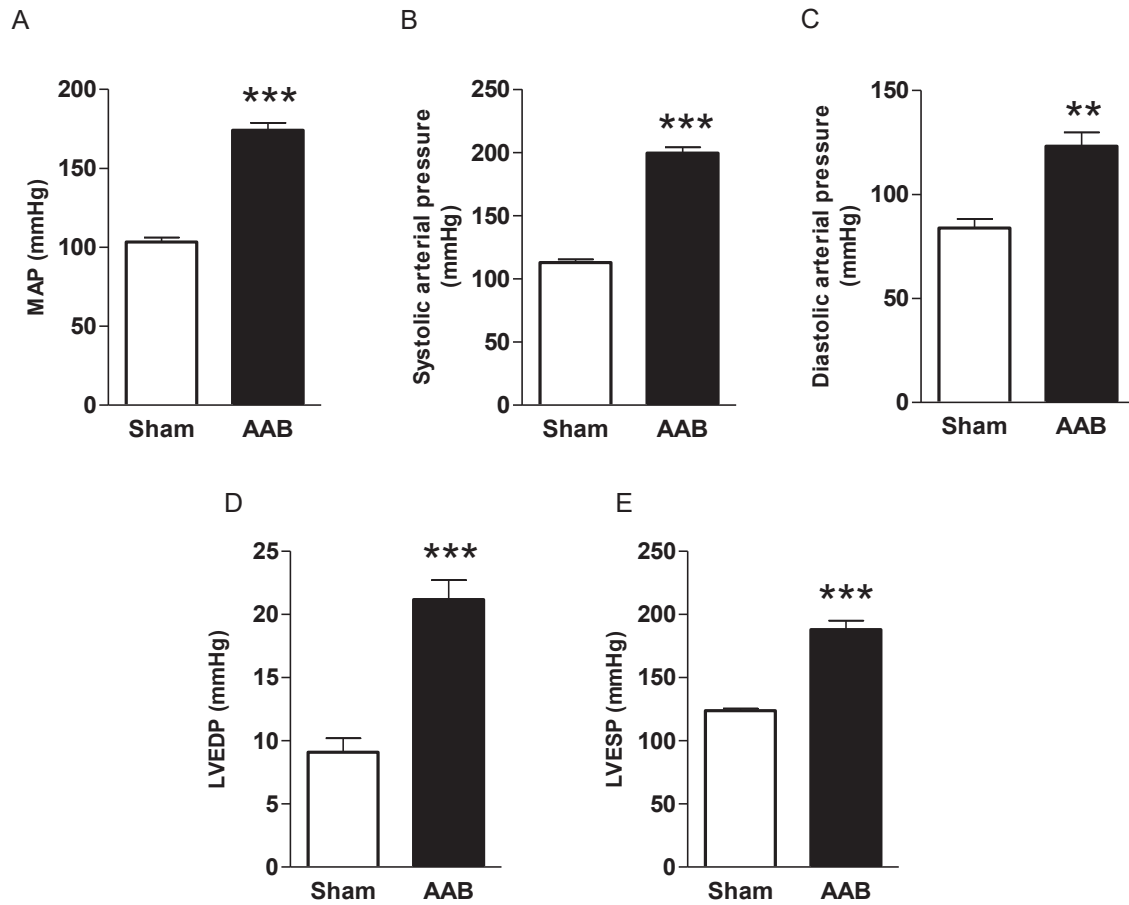


Figure S2

In vivo hemodynamic investigations of arterial and left ventricular pressures in AAB rats 4 weeks post-surgery. (A) Mean arterial pressure (MAP). (B) Systolic arterial pressure. (C) Diastolic arterial pressure. (D) Left intraventricular end diastolic pressure (LVEDP). (E) Left intraventricular end systolic pressure (LVESP). Results are expressed as mean \pm SEM. Student t-test was used for comparison. ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ AAB (n=5) vs. Sham (n=4).**

Method: Experiments were performed in intact closed-chest rats as described previously.^{1,2} Rats were anesthetized (Isoflurane 1.5-2.5%) and placed in a supine position on an automatic heating pad. Body temperature, measured via a rectal probe, was maintained at 37 °C throughout the procedure. Invasive measurements of both arterial and left intraventricular pressure were performed using a 2F microtip pressure catheter (SPR407, Millar Instruments, Houston, Tx) introduced in the right carotid artery. The catheter was subsequently advanced into the LV to measure systolic and end-diastolic pressures. The analog outputs of the arterial pressure and heart rate were collected with an MP35 module (Biopac System, Gotela, Santa-Barbara, CA). Data were processed using BIOPAC Lab Pro 3.7 software.

Suppl. figure S3

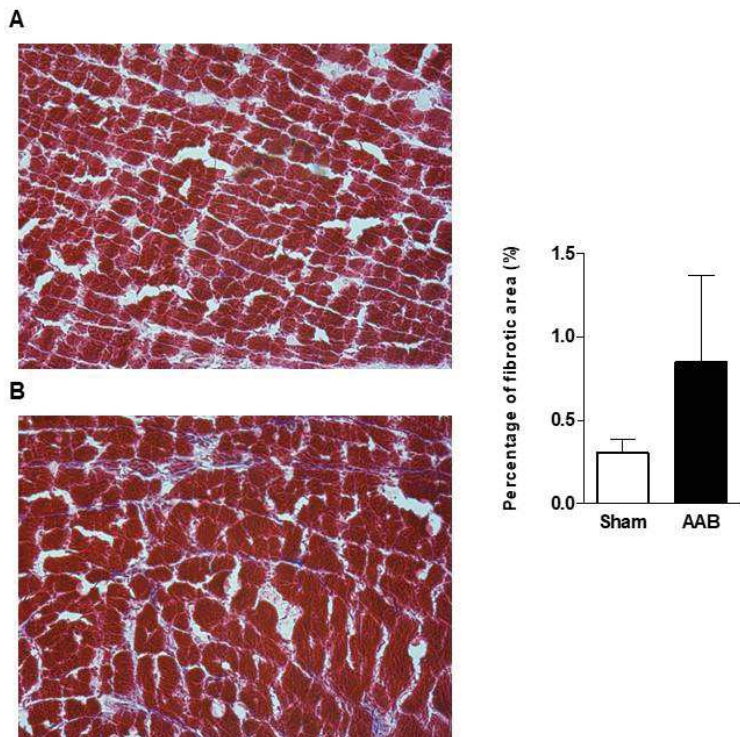


Figure S3

Interstitial fibrosis in AAB rats 4 weeks post-surgery. (A) Left panel: interstitial fibrosis in the hearts of a sham rat (A) and an AAB rat (B). Right panel: quantification of the percentage area of interstitial fibrosis in sham hearts (n=4) and AAB hearts (n=4).

Method: Quantification of interstitial fibrosis was performed using Masson's trichrome staining of the left ventricle from sham and AAB rats. Cryosections were fixed with 4% PFA (paraformaldehyde) for one hour at room temperature, followed by incubation in Bouin's solution over night. The following day, the tissue samples were washed under a running tap water for two minutes and rinsed with distilled water. Sections were stained in Harris Hematoxylin solution for three minutes, rinsed under running tap water for 10 min, and then rinsed with distilled water for one minute. The Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin solution was added for 5 min followed by a rinse with distilled water. The stain was differentiated in phosphotungstic/phosphomolybdic acid solution for 10 min; transferred directly into aniline blue solution for 5 min; rinsed with distilled water; differentiated in 1% acetic acid for 1 min, rinsed with distilled water and dehydrated, cleared and mounted on a coverslip.

Suppl. figure S4

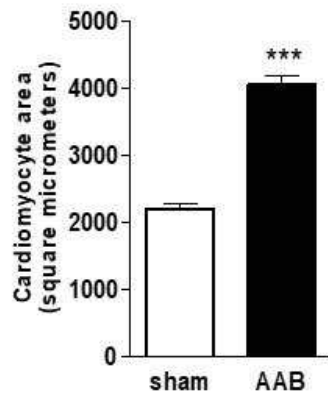


Figure S4

LV cardiomyocytes surface area in AAB rats 4 weeks post-surgery. Cardiomyocyte area was measured using ImageJ software. Results are expressed as mean \pm SEM for sham rats (n=121 cells/N=3 hearts), and AAB rats (n=89 cells/N= 3 hearts). Results are expressed as mean \pm SEM. Student t-test was used for comparison. *** p<0.001 AAB vs. Sham.

References

- 1 Vitiello D, Boissière J, Doucende G, Gayrard S, Polge A, Faure P et al. β -Adrenergic receptors desensitization is not involved in exercise-induced cardiac fatigue: NADPH oxidase-induced oxidative stress as a new trigger. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2011; 111: 1242–1248.
- 2 Mercier I, Pham-Dang M, Clement R, Gosselin H, Colombo F, Rouleau J-L et al. Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET(A) receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 685–692.

Discussion de la publication

Le premier objectif de ma thèse était de mettre au point, dans un premier temps, un modèle expérimental d'IC/FEp. Une fois le modèle établi et caractérisé, nous avons voulu évaluer les composantes cellulaires et moléculaires impliquées dans la pathogenèse de l'IC/FEp. Il est avant tout important de noter que notre objectif n'était pas d'établir un nouveau modèle d'IC/FEp en tant que tel (ce n'était pas la finalité) mais d'investiguer le phénotype cellulaire qui accompagne le cœur récapitulant les critères essentiels de l'IC/FEp. Reproduire d'une façon fidèle l'IC/FEp humaine chez les animaux, surtout chez les rongeurs, est un défi, puisqu'il est difficile d'extrapoler les critères de classification de l'IC/FEp adoptée chez l'homme, notamment le seuil de la FE, aux modèles animaux expérimentaux. La classification de l'IC/FEp chez les humains et les modèles animaux évolue de manière significative, mais elle reste toujours délicate et sujet à controverse. Toutefois, il existe un intérêt émergent majeur pour les modèles animaux précliniques (Horgan *et al.*, 2014; Tarone *et al.*, 2014; Conceicao *et al.*, 2016; Valero-Muñoz *et al.*, 2017), vu le besoin d'étudier les mécanismes sous-jacents de l'IC/FEp. Un large éventail de modèles animaux a été utilisé ces dernières années. Ils présentent donc à la fois des avantages et des inconvénients. (Conceicao *et al.*, 2016). Une revue récente rappelle les indicateurs pouvant aider à définir des modèles animaux d'IC/FEp (Valero-Muñoz *et al.*, 2017) (**Figure D1**).

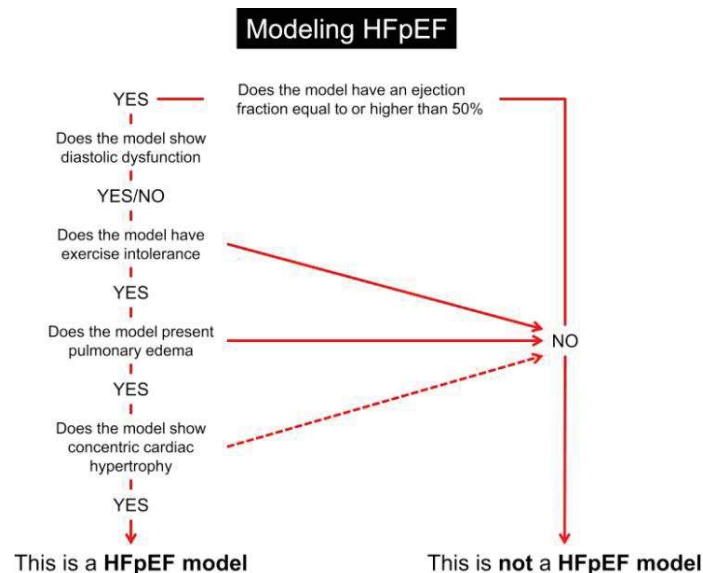


Figure D 1 : Arbre d'aide à la décision identifiant les principales caractéristiques à remplir lors de la modélisation de l'IC/FEp dans les études précliniques (Valero-Muñoz *et al.*, 2017).

Nous avons ainsi utilisé un ensemble de caractéristiques cliniques pour déterminer si notre modèle choisi présente des critères de l'IC/FEp.

Choix du modèle : Dans les études expérimentales rapportées dans la littérature, l'hypertrophie du VG a été fréquemment associée à un dysfonctionnement diastolique global et à l'IC/FEp (Heinzel *et al.*, 2015). L'hypertrophie du VG et le dysfonctionnement diastolique sont des complications cardiaques courantes de l'hypertension. Partant de ce concept, des modèles expérimentaux basés sur la surcharge de pression ont été proposés pour reproduire l'IC/FEp (Klapholz *et al.*, 2004; Oktay and Shah, 2014; UI Haq *et al.*, 2015; Conceicao *et al.*, 2016; Messerli *et al.*, 2017). C'est ainsi que, nous avons choisi un modèle connu dans la littérature pour l'étude de l'hypertrophie cardiaque. Dans ce modèle, une surcharge de pression est créée par constriction de l'aorte abdominale. À trois semaines post-chirurgie, nous avons évalué par échocardiographie la première mesure des paramètres de la fonction systolique et diastolique chez les animaux Sham et AAB. L'altération de la fonction diastolique n'était pas visible à ce stade, et la fonction systolique a toujours été préservée. Les mesures ont été reprises à la quatrième semaine et à la cinquième semaine. Ces données échocardiographiques nous ont permis de déterminer la phase de transition de l'hypertrophie vers l'IC ainsi que l'installation de la dysfonction diastolique et l'évolution de l'IC/FEp. En effet, à la quatrième semaine post-chirurgie, l'altération du remplissage ainsi que le temps de relaxation et le remodelage cardiaque sont devenus détectables. Le domaine de temps de quatre semaines après la chirurgie, représente le temps minimal requis pour le développement des dysfonctionnements diastoliques de l'IC/FEp. D'autre part, vu que l'IC diastolique peut éventuellement progresser vers une altération de la fonction systolique au cours du temps (en général plusieurs semaines) (Litwin *et al.*, 1995; Conceicao *et al.*, 2016), nous avons alors choisi d'effectuer les études cellulaires et moléculaires à la quatrième semaine, chez les animaux présentant tous les critères de l'IC/FEp. **Le choix du modèle expérimental ainsi que sa mise au point sont des objectifs qui ont été réalisés durant la première année de la thèse en alternance entre les deux laboratoires.**

Critères d'inclusion : En effet, la classification des patients dans l'IC/FEp nécessite la présence des signes cliniques de l'IC et une FE supérieure à 50% (Ponikowski *et al.*, 2016). Nous avons donc exclu les animaux AAB avec une FE inférieure à 55% (34% des animaux) afin de garantir une marge pour des investigations ultérieures. Dans notre travail, nous ne nous sommes pas

appuyés exclusivement sur la FE. Il est à noter que notre modèle récapitule de multiples critères tels que la tension artérielle élevée, la congestion pulmonaire, l'hypertrophie concentrique, l'augmentation de la masse du VG, l'altération de la relaxation active, l'altération du remplissage passif, l'élargissement de l'oreillette gauche et l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ces critères sont proposés dans l'approche de Valero-Muñoz et ses collaborateurs (Figure D1), pour aider à déterminer si un modèle préclinique pourrait être considéré comme un modèle d'IC/FEp. Dans notre étude, seuls les animaux qui répondaient à tous ces critères, avec une IC/FEp prouvée phénotypiquement, ont été inclus pour l'étude au niveau cellulaire.

