THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **Université Montpellier I**

Préparée au sein de l'école doctorale :

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Et de l'unité de recherche :

INSERM U1046

Spécialité :

Physiopathologie Cardiaque

Présentée par :

Sarah KARAM

Effets chroniques du peptide natriurétique de type B (BNP) sur le cœur sain et le remodelage cardiaque post-ischémique : couplage excitation-contraction, arythmies et aspects thérapeutiques

Soutenue le 18 décembre 2013

devant le jury composé de

Christophe HEYMES, Directeur de recherche, INSERM, Toulouse	Rapporteur
Nathalie LALEVEE, Chargé de recherche, INSERM, Marseille	Rapporteur
Mattéo MANGONI, Directeur de recherche, CNRS, Montpellier	Examinateur
Nassim FARES, MCU-HDR, Université St Joseph, Beyrouth	Examinateur
Dominique BABUTY, PU-PH, CHRU de Tours	Examinateur
Sylvain RICHARD, Directeur de recherche, INSERM, Montpellier	Directeur de thèse

Remerciements

Trois ans, ce n'est pas beaucoup dans la vie, mais trois ans de thèse, ce n'est pas pareil. Ce sont trois ans critiques parce qu'on se construit une profession et on se dessine une voie pour l'avenir. Ce sont trois ans qui nous permettent de semer nos premières graines dans la recherche scientifique et de mûrir dans ce domaine. De mûrir aussi dans la vie. Il s'agit de notre première expérience professionnelle. Nous sommes à la fois étudiants et chercheurs, à la fois guidés et autonomes, à la fois dépendants et indépendants. Il s'agit d'un travail d'équipe qui nous permet de nous intégrer dans un groupe, de côtoyer des gens de caractères différents et de cultures différentes. C'est à la fois difficile et enrichissant.

Arrivée à la fin de ma thèse, qui s'est étalée du 15 octobre 2010 au 18 décembre 2013, je me remémore les différents événements qui m'ont marquée au cours de ces trois dernières années, mais surtout les nombreuses personnes qui se sont impliquées dans ma vie personnelle et professionnelle et qui ont laissé des traces, d'une façon ou d'une autre, dans l'accomplissement de ce travail. Je voudrais envoyer mes remerciements à ces personnes, noir sur blanc, de cette façon comme mon travail de thèse restera matérialisé dans ce manuscrit, l'impact qu'ont laissé ces personnes chères le sera aussi.

Je vais commencer, bien sûr, par remercier ***ma famille****. Grâce à sa présence, à ses encouragements et à son soutien, continus et inlassables, j'ai pu partir à l'étranger, avoir la force de vivre une jolie expérience, aussi enrichissante que dure, et poursuivre malgré les différentes pentes que j'ai traversées. J'envoie un petit remerciement en particulier à ma petite soeur chérie,* ***Samar*** *: elle a été et restera toujours ma psychologue, mon âme-soeur et mon grand amour.*

Je remercie le ***Dr. Ramiz Chahine****. C'était le premier professeur qui m'a enseigné la physiologie à l'Université Libanaise. Grâce à sa passion pour la science et son amour pour la fonction cardiaque, j'ai décidé de continuer dans la recherche. Cette personne précieuse m'a également orientée vers mon futur stage post-doctoral. Il m'a ainsi accordée des faveurs que je n'oublierai jamais.*

Je remercie énormément le ***Dr. Nathalie Lalevée****. Nathalie est la personne qui a changé ma vie. Elle a accepté de m'accueillir dans son laboratoire pour mon stage de Master 2, alors que je venais juste de finir ma maitrise au Liban. Elle m'a encadrée*

scientifiquement et personnellement. Elle a orienté ma vie professionnelle par son amour pour la recherche et particulièrement pour la physiologie cardiaque. Elle était la première personne à croire en moi au niveau scientifique, à me soutenir et à m'encourager à avancer dans la recherche. Je la remercie aussi d'avoir suivi l'avancement de mon travail de thèse grâce à sa participation à mon comité de thèse, à la correction de mon mansucrit et à l'évaluation en tant que rapportrice de la totalité du travail.