Suite à la mise au point du modèle expérimental, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'homéostasie calcique au niveau cellulaire. Sur des cardiomyocytes fraîchement isolés de cœurs de rats Sham et AAB, nous avons mesuré la contraction cellulaire et le transitoire calcique. Le cycle de Ca^{2+} chez les animaux AAB a été caractérisé par au moins quatre changements parallèles à des effets potentiellement opposés : (i) une fuite de Ca^{2+} impliquant les canaux récepteurs RyR2 du réticulum sarcoplasmique, (ii) une extrusion altérée de Ca^{2+} via l'échangeur NCX, (iii) une augmentation du rapport PLN/SERCA2a, et (iv) une augmentation du rapport pPLN/PLN pour compenser potentiellement le rapport PLN/SERCA2a plus élevé ; ceci afin d'améliorer la recapture du Ca^{2+} dans le RS. De plus, les fuites de Ca^{2+} à travers les canaux RyR2 (Fowler *et al.*, 2018) associées à une extrusion altérée de Ca^{2+} par NCX et à une augmentation du rapport PLN/SERCA, peuvent contribuer au retard de la décroissance du transitoire Ca^{2+} et augmenter le Ca^{2+} diastolique. L'altération de l'extrusion de Ca^{2+} dépendante du NCX pourrait être expliquée par une transition vers une activité en mode inverse (*Reverse mode* : entrée de Ca^{2+}) potentiellement expliquée par une augmentation de la concentration de Na^+ intracellulaire (Primessnig *et al.*, 2016). Cependant, une recapture accrue de Ca^{2+} , suggérée par l'augmentation du rapport pPLN / PLN, devrait contribuer à accélérer la décroissance du transitoire du Ca^{2+} et à augmenter la teneur du RS en Ca^{2+} . Pourtant nous n'avons pas de preuves directes de cela. Nos données peuvent donc être cohérentes avec l'idée que l'activité améliorée de SERCA2a est un mécanisme adaptatif visant à contrebalancer l'augmentation du rapport PLN/SERCA2a, l'altération de l'activité de NCX et la fuite de Ca^{2+} médiée par RyR2 et maintenir un cycle Ca^{2+} normal.

Résultats 2 : Etude de l'effet de la Ranolazine sur les cardiomyocytes isolés de cœurs de rats Sham et AAB

La compréhension des mécanismes physiopathologiques est une étape clé dans la progression de la prise en charge thérapeutique. La signalisation calcique que nous avons explorée dans le cadre de cette thèse, est probablement liée à la signalisation sodique. Les altérations des flux ioniques à travers le sarcolemme et le RS contribuent à l'altération de la contraction et de la relaxation dans l'IC. Il a été montré que l'accumulation de Na^+ compromet la relaxation chez des souris KO pour SERCA2a (Louch *et al.*, 2010). Des expériences *in vivo* ont suggéré que l'inhibition du courant I_{Na} persistant (ou soutenu) peut constituer une approche thérapeutique pour l'amélioration de la fonction diastolique (Rastogi *et al.*, 2008) et peut normaliser la concentration calcique dû à l'effet de l'échangeur NCX.

La Ranolazine, molécule utilisée récemment pour le traitement de l'ischémie et de l'angine, agit sur l'homéostasie ionique intracellulaire. Elle bloque en effet un certain nombre de courants ioniques, mais plus particulièrement, c'est un inhibiteur des courants sodiques persistants dont les conséquences ont permis d'expliquer les effets anti-angineux et anti-ischémiques observés (Antzelevitch *et al.*, 2004; Keating, 2008). Elle normalise l'entrée de Na^+ dans les cardiomyocytes, en favorisant la fermeture de canaux sodiques et évite ainsi une accumulation de Na^+ intracellulaire et la surcharge calcique diastolique qui l'accompagne ; surcharge responsable d'anomalies de la relaxation et de la tension diastolique et de risques accrus d'arythmies Ca^{2+} dépendantes.

Au vu de la littérature et en partant de nos résultats observés, l'évaluation des paramètres de contraction et du transitoire calcique en présence de la Ranolazine, constitue une étape importante qui permet de fournir des explications possibles pour les phénomènes de surcharge calcique.

1. Effets de la Ranolazine sur les paramètres de la contraction des cardiomyocytes de rats AAB :

Après avoir évalué les paramètres de la contraction au niveau cellulaire chez les rats AAB, les mesures ont été réalisées sur des cardiomyocytes fraîchement isolés à partir de VG de cœurs

de rats Sham et AAB préalablement incubés avec la Ranolazine (10^{-5} M). Au sein des deux groupes, nous avons évalué les paramètres de la contraction (Figure R1) :

- La longueur des sarcomères (*Sarcomere Length*)
- Le raccourcissement des sarcomères (*SL shortening*)
- Les vitesses de contraction et de relaxation (*SL velocity*)

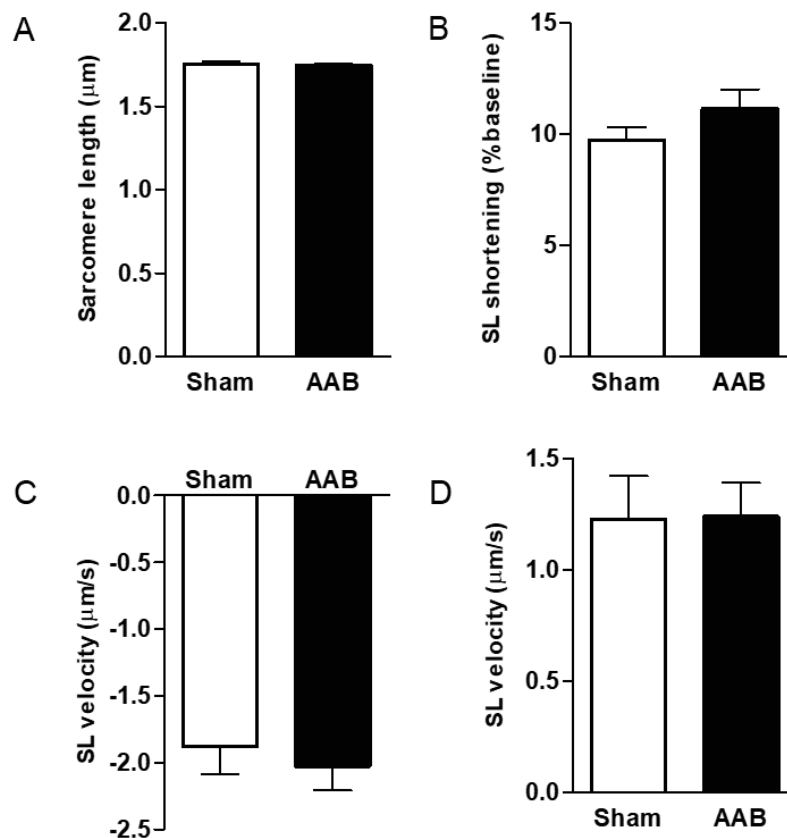


Figure R1 : Effet de la Ranolazine sur les paramètres de la contraction chez les rats Sham et AAB.

A: Longueur des sarcomères **B:** Raccourcissement des sarcomères **C:** Vitesse de contraction **D:** vitesse de relaxation ; Les données sont représentées sous la forme de moyennes \pm SEM. Sham N=7, n=22 ; AAB N=6, n=20. Le test de Student t-test a été utilisé pour comparer les deux groupes. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, AAB vs. Sham.

Aucune différence n'a été observée entre les groupes Sham et AAB concernant la longueur des sarcomères au repos (A). Le raccourcissement sarcomérique, indice de contraction, n'a pas changé entre les deux groupes (B). En ligne avec la stabilité de la contraction, les vitesses de contraction et de relaxation n'ont pas montré de différences entre les groupes (C et D). La Ranolazine ne semble pas exercer une action sur la contraction des cellules de cœurs AAB alors que celle-ci a été augmentée chez les rats AAB par rapport au groupe Sham dans les conditions normales.

2. Effets de la Ranolazine sur le transitoire calcique des cardiomyocytes de rats AAB :

Afin d'avoir une vision d'ensemble du CEC en présence de Ranolazine, le flux calcique a été mesuré et comparé entre les deux groupes. Les paramètres mesurés sont :

- Le niveau de Ca^{2+} diastolique
- La libération systolique de Ca^{2+} (par l'amplitude du transitoire calcique) reflétant l'activité du RyR2 (et en moindre mesure celle du LTCC)
- La recapture du Ca^{2+} (par analyse de la pente du transitoire) reflétant l'activité de SERCA2a (et dans une moindre mesure celle de NCX)

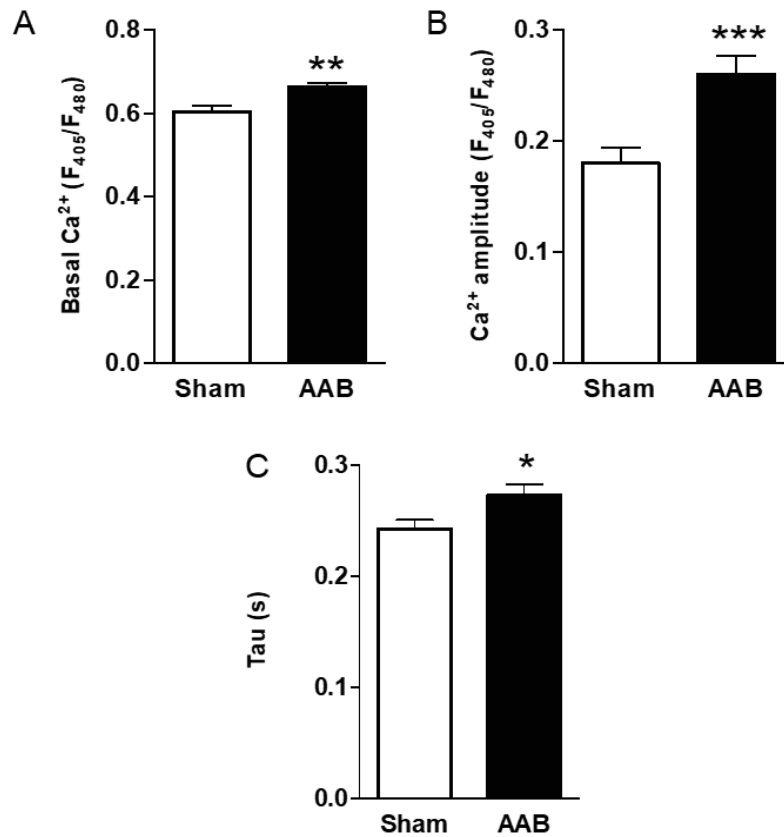


Figure R 2 : Effets de la Ranolazine sur le transitoire calcique chez les rats Sham et AAB.

A: Le niveau de Ca^{2+} diastolique **B:** Amplitude du transitoire calcique **C:** Temps de recapture du Ca^{2+} ; Les données sont représentées sous la forme de moyennes \pm SEM. Sham N=7, n=22 ; AAB N=6, n=20. Le test de Student t-test a été utilisé pour comparer les deux groupes. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, AAB vs. Sham.

De façon cohérente avec les résultats obtenus chez le modèle AAB et tel que constaté dans un contexte d'IC, le niveau de Ca^{2+} diastolique est augmenté chez les animaux insuffisants en comparaison aux animaux Sham, sans aucune normalisation apportée par la Ranolazine (A). À la différence du *SL shortening*, l'amplitude du transitoire calcique est fortement augmentée chez les AAB en comparaison aux sham due à l'effet de la surcharge calcique démontrée préalablement chez les animaux AAB (B). Le troisième paramètre du transitoire évalué lors de ces travaux est le temps de recapture du Ca^{2+} reflétant l'activité SERCA2a (et celle du NCX). La recapture du Ca^{2+} est altérée chez les rats AAB, résultat obtenu aussi chez les cellules de cœurs de rats AAB traitées

avec la Ranolazine (C). La Ranolazine ne semble pas alors améliorer la fonction de SERCA2a (et NCX), et normaliser les paramètres du transitoire calcique.

3. Effets de la Ranolazine sur la survenue d'évènements cellulaires anormaux par mesure d'évènements calciques durant la systole et la diastole :

Le paramètre évalué ci-dessous est celui qui reflète le mieux les altérations de l'homéostasie calcique, la survenue d'évènements calciques cellulaires anormaux pro-arythmogéniques.

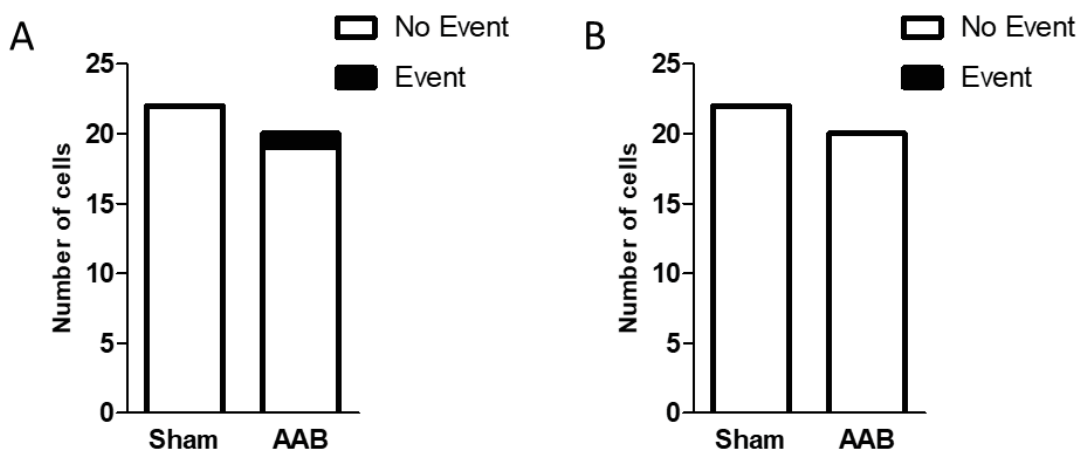


Figure R 3 : Effets de la Ranolazine sur la survenue des événements calciques cellulaires spontanés chez les rats Sham et AAB.

A: Événements calciques spontanés au cours de la diastole, en blanc : le nombre total de cellules enregistrées, en noir : le nombre de cellules avec au moins une arythmie survenue lors de la période de repos **B:** Événements calciques spontanés au cours de la systole, en blanc : le nombre total de cellules enregistrées, en noir : le nombre de cellules avec au moins une arythmie survenue lors de la période de stimulation ; Les données sont exprimées en nombre de cellules pour Sham N=7, n=22 ; AAB N=6, n=20. Le test de Fisher a été utilisé pour comparer les deux groupes. AAB vs Sham

Les animaux sham présentent un taux de survenue d'arythmies cellulaires diastoliques négligeable. Chez les rats AAB, les événements calciques spontanés se sont produits dans quelques cellules

représentant 5% du nombre total des cellules. De manière intéressante, ce résultat montre un effet anti-arythmogène de la Ranolazine, en effet, les événements calciques durant la phase de diastole se sont produits dans 46 % de cellules provenant de cœurs de rats AAB, résultat publié lors de nos travaux (« *Early calcium handling imbalance in pressure overload-induced heart failure with nearly normal left ventricular ejection fraction* », Rouhana et al., *BBA* 2018), dénotant les altérations de l'homéostasie calcique. Ce pourcentage est fortement diminué chez les cellules de cœurs de rats AAB mais traitées avec la Ranolazine. Durant la phase de stimulation, les cellules du groupe sham et AAB n'ont pas montré d'événements calciques irréguliers, alors que 16% des cellules de cœurs AAB avaient au moins une arythmie durant la systole lorsqu'elles n'étaient pas traitées avec la Ranolazine (résultat observé dans notre travail publié). Alors que les événements calciques spontanés pendant les périodes diastoliques peuvent résulter d'ouvertures anormales du récepteur RyR2, le traitement à la Ranolazine semble normaliser les événements calciques irréguliers mais non pas le transitoire calcique.

Discussion des résultats

L'observation la plus intéressante dans ces résultats, est l'absence d'événements calciques spontanés dans les cellules de cœurs d rats AAB, alors que ces derniers ont été fortement présents dans les cardiomyocytes non traités. Le mécanisme d'action de la Ranolazine repose sur sa capacité à bloquer un certain nombre de courants ioniques, mais plus spécifiquement, le courant persistant $I_{Na,p}$ qui est plus sensible que les autres courants ioniques à la Ranolazine (Keating, 2008). Dans les conditions normales, le courant sodique intervient dans la phase rapide de dépolarisation et s'inactive au cours du plateau du PA. Un courant I_{Na} persistant, est un courant qui ne s'inactive pas, et qui est souvent associé à différentes situations pathologiques (Hammarstrom and Gage, 2002; Tan *et al.*, 2003; Saint, 2008). Ainsi, ce courant a des conséquences fonctionnelles majeures : (i) un allongement de la durée du plateau du PA entretenant l'entrée de Ca^{2+} ; (ii) une augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ .

La Ranolazine a plusieurs effets, c'est un médicament anti-angineux et anti ischémique, mais pour distinguer entre la dose relative à ces effets et la dose plasmatique thérapeutique, l'intérêt se porte sur l'électrophysiologie (Chaitman, 2006; Saint, 2008). La Ranolazine inhibe un certain nombre d'autres courants ioniques, notamment l' I_{Kr} (12 μm), l' I_{Ca} tardif (50 μm), le pic I_{Ca} (296 μm), $I_{(Na-Ca)}$ (91 μm) et I_{Ks} (17% à 30 μm) (Antzelevitch *et al.*, 2004). Elle inhibe le I_{Na} persistant à une concentration de 5.9 μm

Le mécanisme impliqué dans l'effet anti-arythmique de la Ranolazine est probablement lié à sa capacité d'empêcher l'accumulation intracellulaire de Na^+ et de Ca^{2+} (Fraser *et al.*, 2006; Sossalla *et al.*, 2008). Elle tend à normaliser l'homéostasie sodico-calcique. En effet, le courant sodique persistant induit une augmentation anormale de Na^+ intracellulaire, et par suite une surcharge calcique. Une telle surcharge calcique en diastole contribue à une mauvaise relaxation du cardiomyocyte. Dans l'IC, l'association entre élévation du Na^+ intracellulaire, surcharge calcique diastolique et dysfonction contractile, est bien connue (Bers and Chen-Izu, 2015).

Ainsi, l'absence des événements calciques anormaux suite à l'incubation des cardiomyocytes avec la Ranolazine, autrement dit, l'inhibition du courant sodique persistant, suggère que la surcharge calcique diastolique observée dans les cellules de cœurs AAB est d'origine extracellulaire ; elle provient de l'augmentation de l'entrée de Na^+ . L'effet de l'inhibition a été observé durant la phase

de la systole et de la diastole. L'inhibition du courant sodique persistant, résistant à l'inactivation, a amélioré les propriétés pro-arythmogènes des cardiomyocytes, en limitant l'accumulation de Na^+ intracellulaire mais sans toutefois améliorer les paramètres du transitoire calcique (niveau de Ca^{2+} diastolique, amplitude du transitoire calcique, temps de recapture du Ca^{2+}). Ceci mérite plus d'investigations.

Malgré son action sur l'entrée sodique, il a été montré que la Ranolazine n'a pas d'effet inotrope négatif (Sossalla *et al.*, 2008). Ceci est cohérent avec nos résultats, aucune altération des paramètres de contraction n'a été observée.

Au niveau cellulaire, nos observations ont montré un effet bénéfique de la Ranolazine, une diminution probable de la surcharge calcique diastolique, responsable d'anormalités de la relaxation et de risques accrus d'arythmies Ca^{2+} -dépendantes. Pour concrétiser ces observations, l'étude électrophysiologique en présence de la Ranolazine s'avère importante. Il s'agit de mesurer et comparer les PA des cellules de cœurs AAB sans et avec la Ranolazine, pour valider le mécanisme d'action suggéré. Au niveau intégré, et puisque la Ranolazine devient de plus en plus une molécule soumise à plusieurs essais cliniques, il serait intéressant d'observer les effets de cette molécule sur les rats AAB : l'administration de la Ranolazine aux rats présentant une dysfonction diastolique, et le suivi de plus près (échocardiographie, télémétrie) permet d'identifier si elle présente un effet réversible et améliore la fonction cardiaque. Ceci constitue une piste importante dans l'orientation de la recherche du traitement efficace de l'IC/FEp.

Discussion générale et perspectives

Les études épidémiologiques postulent qu'une IC peut survenir en présence d'une FE normale, et que les patients ayant une FE conservée représentent jusqu'à la moitié de la population des patients en IC (McMurray *et al.*, 2012). Les traitements actuels qui s'appliquent à l'IC/FEr, semblent ne pas diminuer la morbidité et la mortalité des patients atteints d'IC/FEp ; ce qui suggère une physiopathologie sous-jacente différente de l'IC/FEr. Il s'avère ainsi important de développer des stratégies efficaces pour l'étude de l'IC/FEp, et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. (Bhatia *et al.*, 2006; Owan *et al.*, 2006).

Dans cette optique, l'objectif de ma thèse, était de mettre au point, dans un premier temps, un modèle reproduisant d'une façon fidèle l'IC/FEp, et le caractériser, pour dans un second temps, évaluer, à l'échelle cellulaire, la contraction et l'homéostasie calcique des cardiomyocytes.

- *L'IC/FEp versus l'IC/FEr*

Le dilemme de considérer l'IC/FEp comme une phase de transition du processus pathologique de l'IC/FEr et non pas une entité pathologique distincte en soi, reste encore non résolu (Borlaug and Redfield, 2011; De Keulenaer and Brutsaert, 2011). Le dysfonctionnement systolique du VG observé dans l'IC/FEp et le dysfonctionnement diastolique dans l'IC/FEr (Fukuta and Little, 2007; Wang *et al.*, 2008; Borlaug *et al.*, 2009; tan *et al.*, 2009) ainsi que la progression vers le remodelage excentrique du VG et l'IC/FEr dans la cardiopathie hypertensive (Drazner, 2005), laissent suggérer que l'IC/FEr et l'IC/FEp sont des syndromes chevauchants ou des stades du même processus pathologique. Cependant, la présence d'une distribution bimodale de la FE chez les patients de l'IC (Borlaug and Redfield, 2011) ainsi que l'évolution rare de la FE préservée à une FE réduite dans les cardiopathies hypertensives (qui est attribuable en grande partie à un infarctus du myocarde chez ces patients) (Rame *et al.*, 2004), fournissent un argument solide en faveur de la distinction entre les deux pathologies.

L'ESC reconnaît actuellement l'IC/FEp comme étant un syndrome d'IC important. En effet, (i) l'IC/FEp intègre près de la moitié de la population de l'IC (Lam *et al.*, 2011) ; (ii) des changements hémodynamiques classiques de l'IC sont présents dans l'IC/FEp (élévation des pressions ventriculaires de remplissage et altération de la relaxation) (Kubo *et al.*, 1991; Zile *et al.*, 2004; Borlaug *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2009) ; (iii) l'activation neuro-hormonale qui caractérise l'IC

(rénine-angiotensine-aldostérone, système nerveux sympathique) se produit également dans l'IC/FEp (Kitzman *et al.*, 2002; Guder *et al.*, 2007).

Donc, malgré les anomalies systoliques et diastoliques présentes dans les deux sous types de l'IC, il existe des différences fondamentales dans le profil du remodelage du VG entre ces deux sous-types. La dilatation de la chambre ventriculaire gauche (remodelage excentrique) est une caractéristique spécifique de l'IC/FEr, tandis que chez l'IC/FEp, la taille de la chambre est normale ou presque normale avec une épaisseur accrue de la paroi postérieure (remodelage concentrique) (van Heerebeek *et al.*, 2006; Borlaug *et al.*, 2010). Les variations de l'IC/FEr par rapport à l'IC/FEp sont également associées à des conséquences fonctionnelles distinctes impliquant en particulier la relation pression-volume en fin de systole et en fin de diastole (Kawaguchi *et al.*, 2003; Schwartzberg *et al.*, 2012). Les différences entre l'IC/FEp et l'IC/FEr s'étendent aux niveaux tissulaire et cellulaire : les cardiomyocytes sont étroits et allongés dans l'IC/FEr, avec une densité myofibrillaire réduite, alors que le diamètre des myocytes et la tension au repos sont tous deux augmentés dans l'IC/FEp. Au niveau moléculaire, il y a une augmentation de l'expression de l'isoforme la plus rigide de la titine dans l'IC/FEp par rapport à l'IC/FEr, et une activation accrue des métalloprotéines et l'inhibition de leur inhibiteurs favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire (Borbely *et al.*, 2005; van Heerebeek *et al.*, 2006; van Heerebeek *et al.*, 2008; van Heerebeek *et al.*, 2012).

L'étude des mécanismes extrinsèques et intrinsèques, en particulier les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la dysfonction diastolique, constituent une étape primordiale pour une meilleure prise en charge des patients en IC/FEp.

Peu de modèles animaux d'IC/FEp, manifestant les caractéristiques de cette pathologie humaine ont été proposés (Conceicao *et al.*, 2016). De plus, l'absence d'études systématiques des différents modèles de dysfonction diastolique, limite les connaissances, en particulier, concernant les signatures moléculaires et les altérations fonctionnelles subcellulaires aux stades très précoces de la pathologie.

Dans la présente thèse, le premier objectif était d'isoler expérimentalement un modèle de dysfonctionnement diastolique chez le rat adulte sur lequel, on pourra évaluer, ultérieurement, les

composantes cellulaires et moléculaires, notamment, l'homéostasie calcique et ses acteurs protéiques.

- ***Le modèle expérimental***

Puisque plusieurs études cliniques et expérimentales ont montré qu'il existe une association fréquente entre l'hypertrophie du VG et le dysfonctionnement diastolique global (entre autres l'IC/FEp) (Heinzel et al.). Nous sommes alors partis de cette constatation pour choisir un modèle se basant sur l'induction de l'hypertrophie par surcharge de pression puisque l'hypertrophie du VG et le dysfonctionnement diastolique sont des complications courantes de l'hypertension (Klapholz *et al.*, 2004; Oktay and Shah, 2014; UI Haq *et al.*, 2015; Conceicao *et al.*, 2016; Messerli *et al.*, 2017).

La surcharge de pression a été créée par la constriction de l'aorte abdominale. Pour savoir si cette constriction reproduit les caractéristiques cardiaques fonctionnelles et structurales précoces compatibles avec les caractéristiques de l'IC/FEp, nous avons mesuré par échocardiographie plusieurs paramètres de la fonction systolique et diastolique à différents intervalles de temps après la chirurgie.