Je voudrais remercier le ***Dr. Nassim Farès*** *qui m'a accueillie dans son laboratoire de recherche au Liban et qui m'a permis d'en profiter pour faire quelques manipulations au sein de son équipe et pour acquérir une petite expérience dans la recherche libanaise.*

Je remercie beaucoup d'amis, qui m'ont été d'un grand soutien au cours de ces trois ans. Grâce à eux, j'ai pu poursuivre mon parcours et arriver là où je suis, malgré toutes les difficultés que j'ai rencontrées dans ma thèse et dans mon expérience à l'étranger. Je cite particulièrement : Marie-Rose, Viviane, Nathalie, Esber, Zeinab, Hajer, Nathalie, Majd, Elma, Zeina, Elissar, Rindala, Grâce, et beaucoup d'autres qui ont traversé ma vie et m'ont apporté un petit quelque chose.

Je remercie des membres de mon laboratoire qui m'ont été indispensables:

- Mon "précieux diamond" ***Pierre Meschin****. Pierre a été un vrai frère pour moi et un collaborateur d'une grande efficacité. Au niveau personnel, il m'a écoutée, m'a soutenue, m'a encouragée, m'a énervée des fois et m'a fait rire beaucoup de fois. Il a été mon meilleur ami, avec qui j'ai partagé des moments agréables et inoubliables: des congrés, des soirées, des resto, des films de ciné, du sport, des concerts, des vacances... Tous ces moments comptent beaucoup pour moi et seront, pour toujours, ancrés dans ma mémoire et dans mon cœur. Au niveau scientifique, nous avons partagé la même passion pour les manip et la révolution scientifique. Notre amitié professionnelle a rendu le labo un lieu de travail agréable et fructueux. Je le remercie d'exister! et je lui promets une amitié éternelle inshalla...*

- Le "beau gosse persécuté": ***Jérôme Roy****. Avec Jérôme, nous avons également partagé de moments inoubliables au labo et en dehors du labo. Il m'a été d'un grand soutien au niveau personnel et professionnel, un petit frère adorable qui rêve de m'envoyer en charter dans mon pays mais qui ne pourra jamais réaliser son rêve. Je serai toujours là pour l'embêter.*

- Ma belle Soso: **Sophie Jacquin**. Sophie a intégré notre équipe depuis quelques mois mais elle a su par son humour et son amour nous marquer. Sophie est pour moi une amie précieuse, avec qui j'ai eu la chance de "voyager" à chaque repas et à chaque disussion. Je la remercie pour son soutien et sa bonne humeur.

- Notre amie chère **Andréa Guimaraes**. Elle a passé une année parmi nous et elle a su laisser ses empreintes dans nos coeurs par sa gentillesse et son amour. Elle a su également nous transporter au Brésil pendant cette année.

- **Marie Demion** et **Mélanie Gueffier** avec qui j'ai passé de jolis moments au labo et en dehors du labo. Et Marie je n'oublierai jamais notre "balade" où j'ai failli perdre mon souffle.

- **Marina**, **Nour** et **Marie**, le trio libanais. Grâce à ces trois chères amies, j'ai pu me sentir chez moi, j'ai pu manger libanais, parler libanais, rigoler en libanais et pleurer en libanais. Je remercie particulièrement ma chère petite sœur de cœur, **Nour**, pour sa présence et son grand soutien pendant cette période stressante de fin de thèse.

Je voudrais remercier des personnes de mon laboratoire qui ne sont pas passées indifférentes pour moi au cours de ces trois ans, comme Cécile Cassan, Ahmed Turki, Stéphanie Roberge, Amanda finan-Marchi, Charlotte Farah, et Ziad Khoueiry.

Je remercie également différentes personnes qui ont participé à mon travail de thèse, je cite particulièrement : Nadège Sanchez, Fabienne Dagnac-Lagrange, Patrice Bideaux, et Valérie Scheuermann.

Je remercie tous les membres de l'Unité 1046 qui, d'une façon ou d'une autre, ont pu m'apporter un support psychique ou scientifique, m'ont permis de profiter de leur bonne expérience et de leur professionnalisme.

Je remercie le **Dr. Olivier Cazorla** pour m'avoir appris et suivi à l'Ionoptix. C'est une personne agréable au niveau scientifique et humain.