Quatre semaines après la constriction, malgré des changements modérés dans la FE (qui n'a pas constitué le paramètre exclusif pour la validation de l'IC/FEp), les cœurs présentaient un indice de performance cardiaque réduit (reflété par l'indice MPI augmenté) et un dysfonctionnement diastolique : en effet, les cœurs de rats ayant subi la constriction aortique avaient une pression de remplissage du VG plus élevée (estimée par le rapport E/e'), un temps de relaxation isovolumique prolongé et une réduction de la vitesse de l'anneau mitral précoce avec une augmentation de la rigidité active. Les rats AAB présentaient également des marqueurs structuraux de dysfonction diastolique, tels que le remodelage concentrique du VG et l'hypertrophie, l'augmentation du diamètre de l'OG et l'œdème pulmonaire (Massie *et al.*, 2008; Houser *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2014). De plus, nous avons noté une augmentation de l'épaisseur de la paroi postérieure (RWT), une augmentation du diamètre de l'OG (*LA diameter*) et une augmentation de la masse des poumons, en faveur d'un œdème pulmonaire. Ces résultats, sont en accord avec une publication récente qui rapporte des indices pour un modèle d'IC/FEp fiable sur lequel des études ultérieures peuvent être menées (Valero-Muñoz *et al.*, 2017). En récapitulant ces données, notre modèle a pu

reproduire, à un moment donné, des signes cliniques robustes de l'IC/FEp tels que : la pression artérielle élevée, la congestion pulmonaire, l'hypertrophie concentrique, l'augmentation de la masse du VG, l'altération de la relaxation active, l'altération du remplissage, l'élargissement de l'oreillette gauche et l'hypertrophie des cardiomyocytes. De plus, l'hétérogénéité de la fibrose interstitielle observée dans les cœurs des rats AAB était semblable, avec divers degrés, à celle observée chez les patients d'IC/FEp (Borbely *et al.*, 2005; van Heerebeek *et al.*, 2006; van Heerebeek *et al.*, 2008; Mohammed *et al.*, 2015). La fibrose pourrait se développer plus tard (Roe *et al.*, 2017), ce qui suggère aussi que la dysfonction diastolique précède la fibrose.

L'une des limites de ce modèle, ainsi que d'autres modèles hypertensifs tels que le « *Dahl-Salt sensitive rat* » ou le « *deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt-induced rat model* » (DOCA), est la transition vers l'IC/FEr. Mais certaines études ont montré que même chez les patients avec une IC/FEp, la FE ne se maintient pas à plus de 50% après 5 ans de diagnostic suggérant que des changements dans la fonction systolique se produisent pendant la progression de l'IC/FEp (Dunlay *et al.*, 2012). Ces résultats, pris ensemble, soutiennent ce modèle animal comme une méthode robuste pour étudier davantage la dysfonction diastolique.

- *Le couplage excitation-contraction*

Les cellules cardiaques sont l'effecteur principal du cycle de contraction/relaxation impliqué dans la fonction cardiaque et sont par suite influencées par l'altération du cycle. Le remodelage cardiaque de l'IC/FEr est dû principalement à la mort des cardiomyocytes (van Heerebeek *et al.*, 2008). Une évidence majeure, qui ressort de notre étude, est que les cardiomyocytes isolés du VG des cœurs de rats AAB ont un phénotype fonctionnel nettement différent de celui des Sham et de celui observé dans l'IC/FEr ; en particulier en ce qui concerne le couplage excitation-contraction.

Le potentiel d'action des cardiomyocytes des rats AAB n'est pas modifié ; ce qui le différencie nettement de celui observé dans l'hypertrophie compensée et/ou dans les cœurs humains, canins et ceux des rats en phase terminale d'IC qui est souvent largement prolongé du fait de la diminution drastique de courants potassiques repolarisants I_K , en particulier I_{to} (Beuckelmann *et al.*, 1992; Richard *et al.*, 1998; Aimond *et al.*, 1999; Coronel *et al.*, 2013). L'inotropisme positif des cardiomyocytes contrastait fortement avec la contraction réprimée de l'IC/FEr ; ceci est dû principalement à une diminution du transitoire calcique résultant probablement d'une plus faible

charge calcique du RS liée à une activité réduite de SERCA2 et d'une fuite de Ca^{2+} du RS à travers les canaux RyR2 (Lindner *et al.*, 2002; Coronel *et al.*, 2013; Luo and Anderson, 2013). Malgré cette divergence, certains défauts du cycle calcique observés dans l'IC/FEr ont pu être identifiés dans notre étude, tels que la décroissance retardée du transitoire Ca^{2+} , le Ca^{2+} diastolique augmenté, les événements calciques irréguliers pendant la stimulation et les ondes calciques diastoliques spontanées aberrantes. En effet, Les cardiomyocytes isolés du VG des cœurs de rats AAB, hypertrophiques et rigides, montrent des contractions plus fortes et plus rapides avec une relaxation retardée. Cet inotropisme cellulaire positif a été caractérisé principalement par une augmentation de l'amplitude du transitoire calcique plutôt que par une sensibilité amplifiée des protéines contractiles au Ca^{2+} . Au niveau cellulaire, l'hypertrophie et la rigidité des cardiomyocytes du VG des rats AAB observées dans nos résultats, sont compatibles avec divers autres travaux sur l'IC/FEr chez l'homme et les rats (van Heerebeek *et al.*, 2006; van Heerebeek *et al.*, 2008; Hamdani *et al.*, 2013; Roe *et al.*, 2017). Elles expliquent en partie l'augmentation de la rigidité de la paroi postérieure du VG et l'altération de la relaxation du cœur. La force développée par les cardiomyocytes dépend à la fois de la quantité de Ca^{2+} libérée par le RS après excitation et de la sensibilité de la machinerie contractile au Ca^{2+} . L'extrusion retardée de Ca^{2+} du cytosol due à une activité altérée de l'échangeur NCX peut également contribuer à ces résultats. Une amélioration du cycle calcique entre le RS et le cytosol se produit même avant le développement de l'hypertrophie, c'est-à-dire durant les tous premiers jours après la constriction (Carvalho *et al.*, 2006). Ici, cet effet inotrope positif adaptatif est survenu en l'absence de prolongation du plateau du PA et sans augmentation de la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+} . On ne sait pas pourquoi la contraction augmentée des cellules n'a pas augmenté la fonction cardiaque globale, en d'autres termes, ou encore la FE. Les possibilités peuvent être dues à une perte de cardiomyocytes, bien que ce soit principalement une caractéristique de l'IC/FEr, ou plus probablement dues à une variété de facteurs extrinsèques et à des comorbidités (obésité, hypertension artérielle, diabète), comme récemment examiné, qui sont accompagnés par une altération de la fonction et de la structure myocardiques (Paulus *et al.*, 2007).

- *Les mouvements de calcium*

Quatre semaines après la chirurgie, le cycle du Ca^{2+} était caractérisé par au moins quatre changements survenus parallèlement à des effets potentiellement opposés : (i) une fuite de Ca^{2+} à

travers les canaux RyR2 ; (ii) une extrusion de Ca^{2+} altérée à travers NCX ; (iii) une augmentation du rapport PLN/SERCA et (iv) une augmentation du rapport pPLN/PLN, qui pourrait compenser le ratio PLN/SERCA élevé pour assurer la recapture de Ca^{2+} au niveau du RS par SERCA2a. À noter que l'expression de la protéine SERCA2a n'a pas changé. Dans les conditions physiologiques normales, l'élimination du Ca^{2+} cytosolique par la pompe SERCA2a domine celle assurée par NCX. Comme le déclin du transitoire de Ca^{2+} provoqué par la caféine est un indice de l'activité de NCX, nos résultats sont compatibles avec une extrusion altérée de Ca^{2+} des cellules par NCX (Venetucci *et al.*, 2007; Eisner *et al.*, 2017) sans toutefois un changement dans l'expression protéique de NCX. De plus, un temps de décroissance plus lent du transitoire de Ca^{2+} induit par la caféine peut refléter des modifications du gradient de Na^+ (Willis *et al.*, 2016) dues à une concentration intracellulaire élevée de Na^+ . L'altération de l'extrusion de Ca^{2+} dépendante du NCX a été expliquée par une tendance à l'inversion du mode d'action de NCX vers un mode « *reverse* » (influx de Ca^{2+}), mais cela a été exclu dans une étude récente réalisée chez des patients atteints de cardiopathie hypertensive et d'IC/FEp (Primessnig *et al.*, 2016; Runte *et al.*, 2017). Les canaux RyR2 anormalement perméables (à l'origine de Ca^{2+} sparks), associés à la fois à l'extrusion altérée de Ca^{2+} par le NCX et à l'augmentation du ratio PLN/SERCA2a, pourraient contribuer au retard de la décroissance du transitoire Ca^{2+} et augmenter le Ca^{2+} diastolique.

Le PLN joue un rôle primordial dans la régulation de l'activité de SERCA2a et constitue donc un déterminant majeur de la contractilité et de la relaxation cardiaques. Le PLN déphosphorylé inhibe l'activité de SERCA2a, tandis que la phosphorylation de PLN au niveau de Ser16 par PKA ou au niveau de Thr17 par CaMKII relève cette inhibition (Mattiuzzi and Kranias, 2014). Le rapport PLN/SERCA2a dans les cardiomyocytes de cœurs de rats AAB a augmenté, ce qui devrait inhiber l'activité de SERCA2a et par suite la recapture du Ca^{2+} par le RS (Chu and Kranias, 2002; Brittsan *et al.*, 2003). D'une manière remarquable, nous avons détecté un rapport pPLN/PLN accru dans les cœurs de rats AAB, indiquant que le PLN était phosphorylé au site spécifique de CaMKII (PLN-Thr17). L'activation de ce site spécifique à CaMKII (PLN-Thr17) a des effets complexes. Elle a été étroitement associée à une augmentation de l'effet relaxant d'une réponse β -adrénergique (Mattiuzzi *et al.*, 2005) mais aussi à une réaction β -adrénergique réduite dans un modèle félin d'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression chronique (Mills *et al.*, 2006). Cependant, la phosphorylation médiée par la PKA (PLN-Ser16) répond à la fois à l'exercice, à des situations de stress ou de « *fight and flight* » (Hagemann and Xiao, 2002). Cela pourrait refléter un

rôle adaptatif du PLN et de sa forme phosphorylée pour compenser l'activité altérée de NCX et la fuite de Ca^{2+} du RS médiée par RyR2 dans une tentative de maintenir le cycle normal de Ca^{2+} dans différentes exigences physiologiques. Les implications exactes de l'état phosphorylé accru de PLN dans notre modèle méritent d'autres explorations.

- *Les sparks*

Si la cellule et le RS sont surchargés en Ca^{2+} , des transitoires calciques anormaux et des événements calciques spontanés devraient apparaître (Venetucci *et al.*, 2007). Une forte présence de Ca^{2+} sparks et une surcharge cytosolique en Ca^{2+} , signature précoce inattendue dans notre modèle, est probablement une conséquence et non pas une cause de la dysfonction diastolique comme observé chez un modèle de rat d'insuffisance rénale chronique avec IC/FEp (Primessnig *et al.*, 2016). Des modifications post-traductionnelles de RyR2, telles que la nitrosylation et la phosphorylation dépendante de CaMKII, peuvent entraîner une fuite de Ca^{2+} du RS (Marx *et al.*, 2000; Marks, 2013) mais elles n'ont pas été détectées dans notre étude. Une augmentation du Ca^{2+} cytosolique, en plus du maintien du Ca^{2+} luminal, devraient augmenter la probabilité d'événements calciques spontanés. De manière importante, la fuite de Ca^{2+} identifiée ici peut non seulement fournir un état pro-arythmogène mais pourrait également être impliqué dans la progression de l'IC/FEp. Les effets bénéfiques d'une recapture accrue de Ca^{2+} par le RS suite à la phosphorylation de PLN peuvent être perdus lorsqu'ils sont associés à une fuite de Ca^{2+} (Mattiuzzi and Kranias, 2014). De plus, les facteurs de signalisation sensibles au Ca^{2+} impliqués dans l'hypertrophie cardiaque répondent à des changements soutenus de la concentration diastolique de Ca^{2+} .

L'étude actuelle présente un certain nombre de limites.

- La réplique de l'IC/FEp humaine dans des modèles animaux, sujet qui a été discuté dans la partie « Discussion de la publication ».
- L'activation neurohormonale : Elle est généralement considérée comme une caractéristique de l'IC systolique, mais peut également être impliquée dans l'IC/FEp (Guder, Kitzman). Il existe une littérature abondante établissant que le système rénine – angiotensine – aldostérone (SRAA) joue un rôle dans l'induction d'une hypertrophie pendant une surcharge de pression. L'hypertrophie et l'hypertension contribuent toutes les deux à altérer la relaxation et la fonction diastolique, et des modèles de bandages aortiques

ont été proposés pour étudier le dysfonctionnement diastolique (Conceicao *et al.*, 2016). Une diminution de la pression artérielle distale par rapport à la constriction stimule la sécrétion de rénine de manière transitoire, 3 jours après la constriction (Baker *et al.*, 1990), mais après cette durée, le taux de rénine n'a pas été différent de celui mesuré chez les contrôles. L'inhibition du récepteur de l'angiotensine n'inverse pas les effets de la constriction, toutefois, le retrait des bandes réduit l'hypertrophie suggérant que l'angiotensine pourrait ne pas jouer un rôle majeur dans l'hypertrophie induite par la surcharge de pression ou dans le maintien de cette hypertrophie (Mohabir *et al.*, 1994). L'activation neurohormonale ainsi que l'implication de la constriction dans la progression de la pathologie n'ont pas été étudiées.

On sait maintenant que la prévalence de l'IC/FEp augmente de 1% par an (Owan *et al.*, 2006). Malheureusement, bien que des progrès considérables aient été accomplis dans l'amélioration de la mortalité de l'IC/FEr, aucun traitement pharmacologique, y compris l'armement de différents antagonistes neurohormonaux, n'a démontré les mêmes avantages dans l'IC/FEp. En essayant de trouver la cause de ce manque de traitements efficaces, plusieurs hypothèses sont proposées, mais celle de l'hétérogénéité est l'essentielle (Roh *et al.*, 2017). En effet, il s'agit d'une pathologie complexe, multifactorielle, qui n'est pas due uniquement au dysfonctionnement diastolique, mais à un ensemble complexe d'altérations multi-organes (**Figure D2**).

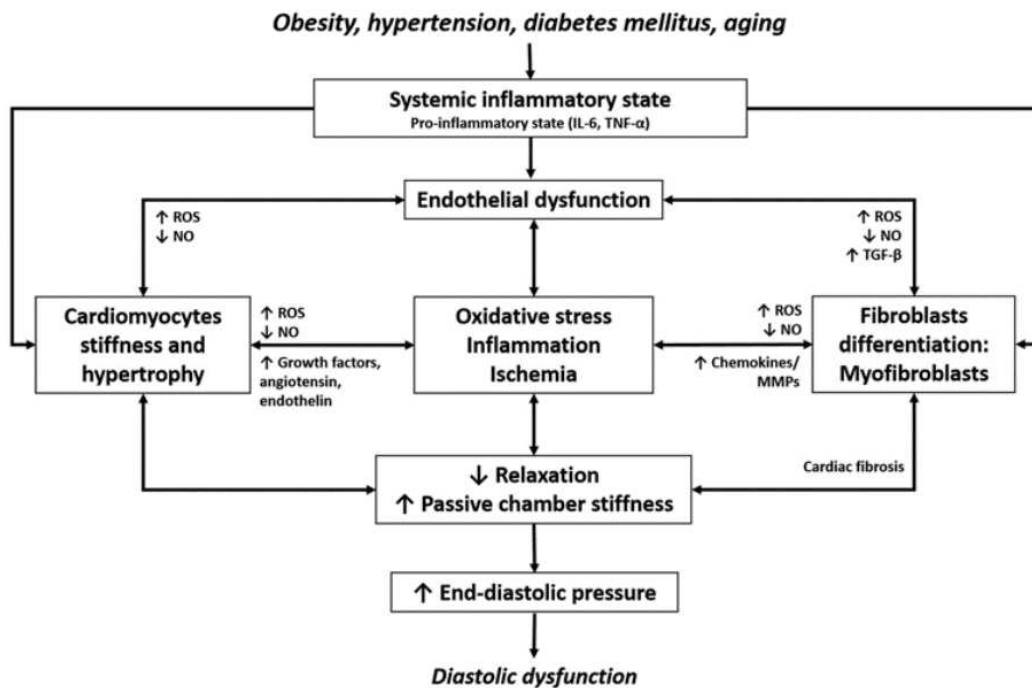


Figure D 2 : Représentation schématique de la physiopathologie de l'IC/FEp.

Les comorbidités sont associées à des changements systémiques et à un dysfonctionnement moléculaire du myocarde se traduisant par des changements structurels contribuant à la physiopathologie de l'IC/FEp (Conceicao et al., 2016).

Celles-ci impliquent les réserves cardiaques, la fonction vasculaire systémique et pulmonaire, la fonction rénale, la capacité de transport d'oxygène et d'autres (Borlaug, 2014) qui peuvent varier considérablement d'un patient à l'autre ; ce qui soulève l'autre problème majeur de l'hétérogénéité de l'IC/FEp. Cependant, le concept d'hétérogénéité n'a pas été rapporté dans l'investigation préclinique parce que le large éventail de découvertes identifiées chez les patients d'IC/FEp n'a pas été exploré dans des modèles animaux, qui se sont principalement concentrés sur la fonction diastolique (Horgan *et al.*, 2014; Conceicao *et al.*, 2016). Cela constitue un obstacle qui entrave non seulement notre capacité à identifier les mécanismes moléculaires clés, mais aussi pour développer des thérapies indispensables pour l'IC/FEp. Pour obtenir le même succès thérapeutique de l'IC/FEp avec l'IC/FEp, il faut un modèle qui capture une caractéristique essentielle de la maladie, celle de la multiplicité des facteurs. Dans l'IC/FEp, la ligature des artères coronaires, technique pertinente, permet d'altérer la fonction systolique et d'induire les pathologies systémiques (Pfeffer *et al.*, 1979). En revanche, il reste à déterminer si un seul défaut cardiaque ou

systémique peut reproduire les nombreux phénotypes systémiques observés dans l'IC/FEp. Ainsi, l'identification de modèles capturant le large spectre de phénotypes observés chez des patients de l'IC/FEp constitue le meilleur espoir pour l'investigation et la validation des mécanismes physiopathologiques et, par suite, la recherche du traitement cible. Les modèles animaux qui récapitulent deux phénotypes de l'IC/FEp ou plus (par exemple, un dysfonctionnement diastolique et une capacité d'exercice réduite) seraient plus fidèles et plus susceptibles de fournir des informations utiles sur le plan clinique (Roh *et al.*, 2017). En outre, lors du test de nouvelles thérapies, ces modèles animaux permettraient également une lecture phénotypique multidimensionnelle de l'efficacité thérapeutique ; ce qui pourrait aider à identifier les sous-groupes de patients les plus susceptibles de bénéficier d'une intervention spécifique (Roh *et al.*, 2017).

Sur le plan thérapeutique, la Ranolazine a montré des effets bénéfiques sur la réduction de la dysfonction diastolique : L'effet de la Ranolazine sur la fonction diastolique a été examiné chez des rats spontanément hypertendus (SHR : « *spontaneously hypertensive rats* »), qui présentent une relaxation ventriculaire gauche altérée et une rigidité accrue. La Ranolazine s'est avérée efficace pour réduire le dysfonctionnement diastolique chez les SHR. Son mécanisme d'action, au moins en partie, est compatible avec l'inhibition du courant sodique persistant dans les SHR, entraînant une réduction de la surcharge en Ca^{2+} (Williams *et al.*, 2014). Elle a empêché la progression de la cardiomyopathie dans un modèle de dysfonction diastolique induite par la doxorubicine (Cappetta *et al.*, 2017) et supprimé les propriétés arythmiques chez des chiens souffrant d'IC (Fukaya *et al.*, 2018). La Ranolazine a amélioré la dysfonction diastolique dans des cardiomyocytes isolés de cœurs humains insuffisants, sans avoir des effets inotropes négatifs ; de plus, dans les myocytes de lapin, les concentrations élevées intracellulaires de Na^+ et de Ca^{2+} ainsi que l'augmentation du courant sodique tardif induites par *Anemonia sulcata toxin II* (ATX-II) ont été considérablement atténuées par la Ranolazine. Ces résultats suggèrent que la Ranolazine pourrait être bénéfique sur le plan thérapeutique dans les cas de dysfonctionnement diastolique dû à une élévation de Na^+ et de Ca^{2+} (Sossalla *et al.*, 2008). Ces observations, associées à nos résultats encourageants, nous conduisent à investiguer de plus près les effets de la Ranolazine dans notre modèle expérimental. Il serait intéressant par la suite d'administrer la Ranolazine par voie orale et de suivre la fonction systolique diastolique par échocardiographie et l'activité électrique par

télémetrie dans les conditions basales et suite à l'entraînement pour tester la capacité à l'exercice et avoir ainsi capturé plusieurs phénotypes associés à l'IC/FEp.

Conclusion et perspectives générales

Dans ce présent travail, nous avons souligné la relation entre les modifications systoliques précoces et diastoliques suite à l'altération de l'homéostasie calcique. Ainsi, nous avons pu identifier différents schémas d'adaptations de l'homéostasie calcique qui pourraient être bénéfiques ou néfastes, et contribuer à la progression de la pathologie. Notre modèle expérimental offre une approche intéressante pour étudier les dysfonctionnements cellulaires et moléculaires, difficilement accessibles chez l'homme, et présente une piste potentielle pour l'orientation des essais thérapeutiques. Tous ces aspects méritent d'être approfondis afin d'identifier les protéines cibles les plus pertinentes. Pour cela, les perspectives du présent travail peuvent être repartis sur plusieurs axes :

- 1- Chercher le diagnostic de la maladie à un stade précoce par la recherche des marqueurs biologiques spécifiques à cette pathologie.
- 2- Tester l'effet de la Ranolazine, administrée par voie orale, sur la progression de l'IC/FEp.

Références bibliographiques

- Adachi, T., Weisbrod, R.M., Pimentel, D.R., Ying, J., Sharov, V.S., Schoneich, C., Cohen, R.A., 2004. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 10, 1200-1207.
- Ahern, G.P., Junankar, P.R., Dulhunty, A.F., 1994. Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett* 352(3), 369-374.
- Ahmed, S.H., Clark, L.L., Pennington, W.R., Webb, C.S., Bonnema, D.D., Leonardi, A.H., McClure, C.D., Spinale, F.G., Zile, M.R., 2006. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* 113(17), 2089-2096.
- Aimond, F., Alvarez, J.L., Rauzier, J.M., Lorente, P., Vassort, G., 1999. Ionic basis of ventricular arrhythmias in remodeled rat heart during long-term myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 42, 402-415.
- Amin, A.S., Asghari-Roodsari, A., Tan, H.L., 2010. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* 460, 223-237.
- Antzelevitch, C., Belardinelli, L., Zygmunt, A.C., Burashnikov, A., Di Diego, J.M., Fish, J.M., Cordeiro, J.M., Thomas, G., 2004. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 110, 904-910.
- Appleton, C.P., Hatle, L.K., Popp, R.L., 1988. Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 12, 426-440.
- Aronson, D., 2003. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens* 21, 3-12.
- Asp, M.L., Martindale, J.J., Heinis, F.I., Wang, W., Metzger, J.M., 2013. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochim Biophys Acta* 1833, 895-900.
- Ather, S., Chan, W., Bozkurt, B., Aguilar, D., Ramasubbu, K., Zachariah, A.A., Wehrens, X.H., Deswal, A., 2012. Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 59, 998-1005.
- Aurigemma, G.P., Zile, M.R., Gaasch, W.H., 2006. Contractile behavior of the left ventricle in diastolic heart failure: with emphasis on regional systolic function. *Circulation* 113, 296-304.
- Baker, K.M., Chernin, M.I., Wixson, S.K., Aceto, J.F., 1990. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 259, H324-332.
- Balshaw, D.M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D.A., Meissner, G., 2001. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 276, 20144-20153.
- Baudino, T.A., Carver, W., Giles, W., Borg, T.K., 2006. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1015-1026.

Beckett, N.S., Peters, R., Fletcher, A.E., Staessen, J.A., Liu, L., Dumitrascu, D., Stoyanovsky, V., Antikainen, R.L., Nikitin, Y., Anderson, C., Belhani, A., Forette, F., Rajkumar, C., Thijs, L., Banya, W., Bulpitt, C.J., Group, H.S., 2008. Treatment of hypertension in patients 80 years of age or older. *N Engl J Med* 358, 1887-1898.

Bergstrom, A., Andersson, B., Edner, M., Nylander, E., Persson, H., Dahlstrom, U., 2004. Effect of carvedilol on diastolic function in patients with diastolic heart failure and preserved systolic function. Results of the Swedish Doppler-echocardiographic study (SWEDIC). *Eur J Heart Fail* 6, 453-461.

Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.

Bers, D.M., Chen-Izu, Y., 2015. Sodium and calcium regulation in cardiac myocytes: from molecules to heart failure and arrhythmia. *J Physiol* 593, 1327-1329.

Bers, D.M., Despa, S., Bossuyt, J., 2006. Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1080, 165-177.

Beuckelmann, D.J., Nabauer, M., Erdmann, E., 1992. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046-1055.

Bhatia, R.S., Tu, J.V., Lee, D.S., Austin, P.C., Fang, J., Haouzi, A., Gong, Y., Liu, P.P., 2006. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med* 355, 260-269.

Blaustein, M.P., Lederer, W.J., 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79, 763-854.

Borbely, A., van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G., Edes, I., Stienen, G.J., Paulus, W.J., 2005. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111, 774-781.

Borlaug, B.A., 2014. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* 11, 507-515.

Borlaug, B.A., Lam, C.S., Roger, V.L., Rodeheffer, R.J., Redfield, M.M., 2009. Contractility and ventricular systolic stiffening in hypertensive heart disease insights into the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 54(5), 410-418.

Borlaug, B.A., Melenovsky, V., Russell, S.D., Kessler, K., Pacak, K., Becker, L.C., Kass, D.A., 2006. Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* 114, 2138-2147.

Borlaug, B.A., Olson, T.P., Lam, C.S., Flood, K.S., Lerman, A., Johnson, B.D., Redfield, M.M., 2010. Global cardiovascular reserve dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 56, 845-854.

Borlaug, B.A., Paulus, W.J., 2011. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J* 32, 670-679.

Borlaug, B.A., Redfield, M.M., 2011. Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation* 123(18), 2006-2013.

Braunwald, E., 2013. Heart failure. *JACC Heart Fail* 1, 1-20.

- Bridge, J.H., Smolley, J.R., Spitzer, K.W., 1990. The relationship between charge movements associated with ICa and INa-Ca in cardiac myocytes. *Science* 248(4953), 376-378.
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., Marks, A.R., 1994. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77, 513-523.
- Brittsan, A.G., Ginsburg, K.S., Chu, G., Yatani, A., Wolska, B.M., Schmidt, A.G., Asahi, M., MacLennan, D.H., Bers, D.M., Kranias, E.G., 2003. Chronic SR Ca²⁺-ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca²⁺ transport. *Circ Res* 92, 769-776.
- Bronzwaer, J.G., Paulus, W.J., 2005. Matrix, cytoskeleton, or myofilaments: which one to blame for diastolic left ventricular dysfunction? *Prog Cardiovasc Dis* 47(7), 276-284.
- Butler, J., Fonarow, G.C., Zile, M.R., Lam, C.S., Roessig, L., Schelbert, E.B., Shah, S.J., Ahmed, A., Bonow, R.O., Cleland, J.G., Cody, R.J., Chioncel, O., Collins, S.P., Dunnmon, P., Filippatos, G., Lefkowitz, M.P., Marti, C.N., McMurray, J.J., Misselwitz, F., Nodari, S., O'Connor, C., Pfeffer, M.A., Pieske, B., Pitt, B., Rosano, G., Sabbah, H.N., Senni, M., Solomon, S.D., Stockbridge, N., Teerlink, J.R., Georgiopoulou, V.V., Gheorghide, M., 2014. Developing therapies for heart failure with preserved ejection fraction: current state and future directions. *JACC Heart Fail* 2, 97-112.
- Cain, B.S., Meldrum, D.R., Joo, K.S., Wang, J.F., Meng, X., Cleveland, J.C., Jr., Banerjee, A., Harken, A.H., 1998. Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 32, 458-467.
- Camelliti, P., Borg, T.K., Kohl, P., 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65(1), 40-51.
- Cappetta, D., Esposito, G., Coppini, R., Piegari, E., Russo, R., Ciuffreda, L.P., Rivellino, A., Santini, L., Rafaniello, C., Scavone, C., Rossi, F., Berrino, L., Urbanek, K., De Angelis, A., 2017. Effects of ranolazine in a model of doxorubicin-induced left ventricle diastolic dysfunction. *Br J Pharmacol* 174, 3696-3712.
- Carbone, E., Lux, H.D., 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501-502.
- Carvalho, B.M., Bassani, R.A., Franchini, K.G., Bassani, J.W., 2006. Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1803-1813.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.
- Chaitman, B.R., 2006. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation* 113, 2462-2472.
- Chen, X., Piacentino, V., 3rd, Furukawa, S., Goldman, B., Margulies, K.B., Houser, S.R., 2002. L-type Ca²⁺ channel density and regulation are altered in failing human ventricular myocytes and recover after support with mechanical assist devices. *Circ Res* 91, 517-524.
- Chu, G., Kranias, E.G., 2002. Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models. *Basic Res Cardiol* 97 suppl 1, 143-148.