Je remercie le **Dr. Jérôme Thireau** qui m'a introduite au BNP, qui a suivi mes premières manipulations et qui m'a aidée à me préparer pour les différentes présentations que j'ai faites.

J'envoie un grand Merci à mon directeur de thèse et chef d'équipe le **Dr. Sylvain Richard**. Sylvain m'a accueillie en stage de Master dans son laboratoire, m'a aidée à finir major de ma promotion, m'a aidée à avoir ma bourse de thèse et m'a accueillie

également dans son équipe pendant ma thèse. Grâce à Sylvain, j'ai pu travailler avec des personnes de différentes nationalités: libanaise, brésilienne, indonésienne. C'était une expérience assez enrichissante. Je remercie Sylvain pour son soutien au cours de trois ans, je le remercie également pour toutes les corrections qu'il m'a faites et les conseils qu'il m'a donnés.

J'envoie mes remerciements, bien sûr, au ***GRRC*** *qui m'a ouvert la porte pour cette nouvelle expérience et qui m'a financé pendant ces trois ans. Je remercie ce groupe de recherche également pour ses différents ateliers et congrès enrichissants.*

Je remercie les membres du jury : Dr. Christophe Heymès, Dr. Nathalie Lalevée, Dr. Mattéo Mangoni, Dr. Nassim Farès et Pr. Dominique Babuty d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie finalement le ***Pr. Jacques Mercier*** *de m'avoir accueillie dans son unité INSERM et de sa bienveillance.*

Avant propos

L'insuffisance cardiaque (IC) constitue un syndrome complexe qui implique à la fois des processus aigus et chroniques. L'IC aiguë a plusieurs présentations cliniques : elle peut définir un développement rapide d'une apparition récente de symptômes d'IC ou peut être une aggravation progressive de l'IC chronique aboutissant à une IC aiguë décompensée. Malgré une meilleure prise en charge des patients, l'IC aiguë décompensée reste une cause majeure d'hospitalisation et de mortalité, et en manque de stratégies thérapeutiques curatives. L'infarctus du myocarde est l'une des causes majeures de cette pathologie.(1) Bien que les mécanismes *in vivo* et cellulaires du remodelage cardiaque de l'IC chronique soient bien étudiés chez l'Homme et différents modèles expérimentaux, des lacunes existent toujours dans la compréhension de la phase aiguë du remodelage pathologique et dans la transition vers une phase décompensée de l'IC chronique.(2)

Le BNP est une hormone cardiaque fortement impliquée dans cette pathologie. Il est libéré très tôt après infarctus et son taux augmente progressivement avec le remodelage et l'aggravation de la fonction du ventricule gauche (VG).(3) La libération massive de BNP, principalement par les cardiomyocytes stressés du VG, corrèle bien avec les altérations électrophysiologiques et avec les perturbations des mouvements calciques intracellulaires, à l'origine d'événements arythmogéniques pouvant être fatals dans l'IC.(4,5) L'implication du BNP dans ces altérations pose beaucoup de questions de nos jours, surtout que, administré à des patients en IC aiguë décompensée, pour ses effets hémodynamiques vasorelaxants et diurétiques, le BNP a présenté des effets controversés selon les études et a risqué d'augmenter le taux de mortalité dans certaines.(6–8)

Au cours de mon travail de thèse, nous avons cherché à compléter la compréhension des effets chroniques du BNP sur la progression du remodelage cardiaque post-ischémique, sur la décompensation de l'activité cardiaque, et ceci en nous focalisant sur ses effets électrophysiologiques cardiaques et sur le couplage excitation-contraction (CEC). Nous avons également voulu caractériser son efficacité thérapeutique dans l'IC aiguë post-ischémique.

Pour bien comprendre le rationnel de nos travaux, je vais exposer dans une première partie de ce manuscrit un historique introductif comprenant 3 parties majeures:

i) l'activité physiologique cardiaque en insistant sur l'électrophysiologie du cœur et sur le CEC

ii) les altérations électrophysiologiques et du CEC dans l'IC en m'attardant sur les différences connues entre phase compensatrice précoce et décompensée tardive

iii) les effets physiologiques et pathologiques du BNP et son implication dans l'IC

Je vais détailler par la suite les objectifs de ma thèse et la méthodologie suivie pour répondre à nos questions. Les résultats seront présentés en trois parties :

a) les effets chroniques du BNP sur des souris saines,

b) une caractérisation du modèle pathologique utilisé : souris PMI en phase post-ischémique précoce, obtenues par ligature de l'artère coronaire gauche,

c) les effets d'une supplémentation de BNP sur le remodelage cardiaque au cours de la phase précoce post-ischémique chez des souris PMI.

A la fin, je vais conclure sur la quintessence de nos travaux et leurs potentielles implications cliniques.

Table des matières

Avant propos **5**

Table des matières **7**

Abréviations **12**

INTRODUCTION **14**

A. ECG et couplage excitation-contraction **14**

I- Activité électrique cardiaque **14**

a) Automatisme cardiaque : genèse et mesure de l'activité électrique 14

b) Électrophysiologie cellulaire chez les mammifères 18

Comparaison Homme et souris 22

II- De la dépolarisation à la contraction: couplage excitation-contraction (CEC) **23**

a) Structures moléculaires du CEC et régulations post-translationnelles 25

- ✓ Les canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCC) 25
- ✓ Les récepteurs à la ryanodine (RyR) 28
- ✓ L'ATPase calcique du RS (SERCA) 31
- ✓ L'échangeur NCX1 33
- ✓ La S100A1 34

b) Régulation du couplage excitation-contraction 36

- ✓ Relation force-fréquence 37
- ✓ Régulation β-adrénergique 39

III- Conclusion **40**

B. Remodelage cardiaque pathologique et insuffisance cardiaque **41**

I- Épidémiologie de l'insuffisance cardiaque **41**

II- De la compensation à la phase décompensée de l'insuffisance cardiaque **44**

III- Le remodelage des récepteurs β-adrénergiques **45**

IV- Le remodelage cardiaque pathologique **47**

a) Remodelage morphologique et structural du VG 47

b) Remodelage ionique 48

c) Remodelage des mouvements calciques 50

- ✓ Stades tardifs du remodelage cardiaque 51
- ✓ Stades précoces du remodelage cardiaque 54

d) Arythmies cellulaires déclenchées 55

✓ Perturbations électriques : EADs, conséquence : modification du Ca^{2+} 56
✓ Perturbations du Ca^{2+} : DADs, conséquence : modification de l'activité électrique....56
e) Arythmies ventriculaires 57
V- Traitements pharmacologiques de l'insuffisance cardiaque....58
VI- Conclusion....59

C. Peptide natriurétique de type B (BNP) dans l'IC....60
I- Les peptides natriurétiques cardiaques....60
a) Historique....60
b) Synthèse des peptides natriurétiques....61
✓ Le peptide natriurétique de type A....61
✓ Le peptide natriurétique de type B....62
✓ Le peptide natriurétique de type C....62
c) Dégradation des peptides natriurétiques....63
II- Les récepteurs des peptides natriurétiques cardiaques....63
✓ Le récepteur NPR-A....63
✓ Le récepteur NPR-B....64
✓ Le récepteur NPR-C....67
III- Effets physiologiques du peptide natriurétique de type B....67
IV- BNP et insuffisance cardiaque....70
a) Libération du BNP....70
b) BNP : marqueur de pathologies cardiaques en clinique....72
c) Effets thérapeutiques contradictoires du BNP....75
V- BNP et voie β-adrénergique....77
a) BNP et libération synaptique de norépinephrine....78
b) *Cross-talk* GMPc - AMPc à travers PDE2 et PDE3....78
1- Effets du BNP sur la signalisation AMPc-dépendante....78
2- Effets de la norépinephrine sur la signalisation GMPc-dépendante....79
c) BNP et inhibition de la signalisation adrénergique....80
VI- Conclusion....81

Objectifs du travail....82

Méthodologie du travail....84
I- Modèles expérimentaux....84
II- Exploration morpho-fonctionnelle cardiaque....87

a) Echocardiographie....87
b) Electrocardiographie en télémétrie....88
III- Manipulations cellulaires....89
a) Isolement des cellules cardiaques....89
b) Techniques d'imagerie calcique....92
1- Les marqueurs calciques utilisés....92
2- Mesure de la signalisation calcique intracellulaire et de la variation de longueur des sarcomères....93
3- Mesure des *sparks* calciques....96
IV- Etude biochimique....97
a) *Western Blot*....97
✓ Extraction et dosage des protéines....97
✓ Dénaturation des protéines....98
✓ Immuno-détection....99
✓ Immuno-précipitation....99
b) Dosage biochimique....99