- Cleland, J.G., Tendera, M., Adamus, J., Freemantle, N., Polonski, L., Taylor, J., Investigators, P.-C., 2006. The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur Heart J* 27, 2338-2345.
- Conceicao, G., Heinonen, I., Lourenco, A.P., Duncker, D.J., Falcao-Pires, I., 2016. Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24, 275-286.
- Conraads, V.M., Metra, M., Kamp, O., De Keulenaer, G.W., Pieske, B., Zamorano, J., Vardas, P.E., Bohm, M., Dei Cas, L., 2012. Effects of the long-term administration of nebivolol on the clinical symptoms, exercise capacity, and left ventricular function of patients with diastolic dysfunction: results of the ELANDD study. *Eur J Heart Fail* 14, 219-225.
- Coronel, R., Wilders, R., Verkerk, A.O., Wiegerinck, R.F., Benoist, D., Bernus, O., 2013. Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1832(12), 2432-2441.
- Cutler, M.J., Wan, X., Plummer, B.N., Liu, H., Deschenes, I., Laurita, K.R., Hajjar, R.J., Rosenbaum, D.S., 2012. Targeted sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2a gene delivery to restore electrical stability in the failing heart. *Circulation* 126, 2095-2104.
- Dan, P., Lin, E., Huang, J., Biln, P., Tibbits, G.F., 2007. Three-dimensional distribution of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger and ryanodine receptor during development. *Biophys J* 93, 2504-2518.
- De Keulenaer, G.W., Brutsaert, D.L., 2011. Systolic and diastolic heart failure are overlapping phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation* 123, 1996-2004.
- del Monte, F., Harding, S.E., Schmidt, U., Matsui, T., Kang, Z.B., Dec, G.W., Gwathmey, J.K., Rosenzweig, A., Hajjar, R.J., 1999. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 100, 2308-2311.
- Drazner, M.H., 2005. The transition from hypertrophy to failure: how certain are we? *Circulation* 112(7), 936-938.
- Dunlay, S.M., Roger, V.L., Weston, S.A., Jiang, R., Redfield, M.M., 2012. Longitudinal changes in ejection fraction in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *Circ Heart Fail* 5, 720-726.
- Eisner, D.A., Caldwell, J.L., Kistamas, K., Trafford, A.W., 2017. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res* 121, 181-195.
- Fabiato, A., 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14.
- Faris, R., Flather, M., Purcell, H., Henein, M., Poole-Wilson, P., Coats, A., 2002. Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials. *Int J Cardiol* 82, 149-158.
- Faris, R.F., Flather, M., Purcell, H., Poole-Wilson, P.A., Coats, A.J., 2012. Diuretics for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003838.
- Flather, M.D., Shibata, M.C., Coats, A.J., Van Veldhuisen, D.J., Parkhomenko, A., Borbola, J., Cohen-Solal, A., Dumitrascu, D., Ferrari, R., Lechat, P., Soler-Soler, J., Tavazzi, L., Spinarova, L., Toman, J., Bohm, M., Anker, S.D., Thompson, S.G., Poole-Wilson, P.A., Investigators, S., 2005. Randomized trial to determine

the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 26, 215-225.

Fleischer, S., Ogunbunmi, E.M., Dixon, M.C., Fler, E.A., 1985. Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7256-7259.

Fowler, E.D., Kong, C.H.T., Hancox, J.C., Cannell, M.B., 2018. Late Ca(2+) Sparks and Ripples During the Systolic Ca(2+) Transient in Heart Muscle Cells. *Circ Res* 122, 473-478.

Fraser, H., Belardinelli, L., Wang, L., Light, P.E., McVeigh, J.J., Clanachan, A.S., 2006. Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 41, 1031-1038.

Fukaya, H., Plummer, B.N., Piktel, J.S., Wan, X., Rosenbaum, D.S., Laurita, K.R., Wilson, L.D., 2018. Arrhythmogenic cardiac alternans in heart failure is suppressed by late sodium current blockade by ranolazine. *Heart Rhythm*.

Fukuta, H., Goto, T., Wakami, K., Ohte, N., 2016. Effects of drug and exercise intervention on functional capacity and quality of life in heart failure with preserved ejection fraction: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Prev Cardiol* 23, 78-85.

Fukuta, H., Little, W.C., 2007. Contribution of systolic and diastolic abnormalities to heart failure with a normal and a reduced ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis* 49, 229-240.

Garg, R., Yusuf, S., 1995. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA* 273, 1450-1456.

Gaughan, J.P., Furukawa, S., Jeevanandam, V., Hefner, C.A., Kubo, H., Margulies, K.B., McGowan, B.S., Mattiello, J.A., Dipla, K., Piacentino, V., 3rd, Li, S., Houser, S.R., 1999. Sodium/calcium exchange contributes to contraction and relaxation in failed human ventricular myocytes. *Am J Physiol* 277, H714-724.

Gerber, Y., Weston, S.A., Redfield, M.M., Chamberlain, A.M., Manemann, S.M., Jiang, R., Killian, J.M., Roger, V.L., 2015. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med* 175, 996-1004.

Giannuzzi, P., Imparato, A., Temporelli, P.L., de Vito, F., Silva, P.L., Scapellato, F., Giordano, A., 1994. Doppler-derived mitral deceleration time of early filling as a strong predictor of pulmonary capillary wedge pressure in postinfarction patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 23(7), 1630-1637.

Gorski, P.A., Ceholski, D.K., Hajjar, R.J., 2015. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure – a rational approach for disease treatment *Cell Metab* 3;21(2), 183-194.

Grant, A.O., 2009. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 185-194.

Granzier, H., Wu, Y., Siegfried, L., LeWinter, M., 2005. Titin: physiological function and role in cardiomyopathy and failure. *Heart Fail Rev* 10, 211-223.

- Guder, G., Bauersachs, J., Frantz, S., Weismann, D., Allolio, B., Ertl, G., Angermann, C.E., Stork, S., 2007. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation* 115, 1754-1761.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., Text book of medical physiology.
- Hagemann, D., Xiao, R.P., 2002. Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 12, 51-56.
- Haghighi, K., Pritchard, T., Bossuyt, J., Waggoner, J.R., Yuan, Q., Fan, G.C., Osinska, H., Anjak, A., Rubinstein, J., Robbins, J., Bers, D.M., Kranias, E.G., 2012. The human phospholamban Arg14-deletion mutant localizes to plasma membrane and interacts with the Na/K-ATPase. *J Mol Cell Cardiol* 52, 773-782.
- Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., Imoto, K., 1992. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 312, 229-235.
- Hamdani, N., Franssen, C., Lourenco, A., Falcao-Pires, I., Fontoura, D., Leite, S., Plettig, L., Lopez, B., Ottenheijm, C.A., Becher, P.M., Gonzalez, A., Tschope, C., Diez, J., Linke, W.A., Leite-Moreira, A.F., Paulus, W.J., 2013. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 6, 1239-1249.
- Hamdani, N., Kooij, V., van Dijk, S., Merkus, D., Paulus, W.J., Remedios, C.D., Duncker, D.J., Stienen, G.J., van der Velden, J., 2008. Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 77, 649-658.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- Hammarstrom, A.K., Gage, P.W., 2002. Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J* 31, 323-330.
- Hasenfuss, G., 1998. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 279-289.
- Hasenfuss, G., Schillinger, W., Lehnart, S.E., Preuss, M., Pieske, B., Maier, L.S., Prestle, J., Minami, K., Just, H., 1999. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99(5), 641-648.
- Heinzel, F.R., Hohendanner, F., Jin, G., Sedej, S., Edelmann, F., 2015. Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction. *J Appl Physiol* (1985) 119, 1233-1242.
- Ho, J.E., Gona, P., Pencina, M.J., Tu, J.V., Austin, P.C., Vasan, R.S., Kannel, W.B., D'Agostino, R.B., Lee, D.S., Levy, D., 2012. Discriminating clinical features of heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in the community. *Eur Heart J* 33, 1734-1741.
- Hogg, K., Swedberg, K., McMurray, J., 2004. Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 43, 317-327.
- Horgan, S., Watson, C., Glezeva, N., Baugh, J., 2014. Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction. *J Card Fail* 20, 984-995.
- Hoshijima, M., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Minamisawa, S., Date, M.O., Gu, Y., Iwatate, M., Li, M., Wang, L., Wilson, J.M., Wang, Y., Ross, J., Jr., Chien, K.R., 2002. Chronic suppression of heart-failure progression by

a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* 8, 864-871.

Houser, S.R., Margulies, K.B., Murphy, A.M., Spinale, F.G., Francis, G.S., Prabhu, S.D., Rockman, H.A., Kass, D.A., Molkentin, J.D., Sussman, M.A., Koch, W.J., American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, C.o.C.C., Council on Functional, G., Translational, B., 2012. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 111, 131-150.

Huke, S., Bers, D.M., 2007. Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 42, 590-599.

Iwanaga, Y., Hoshijima, M., Gu, Y., Iwatate, M., Dieterle, T., Ikeda, Y., Date, M.O., Chrast, J., Matsuzaki, M., Peterson, K.L., Chien, K.R., Ross, J., Jr., 2004. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J Clin Invest* 113, 727-736.

Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., Hajjar, R.J., Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy In Cardiac Disease Trial, I., 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, 171-181.

Jung, D.H., Mo, S.H., Kim, D.H., 2006. Calumenin, a multiple EF-hands Ca²⁺-binding protein, interacts with ryanodine receptor-1 in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 34-42.

Kawaguchi, M., Hay, I., Fetters, B., Kass, D.A., 2003. Combined ventricular systolic and arterial stiffening in patients with heart failure and preserved ejection fraction: implications for systolic and diastolic reserve limitations. *Circulation* 107, 714-720.

Kaye, D.M., Prevolos, A., Marshall, T., Byrne, M., Hoshijima, M., Hajjar, R., Mariani, J.A., Pepe, S., Chien, K.R., Power, J.M., 2007. Percutaneous cardiac recirculation-mediated gene transfer of an inhibitory phospholamban peptide reverses advanced heart failure in large animals. *J Am Coll Cardiol* 50, 253-260.

Keating, G.M., 2008. Ranolazine: a review of its use in chronic stable angina pectoris. *Drugs* 68, 2483-2503.

Kho, C., Lee, A., Jeong, D., Oh, J.G., Chaanine, A.H., Kizana, E., Park, W.J., Hajjar, R.J., 2011. SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure. *Nature* 477, 601-605.

King, J.B., Bress, A.P., Reese, A.D., Munger, M.A., 2015. Nephilysin Inhibition in Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: A Clinical Review. *Pharmacotherapy* 35, 823-837.

Kitzman, D.W., Little, W.C., Brubaker, P.H., Anderson, R.T., Hundley, W.G., Marburger, C.T., Brosnihan, B., Morgan, T.M., Stewart, K.P., 2002. Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA* 288, 2144-2150.

Klabunde, R.E., 2017. Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG. *Adv Physiol Educ* 41, 29-37.

Klapholz, M., Maurer, M., Lowe, A.M., Messineo, F., Meisner, J.S., Mitchell, J., Kalman, J., Phillips, R.A., Steingart, R., Brown, E.J., Jr., Berkowitz, R., Moskowitz, R., Soni, A., Mancini, D., Bijou, R., Sehat, K., Varshneya, N., Kukin, M., Katz, S.D., Sleeper, L.A., Le Jemtel, T.H., New York Heart Failure, C., 2004.

Hospitalization for heart failure in the presence of a normal left ventricular ejection fraction: results of the New York Heart Failure Registry. *J Am Coll Cardiol* 43, 1432-1438.

Kruger, M., Kotter, S., Grutzner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M.M., Butt, E., dos Remedios, C.G., Linke, W.A., 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 104, 87-94.

Kubo, S.H., Rector, T.S., Bank, A.J., Williams, R.E., Heifetz, S.M., 1991. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 84(4), 1589-1596.

Lam, C.S., Carson, P.E., Anand, I.S., Rector, T.S., Kuskowski, M., Komajda, M., McKelvie, R.S., McMurray, J.J., Zile, M.R., Massie, B.M., Kitzman, D.W., 2012. Sex differences in clinical characteristics and outcomes in elderly patients with heart failure and preserved ejection fraction: the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial. *Circ Heart Fail* 5, 571-578.

Lam, C.S., Donal, E., Kraigher-Krainer, E., Vasan, R.S., 2011. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 13, 18-28.

Lam, C.S., Roger, V.L., Rodeheffer, R.J., Borlaug, B.A., Enders, F.T., Redfield, M.M., 2009. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *J Am Coll Cardiol* 53, 1119-1126.

Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996.

Lehnart, S.E., Mongillo, M., Bellinger, A., Lindegger, N., Chen, B.X., Hsueh, W., Reiken, S., Wronska, A., Drew, L.J., Ward, C.W., Lederer, W.J., Kass, R.S., Morley, G., Marks, A.R., 2008. Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest* 118, 2230-2245.

Lehnart, S.E., Wehrens, X.H., Reiken, S., Warriar, S., Belevych, A.E., Harvey, R.D., Richter, W., Jin, S.L., Conti, M., Marks, A.R., 2005. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123, 25-35.

Lewis, E.F., Lamas, G.A., O'Meara, E., Granger, C.B., Dunlap, M.E., McKelvie, R.S., Probstfield, J.L., Young, J.B., Michelson, E.L., Halling, K., Carlsson, J., Olofsson, B., McMurray, J.J., Yusuf, S., Swedberg, K., Pfeffer, M.A., Investigators, C., 2007. Characterization of health-related quality of life in heart failure patients with preserved versus low ejection fraction in CHARM. *Eur J Heart Fail* 9, 83-91.

Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D.B., Belmares, R., Jiang, Y., 2012. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science* 335(6069), 686-690.

Libbey, J., 2007. *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux EUROTEXT*, Paris.