Résultats....101

Partie 1 : Effets chroniques du peptide natriurétique de type B sur cœurs sains....101

Évidences fonctionnelles d'un rôle actif du BNP sur le remodelage cardiaque et sur les arythmies....101

1- Introduction....101
2- Méthodologie....102
3- Article....103
4- Discussion et conclusion....104
✓ Le BNP induit une hypertrophie cardiaque et une désorganisation des mouvements calciques semblable à l'IC....104
✓ Le BNP en chronique crée un substrat pro-arythmogénique malgré l'absence de fibrose....104
✓ Le BNP en chronique active la voie β-adr....104
✓ L'inhibition de la voie β-adr empêche les effets délétères du BNP sur les altérations des mouvements calciques systoliques et diastoliques et les arythmies....105
✓ Implications cliniques....105
✓ Limites du modèle....106

Partie 2 : Caractérisation de la phase précoce du remodelage cardiaque des souris PMI 107

Progression précoce du remodelage cardiaque post-ischémique aux niveaux morpho-fonctionnel, électrophysiologique et du CEC 107

1- Introduction 107

2- Méthodologie 108

3- Résultats 109

- ✓ Dès J3, le cœur des PMI est hypertrophié, dilaté, avec une diminution de la contractilité 109
- ✓ La durée de l'intervalle QT est prolongée chez les PMI dès J3, la variabilité du rythme sinusale est réduite à J14 110
- ✓ Dès J3, le CEC est « renforcé » chez les PMI mais les altérations de la recapture du Ca^{2+} par le RS apparaissent dès J14 111
- ✓ Dès J3, le contenu du RS est augmenté chez les PMI et l'activité des RyR est altérée à J14 ... 111

4- Discussion 112

- ✓ Modifications post-opératoires 112
- ✓ L'hypertrophie cardiaque précède l'altération de la fonction des protéines du CEC chez les PMI 114
- ✓ Dès J3, les PMI présentent des altérations électrophysiologiques ventriculaires 114
- ✓ Passage de la compensation à la décompensation cardiaque 115
- ✓ La dérégulation des protéines du CEC semble corrélée avec l'augmentation du niveau plasmique de BNP et de l'activité du SN sympathique 115

5- Conclusion 116

Partie 3 : Caractérisation des effets chroniques du BNP sur les stades précoces du remodelage cardiaque des souris PMI 122

Effets chroniques du BNP sur le remodelage cardiaque post-ischémique: mouvements calciques, CEC et arythmies 122

1- Introduction 122

2- Méthodologie 123

3- Article 123

4- Discussion 124

- ✓ Le BNP réduit la performance contractile des cellules du VG 124
- ✓ Le BNP accélère l'altération de la fonction des canaux RyR au cours du remodelage post-ischémique 125
- ✓ Le BNP altère le recaptage diastolique du Ca^{2+} et augmente les arythmies 126
- ✓ Implications cliniques 126

5- Conclusion 127

Conclusion générale 128

Liste des figures **133**

Références bibliographiques **135**

ANNEXE **150**

Abréviations

- a.a.: acide aminé
- AC: adénylate cyclase
- AMPc: adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
- AngII: angiotensine II
- ANP: peptide natriurétique de type A
- BB: antagoniste β-adrénergique (β-bloqueur)
- BNP: peptide natriurétique de type B
- bpm: battement par minute
- CamKII: kinase Ca^{2+}/calmoduline-dépendante II
- CEC: couplage excitation-contraction
- CICR: *Ca^{2+}-induced Ca^{2+}-release*
- CNP: peptide natriurétique de type C
- CV: cardiovasculaire
- DAD: *delayed after depolarization* ou arythmie tardive après-dépolarisation
- DAG: diacylglycérol
- DC: débit cardiaque
- DPA: durée du potentiel d'action
- EAD: *early after depolarization* ou arythmie précoce après-dépolarisation
- ECG: électrocardiogramme
- ESV: extra-systole ventriculaire
- FC: fréquence cardiaque
- FE: fraction d'éjection
- FR: fraction de raccourcissement
- FV: fibrillation ventriculaire
- GC: guanylate cyclase
- GCp: guanylate cyclase particulaire
- GCs: guanylate cyclase soluble
- Gi: protéine G inhibitrice
- GMPc: guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
- Gs: protéine G stimulatrice
- IC: insuffisance cardiaque
- IP_3: inositol triphosphate
- IP_3R: récepteur à l'IP_3
- NAV: nœud auriculo-ventriculaire
- NE: norépinephrine
- NEP: néprilysine
- NO: oxyde nitrique
- NOS: NO synthase
- NP: peptide natriurétique
- NPR: récepteur des peptides natriurétiques
- NSA: nœud sino-atrial
- NYHA: *New York Heart Association classification*
- PA: potentiel d'action
- PDE: phosphodiestérase
- PKA: protéine kinase AMPc-dépendante
- PKG: protéine kinase GMPc-dépendante
- Po: probabilité d'ouverture

- PS: pression sanguine
- RS: réticulum sarcoplasmique
- SN: système nerveux
- SNO: S-nitrosylation
- SRAA: système rénine angiotensine aldostérone
- TdP: torsade-de-pointe
- TV: tachycardie ventriculaire
- ULC: unité de libération du Ca^{2+}
- VG: ventricule gauche
- β-adr: β-adrénergique

INTRODUCTION

A. ECG et couplage excitation-contraction

I- Activité électrique cardiaque

a) Automatisme cardiaque : genèse et mesure de l'activité électrique

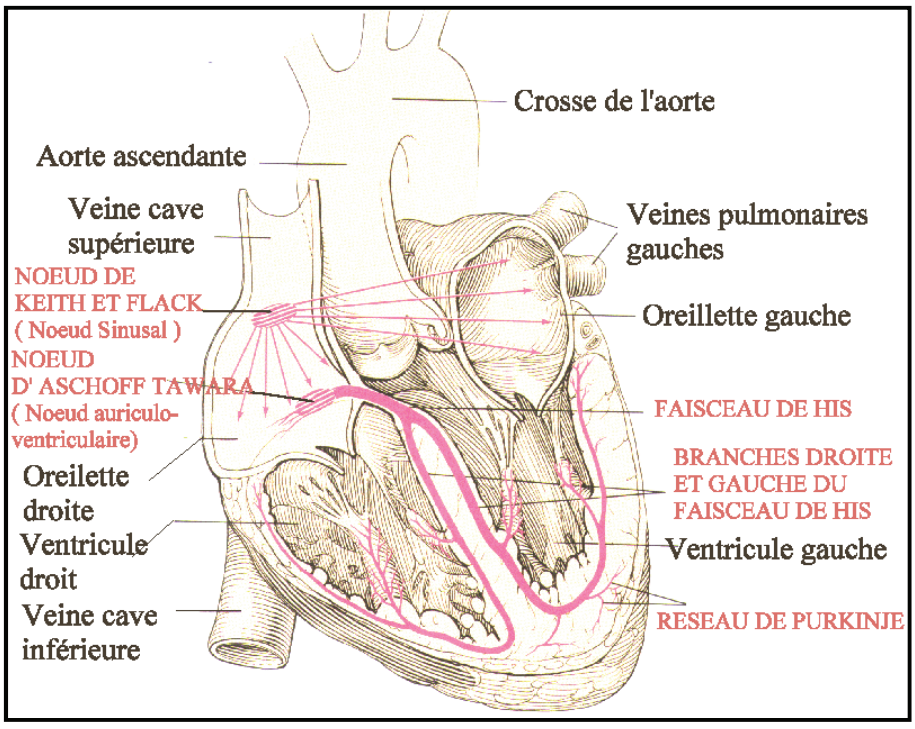


Figure 1 - Anatomie du cœur et du tissu de conduction.
(Ref: http://dossier.coeur.free.fr/conduction.php)