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, 601-605.

Lindemann, J.P., Jones, L.R., Hathaway, D.R., Henry, B.G., Watanabe, A.M., 1983. beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258, 464-471.

- Lindner, M., Brandt, M.C., Sauer, H., Hescheler, J., Bohle, T., Beuckelmann, D.J., 2002. Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure. *Cell Calcium* 31, 175-182.
- Little, W.C., Brucks, S., 2005. Therapy for diastolic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 47, 380-388.
- Litwin, S.E., Katz, S.E., Weinberg, E.O., Lorell, B.H., Aurigemma, G.P., Douglas, P.S., 1995. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 91, 2642-2654.
- Liu, M., Yang, K.C., Dudley, S.C.J., 2016. Cardiac Sodium Channel Mutations: Why so Many Phenotypes? *curr Top Membr* 78, 513-559.
- Lopez, B., Ravassa, S., Gonzalez, A., Zubillaga, E., Bonavilla, C., Bergés, M., Echegaray, K., Beaumont, J., Moreno, M.U., San José, G., Larman, M., Querejeta, R., Diez, J., 2016. Myocardial Collagen Cross-Linking Is Associated With Heart Failure Hospitalization in Patients With Hypertensive Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 67(3), 251-260.
- Louch, W.E., Hougen, K., Mork, H.K., Swift, F., Aronsen, J.M., Sjaastad, I., Reims, H.M., Roald, B., Andersson, K.B., Christensen, G., Sejersted, O.M., 2010. Sodium accumulation promotes diastolic dysfunction in end-stage heart failure following Serca2 knockout. *J Physiol* 588, 465-478.
- Luo, M., Anderson, M.E., 2013. Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. *Circ Res* 113, 690-708.
- Luo, W., Grupp, I.L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J.J., Doetschman, T., 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, 401-409.
- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B., Green, N.M., 1985. Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316, 696-700.
- Mandinov, L., Eberli, F., Seiler, C., Hess, O., 2000. Diastolic heart failure *cardiovasc Res* 45, 813-825.
- Mangiafico, S., Costello-Boerrigter, L.C., Andersen, I.A., Cataliotti, A., Burnett, J.C., Jr., 2013. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur Heart J* 34, 886-893c.
- Mant, J., Doust, J., Roalfe, A., Barton, P., Cowie, M.R., Glasziou, P., Mant, D., McManus, R.J., Holder, R., Deeks, J., Fletcher, K., Qume, M., Sohanpal, S., Sanders, S., Hobbs, F.D., 2009. Systematic review and individual patient data meta-analysis of diagnosis of heart failure, with modelling of implications of different diagnostic strategies in primary care. *Health Technol Assess* 13, 1-207, iii.
- Marks, A.R., 2013. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest* 123, 46-52.
- Martos, R., Baugh, J., Ledwidge, M., O'Loughlin, C., Conlon, C., Patle, A., Donnelly, S.C., McDonald, K., 2007. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* 115, 888-895.

- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosembly, N., Marks, A.R., 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376.
- Massie, B.M., Carson, P.E., McMurray, J.J., Komajda, M., McKelvie, R., Zile, M.R., Anderson, S., Donovan, M., Iverson, E., Staiger, C., Ptaszynska, A., Investigators, I.P., 2008. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 359, 2456-2467.
- 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, 3786-3792.
- Matsuoka, S., Hilgemann, D.W., 1992. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Ion and voltage dependencies of the transport cycle. *J Gen Physiol* 100, 963-1001.
- Mattiazzi, A., Kranias, E.G., 2014. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol* 5, 5.
- Mattiazzi, A., Mundina-Weilenmann, C., Guoxiang, C., Vittone, L., Kranias, E., 2005. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res* 68, 366-375.
- 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, 424-431.
- McGrew, S.G., Wolleben, C., Siegl, P., Inui, M., Fleischer, S., 1989. Positive cooperativity of ryanodine binding to the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from heart and skeletal muscle. *Biochemistry* 28, 1686-1691.
- McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Bohm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., Jaarsma, T., Kober, L., Lip, G.Y., Maggioni, A.P., Parkhomenko, A., Pieske, B.M., Popescu, B.A., Ronnevik, P.K., Rutten, F.H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P.T., Voors, A.A., Zannad, F., Zeiher, A., Task Force for the, D., Treatment of, A., Chronic Heart Failure of the European Society of, C., Bax, J.J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B.A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P.A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., McDonagh, T., Sechtem, U., Bonnet, L.A., Avraamides, P., Ben Lamin, H.A., Brignole, M., Coca, A., Cowburn, P., Dargie, H., Elliott, P., Flachskampf, F.A., Guida, G.F., Hardman, S., Jung, B., Merkely, B., Mueller, C., Nanas, J.N., Nielsen, O.W., Orn, S., Parissis, J.T., Ponikowski, P., Guidelines, E.S.C.C.f.P., 2012. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14, 803-869.
- Mercadier, J.J., Lompre, A.M., Duc, P., Boheler, K.R., Fraysse, J.B., Wisniewsky, C., Allen, P.D., Komajda, M., Schwartz, K., 1990. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305-309.
- Messerli, F.H., Rimoldi, S.F., Bangalore, S., 2017. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. *JACC Heart Fail* 5, 543-551.

Meyer, M., Schillinger, W., Pieske, B., Holubarsch, C., Heilmann, C., Posival, H., Kuwajima, G., Mikoshiba, K., Just, H., Hasenfuss, G., et al., 1995. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 778-784.

Mezzano, V., Pellman, J., Sheikh, F., 2014. Cell junctions in the specialized conduction system of the heart. *Cell Commun Adhes* 21, 149-159.

Mills, G.D., Kubo, H., Harris, D.M., Berretta, R.M., Piacentino, V., Houser, S.R., 2006. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H61-70.

Mohabir, R., Young, S.D., Strosberg, A.M., 1994. Role of angiotensin in pressure overload-induced hypertrophy in rats: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors, an AT1 receptor antagonist, and surgical reversal. *J Cardiovasc Pharmacol* 23, 291-299.

Mohammed, S.F., Hussain, S., Mirzoyev, S.A., Edwards, W.D., Maleszewski, J.J., Redfield, M.M., 2015. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 131, 550-559.

Mohammed, S.F., Ohtani, T., Korinek, J., Lam, C.S., Larsen, K., Simari, R.D., Valencik, M.L., Burnett, J.C., Jr., Redfield, M.M., 2010. Mineralocorticoid accelerates transition to heart failure with preserved ejection fraction via "nongenomic effects". *Circulation* 122, 370-378.

Moller, J.V., Nissen, P., Sorensen, T.L., le Maire, M., 2005. Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump. *Curr Opin Struct Biol* 15, 387-393.

Morgan, J.P., Erny, R.E., Allen, P.D., Grossman, W., Gwathmey, J.K., 1990. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 81, III21-32.

Morimoto, S., 2008. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 77, 659-666.

Most, P., Remppis, A., Pleger, S.T., Loffler, E., Ehlermann, P., Bernotat, J., Kleuss, C., Heierhorst, J., Ruiz, P., Witt, H., Karczewski, P., Mao, L., Rockman, H.A., Duncan, S.J., Katus, H.A., Koch, W.J., 2003. Transgenic overexpression of the Ca²⁺-binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. *J Biol Chem* 278, 33809-33817.

Mottram, P.M., Haluska, B., Leano, R., Cowley, D., Stowasser, M., Marwick, T.H., 2004. Effect of aldosterone antagonism on myocardial dysfunction in hypertensive patients with diastolic heart failure. *Circulation* 110, 558-565.

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, 321-334.

Munch, G., Rosport, K., Baumgartner, C., Li, Z., Wagner, S., Bultmann, A., Ungerer, M., 2006. Functional alterations after cardiac sodium-calcium exchanger overexpression in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H488-495.

Nabel, E.G., Braunwald, E., 2012. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 366, 54-63.

- Nag, A.C., 1980. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28, 41-61.
- Nagueh, S.F., Appleton, C.P., Gillebert, T.C., Marino, P.N., Oh, J.K., Smiseth, O.A., Waggoner, A.D., Flachskampf, F.A., Pellikka, P.A., Evangelisa, A., 2009. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 10, 165-193.
- 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, 169-177.
- Neef, S., Dybkova, N., Sossalla, S., Ort, K.R., Fluschnik, N., Neumann, K., Seipelt, R., Schondube, F.A., Hasenfuss, G., Maier, L.S., 2010. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144.
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Nerbonne, J.M., Kass, R.S., 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85, 1205-1253.
- Nodari, S., Metra, M., Dei Cas, L., 2003. Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol. *Eur J Heart Fail* 5, 621-627.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W., 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440-443.
- Oktay, A.A., Shah, S.J., 2014. Current perspectives on systemic hypertension in heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Cardiol Rep* 16, 545.
- 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, 13472-13483.
- Ottolia, M., Nicoll, D.A., Philipson, K.D., 2009. Roles of two Ca²⁺-binding domains in regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 284, 32735-32741.
- Owan, T.E., Hodge, D.O., Herges, R.M., Jacobsen, S.J., Roger, V.L., Redfield, M.M., 2006. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 355, 251-259.
- Packer, M., Poole-Wilson, P.A., Armstrong, P.W., Cleland, J.G., Horowitz, J.D., Massie, B.M., Ryden, L., Thygesen, K., Uretsky, B.F., 1999. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation* 100, 2312-2318.
- Palmiero, P., Zito, A., Maiello, M., Cameli, M., Modesti, P.A., Muiesan, M.L., Novo, S., Saba, P.S., Scicchitano, P., Pedrinelli, R., Ciccone, M.M., 2015. Left ventricular diastolic function in hypertension: methodological considerations and clinical implications. *J Clin Med Res* 7, 137-144.

- Pandey, A., Garg, S., Matulevicius, S.A., Shah, A.M., Garg, J., Drazner, M.H., Amin, A., Berry, J.D., Marwick, T.H., Marso, S.P., de Lemos, J.A., Kumbhani, D.J., 2015. Effect of Mineralocorticoid Receptor Antagonists on Cardiac Structure and Function in Patients With Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Am Heart Assoc* 4, e002137.
- Paulus, W.J., Tschope, C., Sanderson, J.E., Rusconi, C., Flachskampf, F.A., Rademakers, F.E., Marino, P., Smiseth, O.A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A.F., Borbely, A., Edes, I., Handoko, M.L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A.G., Brutsaert, D.L., 2007. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 28(20), 2539-2550.
- Periasamy, M., Huke, S., 2001. SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 33(6), 1053-1063.
- Pfeffer, M.A., Claggett, B., Assmann, S.F., Boineau, R., Anand, I.S., Clausell, N., Desai, A.S., Diaz, R., Fleg, J.L., Gordeev, I., Heitner, J.F., Lewis, E.F., O'Meara, E., Rouleau, J.L., Probstfield, J.L., Shaburishvili, T., Shah, S.J., Solomon, S.D., Sweitzer, N.K., McKinlay, S.M., Pitt, B., 2015. Regional variation in patients and outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial. *Circulation* 131, 34-42.
- Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Fishbein, M.C., Fletcher, P.J., Spadaro, J., Kloner, R.A., Braunwald, E., 1979. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44, 503-512.
- Phan, T.T., Shivu, G.N., Abozguia, K., Gnanadevan, M., Ahmed, I., Frenneaux, M., 2009. Left ventricular torsion and strain patterns in heart failure with normal ejection fraction are similar to age-related changes. *Eur J Echocardiogr* 10, 793-800.
- Phan, T.T., Shivu, G.N., Abozguia, K., Sanderson, J.E., Frenneaux, M., 2012. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction: from molecular mechanisms to exercise haemodynamics. *Int J Cardiol* 158, 337-343.
- Piccini, J.P., Klein, L., Gheorghiadu, M., Bonow, R.O., 2004. New insights into diastolic heart failure: role of diabetes mellitus. *AM J Med* 8;116, 64S-75S.
- Pitt, B., Pfeffer, M.A., Assmann, S.F., Boineau, R., Anand, I.S., Claggett, B., Clausell, N., Desai, A.S., Diaz, R., Fleg, J.L., Gordeev, I., Harty, B., Heitner, J.F., Kenwood, C.T., Lewis, E.F., O'Meara, E., Probstfield, J.L., Shaburishvili, T., Shah, S.J., Solomon, S.D., Sweitzer, N.K., Yang, S., McKinlay, S.M., Investigators, T., 2014. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 370, 1383-1392.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G., Coats, A.J., Falk, V., Gonzalez-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., van der Meer, P., Authors/Task Force, M., Document, R., 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18, 891-975.
- Pouleur, H., 1990. Diastolic dysfunction and myocardial energetics. *Eur Heart J* 11 Suppl C, 30-34.

- Primessnig, U., Schonleitner, P., Holl, A., Pfeiffer, S., Bracic, T., Rau, T., Kapl, M., Stojakovic, T., Glasnov, T., Leineweber, K., Wakula, P., Antoons, G., Pieske, B., Heinzl, F.R., 2016. Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 18, 987-997.
- Quednau, B.D., Nicoll, D.A., Philipson, K.D., 1997. Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol* 272, C1250-1261.
- Rame, J.E., Ramilo, M., Spencer, N., Blewett, C., Mehta, S.K., Dries, D.L., Drazner, M.H., 2004. Development of a depressed left ventricular ejection fraction in patients with left ventricular hypertrophy and a normal ejection fraction. *Am J Cardiol* 93, 234-237.
- Rastogi, S., Sharov, V.G., Mishra, S., Gupta, R.C., Blackburn, B., Belardinelli, L., Stanley, W.C., Sabbah, H.N., 2008. Ranolazine combined with enalapril or metoprolol prevents progressive LV dysfunction and remodeling in dogs with moderate heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H2149-2155.
- Redfield, M.M., Chen, H.H., Borlaug, B.A., Semigran, M.J., Lee, K.L., Lewis, G., LeWinter, M.M., Rouleau, J.L., Bull, D.A., Mann, D.L., Deswal, A., Stevenson, L.W., Givertz, M.M., Ofili, E.O., O'Connor, C.M., Felker, G.M., Goldsmith, S.R., Bart, B.A., McNulty, S.E., Ibarra, J.C., Lin, G., Oh, J.K., Patel, M.R., Kim, R.J., Tracy, R.P., Velazquez, E.J., Anstrom, K.J., Hernandez, A.F., Mascette, A.M., Braunwald, E., Trial, R., 2013. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA* 309, 1268-1277.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemblyt, N., Warren, M.S., He, K.L., Yi, G.H., Wang, J., Burkhoff, D., Vassort, G., Marks, A.R., 2003. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol* 160, 919-928.
- Ren, X., Philipson, K.D., 2013. The topology of the cardiac Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger, NCX1. *J Mol Cell Cardiol* 57, 68-71.
- Reuter, H., 1979. Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* 41, 413-424.
- Richard, S., Leclercq, F., Lemaire, S., Piot, C., Nargeot, J., 1998. Ca²⁺ currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 300-311.
- Ritterhoff, J., Most, P., 2012. Targeting S100A1 in heart failure. *Gene Ther* 19, 613-621.
- Rodriguez, P., Bhogal, M.S., Colyer, J., 2003. Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem* 278, 38593-38600.
- Roe, A.T., Aronsen, J.M., Skardal, K., Hamdani, N., Linke, W.A., Danielsen, H.E., Sejersted, O.M., Sjaastad, I., Louch, W.E., 2017. Increased passive stiffness promotes diastolic dysfunction despite improved Ca²⁺ handling during left ventricular concentric hypertrophy. *Cardiovasc Res* 113, 1161-1172.
- Roh, J., Houstis, N., Rosenzweig, A., 2017. Why don't we have proven treatments for HFpEF? *Circ Res* 120, 1243-1245.
- Roux-Buisson, N., Cacheux, M., Fourest-Lieuvin, A., Fauconnier, J., Brocard, J., Denjoy, I., Durand, P., Guicheney, P., Kyndt, F., Leenhardt, A., Le Marec, H., Lucet, V., Mabo, P., Probst, V., Monnier, N., Ray, P.F.,

- Santoni, E., Trémeaux, P., Lacampagne, A., Fauré, J., Lunardi, J., 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.
- Runte, K.E., Bell, S.P., Selby, D.E., Haussler, T.N., Ashikaga, T., LeWinter, M.M., Palmer, B.M., Meyer, M., 2017. Relaxation and the Role of Calcium in Isolated Contracting Myocardium From Patients With Hypertensive Heart Disease and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail* 10.
- Saint, D.A., 2008. The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target? *Br J Pharmacol* 153, 1133-1142.
- Schmitt, J.P., Kamisago, M., Asahi, M., Li, G.H., Ahmad, F., Mende, U., Kranias, E.G., MacLennan, D.H., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 2003. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 299, 1410-1413.
- Schmitt, N., Grunnet, M., Olesen, S.P., 2014. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev* 94, 609-653.
- Schroder, F., Handrock, R., Beuckelmann, D.J., Hirt, S., Hullin, R., Priebe, L., Schwinger, R.H., Weil, J., Herzig, S., 1998. Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98, 969-976.
- Schwartzberg, S., Redfield, M.M., From, A.M., Sorajja, P., Nishimura, R.A., Borlaug, B.A., 2012. Effects of vasodilation in heart failure with preserved or reduced ejection fraction implications of distinct pathophysiologies on response to therapy. *J Am Coll Cardiol* 59, 442-451.
- Schwinger, R.H., Bohm, M., Schmidt, U., Karczewski, P., Bavendiek, U., Flesch, M., Krause, E.G., Erdmann, E., 1995. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92, 3220-3228.
- Shah, A.M., Claggett, B., Sweitzer, N.K., Shah, S.J., Anand, I.S., O'Meara, E., Desai, A.S., Heitner, J.F., Li, G., Fang, J., Rouleau, J., Zile, M.R., Markov, V., Ryabov, V., Reis, G., Assmann, S.F., McKinlay, S.M., Pitt, B., Pfeffer, M.A., Solomon, S.D., 2014. Cardiac structure and function and prognosis in heart failure with preserved ejection fraction: findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) Trial. *Circ Heart Fail* 7, 740-751.
- Shan, J., Betzenhauser, M.J., Kushnir, A., Reiken, S., Meli, A.C., Wronska, A., Dura, M., Chen, B.X., Marks, A.R., 2010. Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and beta-adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest* 120, 4375-4387.
- Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M., 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52, 557-594.
- Shimizu, Y., Uematsu, M., Shimizu, H., Nakamura, K., Yamagishi, M., Miyatake, K., 1998. Peak negative myocardial velocity gradient in early diastole as a noninvasive indicator of left ventricular diastolic function: comparison with transmitral flow velocity indices. *J Am Coll Cardiol* 32(5), 1418-1425.
- Sipido, K.R., Acsai, K., Antoons, G., Bito, V., Macquaide, N., 2013. T-tubule remodelling and ryanodine receptor organization modulate sodium-calcium exchange. *Adv Exp Med Biol* 961, 375-383.

- Solomon, S.D., Zile, M., Pieske, B., Voors, A., Shah, A., Kraigher-Krainer, E., Shi, V., Bransford, T., Takeuchi, M., Gong, J., Lefkowitz, M., Packer, M., McMurray, J.J., Prospective comparison of, A.w.A.R.B.o.M.O.h.f.w.p.e.f.I., 2012. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 380, 1387-1395.
- Sossalla, S., Wagner, S., Rasenack, E.C., Ruff, H., Weber, S.L., Schöndube, F.A., Tirilomis, T., Tenderich, G., Hasenfuss, G., Belardinelli, L., Maier, L.S., 2008. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45, 32-43.
- Strack, S., Barban, M.A., Wadzinski, B.E., Colbran, R.J., 1997. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J Neurochem* 68, 2119-2128.
- Studer, R., Reinecke, H., Bilger, J., Eschenhagen, T., Bohm, M., Hasenfuss, G., Just, H., Holtz, J., Drexler, H., 1994. Gene expression of the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443-453.
- Swedberg, K., Komajda, M., Bohm, M., Borer, J.S., Ford, I., Dubost-Brama, A., Lerebours, G., Tavazzi, L., Investigators, S., 2010. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 376, 875-885.
- Takasago, T., Imagawa, T., Shigekawa, M., 1989. Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by cAMP-dependent protein kinase. *J Biochem* 106, 872-877.
- Takekuma, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., et al., 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339, 439-445.
- Tan, H.L., Bezzina, C.R., Smits, J.P., Verkerk, A.O., Wilde, A.A., 2003. Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res* 57, 961-973.
- tan, Y.T., Wenzelburger, F., Lee, E., Heatlie, G., Leyva, F., Frenneaux, M., Sanderson, J.E., 2009. The pathophysiology of heart failure with normal ejection fraction: exercise echocardiography reveals complex abnormalities of both systolic and diastolic ventricular function involving torsion, untwist, and longitudinal motion. *J Am Coll Cardiol* 54(91), 36-40.
- Tarone, G., Balligand, J.L., Bauersachs, J., Clerk, A., De Windt, L., Heymans, S., Hilfiker-Kleiner, D., Hirsch, E., Iaccharino, G., Knoll, R., Leite-Moreira, A.F., Lourenco, A.P., Mayr, M., Thum, T., Tocchetti, C.G., 2014. Targeting myocardial remodelling to develop novel therapies for heart failure: a position paper from the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 16, 494-508.
- ter Keurs, H.E., 2012. The interaction of Ca²⁺ with sarcomeric proteins: role in function and dysfunction of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H38-50.
- 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.

- Toyoshima, C., Inesi, G., 2004. Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 269-292.
- Traaseth, N.J., Ha, K.N., Verardi, R., Shi, L., Buffy, J.J., Masterson, L.R., Veglia, G., 2008. Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca(2+)-ATPase. *Biochemistry* 47, 3-13.
- Tsien, R.W., 1983. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45, 341-358.
- Tzschatzsch, H., Hattasch, R., Knebel, F., Klaua, R., Schultz, M., Jenderka, K.V., Braun, J., Sack, I., 2013. Isovolumetric elasticity alteration in the human heart detected by in vivo time-harmonic elastography. *Ultrasound Med Biol* 39, 2272-2278.
- Ul Haq, M.A., Wong, C., Hare, D.L., 2015. Heart failure with preserved ejection fraction: an insight into its prevalence, predictors, and implications of early detection. *Rev Cardiovasc Med* 16(1), 20-27.
- Valero-Muñoz, M., Backman, W., Sam, F., 2017. Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a "Fishing Expedition". *JACC Basic Transl Sci* 2, 770-789.
- van Heerebeek, L., Borbely, A., Niessen, H.W., Bronzwaer, J.G., van der Velden, J., Stienen, G.J., Linke, W.A., Laarman, G.J., Paulus, W.J., 2006. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113, 1966-1973.
- van Heerebeek, L., Hamdani, N., Falcao-Pires, I., Leite-Moreira, A.F., Begieneman, M.P., Bronzwaer, J.G., van der Velden, J., Stienen, G.J., Laarman, G.J., Somsen, A., Verheugt, F.W., Niessen, H.W., Paulus, W.J., 2012. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 126, 830-839.
- van Heerebeek, L., Hamdani, N., Handoko, M.L., Falcao-Pires, I., Musters, R.J., Kupreishvili, K., Ijsselmuiden, A.J., Schalkwijk, C.G., Bronzwaer, J.G., Diamant, M., Borbely, A., van der Velden, J., Stienen, G.J., Laarman, G.J., Niessen, H.W., Paulus, W.J., 2008. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117, 43-51.
- Venetucci, L.A., Trafford, A.W., O'Neill, S.C., Eisner, D.A., 2007. Na/Ca exchange: regulator of intracellular calcium and source of arrhythmias in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1099, 315-325.
- Vliegen, H.W., van der Laarse, A., Cornelisse, C.J., Eulderink, F., 1991. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* 12, 488-494.
- Wang, J., Khoury, D.S., Yue, Y., Torre-Amione, G., Nagueh, S.F., 2008. Preserved left ventricular twist and circumferential deformation, but depressed longitudinal and radial deformation in patients with diastolic heart failure. *Eur Heart J* 29, 1283-1289.
- Wegener, A.D., Simmerman, H.K., Lindemann, J.P., Jones, L.R., 1989. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264, 11468-11474.
- Wehrens, X.H., Lehnart, S.E., Reiken, S.R., Marks, A.R., 2004. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70.

- Wei, L., Hanna, A.D., Beard, N.A., Dulhunty, A.F., 2009. Unique isoform-specific properties of calsequestrin in the heart and skeletal muscle. *Cell Calcium* 45, 474-484.
- Williams, S., Pourrier, M., McAfee, D., Lin, S., Fedida, D., 2014. Ranolazine improves diastolic function in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H867-881.
- Willis, B.C., Pandit, S.V., Ponce-Balbuena, D., Zarzoso, M., Guerrero-Serna, G., Limbu, B., Deo, M., Camors, E., Ramirez, R.J., Mironov, S., Herron, T.J., Valdivia, H.H., Jalife, J., 2016. Constitutive Intracellular Na⁺ Excess in Purkinje Cells Promotes Arrhythmogenesis at Lower Levels of Stress Than Ventricular Myocytes From Mice With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* 133, 2348-2359.
- Winther, A.M., Bublitz, M., Karlsen, J.L., Moller, J.V., Hansen, J.B., Nissen, P., Buch-Pedersen, M.J., 2013. The sarcolipin-bound calcium pump stabilizes calcium sites exposed to the cytoplasm. *Nature* 495, 265-269.
- 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, 11144-11152.
- Wood, P., Piran, S., Liu, P.P., 2011. Diastolic heart failure: progress, treatment challenges, and prevention. *Can J Cardiol* 27, 302-310.
- Wray, S., Burdyga, T., 2010. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* 90, 113-178.
- Wright, N.T., Prosser, B.L., Varney, K.M., Zimmer, D.B., Schneider, M.F., Weber, D.J., 2008. S100A1 and calmodulin compete for the same binding site on ryanodine receptor. *J Biol Chem* 283, 26676-26683.
- Wu, Y., Cazorla, O., Labeit, D., Labeit, S., Granzier, H., 2000. Changes in titin and collagen underlie diastolic stiffness diversity of cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2151-2162.
- Xiao, B., Zhong, G., Obayashi, M., Yang, D., Chen, K., Walsh, M.P., Shimoni, Y., Cheng, H., Ter Keurs, H., Chen, S.R., 2006. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 396(1), 7-16.
- Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D.A., Evans, K.E., Meissner, G., 2003. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 278, 23480-23486.
- Yamamoto, K., Origasa, H., Hori, M., Investigators, J.D., 2013. Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction: the Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF). *Eur J Heart Fail* 15, 110-118.
- Yin, Z., Ren, J., Guo, W., 2015. Sarcomeric protein isoform transitions in cardiac muscle: a journey to heart failure. *Biochim Biophys Acta* 1852, 47-52.
- Yip, G.W., Wang, M., Wang, T., Chan, S., Fung, J.W., Yeung, L., Yip, T., Lau, S.T., Lau, C.P., Tang, M.O., Yu, C.M., Sanderson, J.E., 2008. The Hong Kong diastolic heart failure study: a randomised controlled trial of diuretics, irbesartan and ramipril on quality of life, exercise capacity, left ventricular global and regional function in heart failure with a normal ejection fraction. *Heart* 94, 573-580.
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4, 207.

Yusuf, S., Pfeffer, M.A., Swedberg, K., Granger, C.B., Held, P., McMurray, J.J., Michelson, E.L., Olofsson, B., Ostergren, J., Investigators, C., Committees, 2003. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet* 362, 777-781.

Zaccolo, M., Pozzan, T., 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295, 1711-1715.

Zhang, T., Guo, T., Mishra, S., Dalton, N.D., Kranias, E.G., Peterson, K.L., Bers, D.M., Brown, J.H., 2010. Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKII δ (C) transgenic mice. *Circ Res* 106, 354-362.

Zhao, Y., Yu, H., Zhao, X., Ma, R., Li, N., Yu, J., 2017. The Effects of LCZ696 in Patients With Hypertension Compared With Angiotensin Receptor Blockers: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 22, 447-457.

Zi, M., Carmichael, N., Lye, M., 2003. The effect of quinapril on functional status of elderly patients with diastolic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 17, 133-139.

Zile, M.R., Baicu, C.F., Gaasch, W.H., 2004. Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 350, 1953-1959.

Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N.M., Lai, F.A., Meissner, G., MacLennan, D.H., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265, 2244-2256.