L'activité cardiaque synchronisée entre contraction (systole), relaxation et remplissage ventriculaire (diastole) est orchestrée par l'activité électrique qui est générée spontanément et propagée *via* le tissu de conduction (figure 1).(9,10) Ce tissu est composé principalement du :

1- **nœud sino-atrial (NSA) ou nœud de Keith et Flack :** c'est le **centre d'automatisme primaire** responsable de la génération de décharges spontanées à la fréquence de 60 à 100 par minute en conditions physiologiques chez l'Homme. Il est situé dans l'oreillette droite, près de l'arrivée de la veine cave supérieure. L'activité *pacemaker* du NSA est régulée par le système nerveux (SN) autonome et les catécholamines

2- **nœud auriculo-ventriculaire (NAV) ou nœud d'Aschoff-Tawara :** proche de la valve tricuspide et de la cloison inter-auriculaire à la base de l'oreillette droite, il ralentit l'influx électrique d'un dixième de seconde protégeant ainsi les ventricules d'un rythme primaire trop rapide

3- **faisceau de His :** il est situé sous l'angle d'insertion des valves tricuspides et fait la jonction entre le NAV et les ventricules par ses deux branches :

- branche droite : prolongement direct du faisceau de His, elle chemine le long du bord droit du septum interventriculaire se dispersant dans le ventricule droit
- branche gauche : elle chemine en avant et à gauche de la valve mitrale, se subdivise en faisceaux antérieur et postérieur, avec même quelquefois une branche septale.

Le faisceau de His est par ailleurs un **centre d'automatisme secondaire**, car s'il propage, certes, l'influx de l'étage auriculaire à l'étage ventriculaire, il est aussi capable de décharger spontanément des impulsions à fréquence de 40 à 60 par minute.

4- **réseau de Purkinje :** il s'agit de ramifications terminales des branches droite et gauche du faisceau de His qui s'étendent sur toute la musculature ventriculaire pour propager l'influx. C'est aussi un **centre d'automatisme tertiaire**, capable de décharger spontanément des impulsions à la fréquence de 20 à 40 par minute chez l'Homme.

L'activité électrique nait spontanément du NSA et se propage de cellule en cellule dans le myocarde auriculaire jusqu'à atteindre le NAV. A partir du NAV, la conduction devient filaire par le faisceau et les branches de His et le réseau de Purkinje qui se ramifie sous l'endocarde. Dans le myocarde ventriculaire, la conduction redevient de cellule en cellule à partir des cellules au contact des structures nerveuses conductrices.

Le cycle électrique est enregistré sous forme de l'électrocardiogramme (ECG). L'ECG désigne le tracé de l'activité électrique du myocarde mesuré par des électrodes d'enregistrement placées à la surface du corps. L'ECG, grâce à ses 12 dérivations (6 périphériques et 6 précordiales), permet d'avoir une idée tridimensionnelle de l'activité électrique du cœur chez l'Homme. Je m'intéresserai tout particulièrement à la deuxième dérivation (DII), seule dérivation mesurable sur notre modèle d'étude (la souris). La DII permet une mesure bipolaire entre le bras droit où l'on place l'électrode négative et la jambe gauche, emplacement de l'électrode positive. L'onde de base est soit positive, la propagation de l'activité électrique se fait en direction de l'électrode positive ; soit négative, l'activité électrique se dirige alors dans le sens opposé ; soit isoélectrique, zone de transition ou d'inactivité. Chaque déflexion de l'onde de base est caractérisée par : i) sa durée, qui dépend des caractéristiques conductrices des cel-

lules ; ii) son amplitude, qui résulte de la quantité de matière stimulée et traversée ; et iii) son sens, direction prédominante du courant.

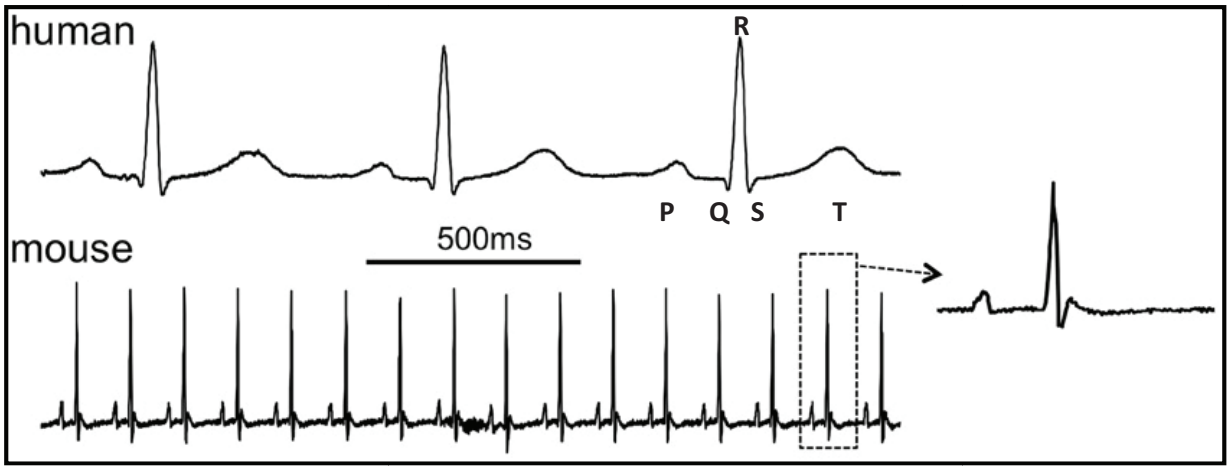


Figure 2 - Illustration d'un ECG enregistré en dérivation DII chez l'Homme et la souris.(11)

L'ECG en DII reconnait 3 déflexions positives chez l'Homme: l'onde P, le complexe QRS et l'onde T (figure 2), suivie parfois de l'onde U. L'onde P reflète la dépolarisation atriale, l'intervalle PR la durée nécessaire pour que la dépolarisation atriale atteigne le NAV. Le complexe QRS représente l'arrivée de l'onde d'excitation du système de conduction dans les ventricules et la dépolarisation des cardiomyocytes ventriculaires. L'onde T correspond à la repolarisation ventriculaire et l'intervalle QT à la durée de dépolarisation et repolarisation ventriculaire. La durée des intervalles normaux chez l'Homme est : pour le PR de 0,12 à 0,20 s ; pour le complexe QRS < 0,10 s et pour l'intervalle QT < 0,38 s. Chez la souris, les intervalles sont évidemment plus rapides et l'onde T est négative et n'est pas très facilement identifiable (figure 2).

L'ECG permet aussi de mesurer la **fréquence cardiaque** (FC) qui est définie par le nombre d'intervalles QRS par unité de temps. La FC est égale à l'inverse de l'intervalle R-R (multiplié par 60, pour être exprimée en nombre de battements par minute, bpm). La FC décrit la fréquence du cycle cardiaque formé de deux phases: systole et diastole. Elle reflète non seulement l'état du système cardiovasculaire (CV), mais elle est aussi un bon indicateur de l'activité du SN autonome (sympathique et parasympathique/vagale) et, plus globalement, du métabolisme cardiaque. La FC dépend ainsi de plusieurs facteurs comme la condition physique, le statut psychologique, l'alimentation, les médicaments, et l'interaction entre la génétique et l'environnement.

La FC est un critère important à considérer puisque qu'elle influence la durée et la qualité de vie de l'individu. Au sein du groupe des mammifères, la FC dépend du poids moyen de l'espèce et elle influence la durée de vie de l'animale.(12) En effet, chez les mammifères homéothermes, il existe des variations énormes de la FC, allant de 30 - 35 bpm chez les grands animaux comme l'éléphant, à 600 - 700 bpm chez la souris. D'autres exemples sont illustrés dans le tableau 1.

Mammifère	Poids corporel (Kg)	Fréquence cardiaque (bpm)
Souris	0,027	723
Chien	25	133
Homme	66	80
Chameau	545	49
Éléphant	3437	35

Tableau 1 - Poids corporel et fréquence cardiaque de quelques mammifères.(12)

De plus, la durée de vie des mammifères est inversement proportionnelle à la FC, à l'exception de l'Homme (figure 3). La corrélation entre FC élevée et diminution de la durée de vie de l'espèce peut être expliquée par un taux métabolique élevé des espèces de petite taille, associé à un ratio surface sur poids du corps élevé, pour maintenir la thermostasie chez ces mammifères.

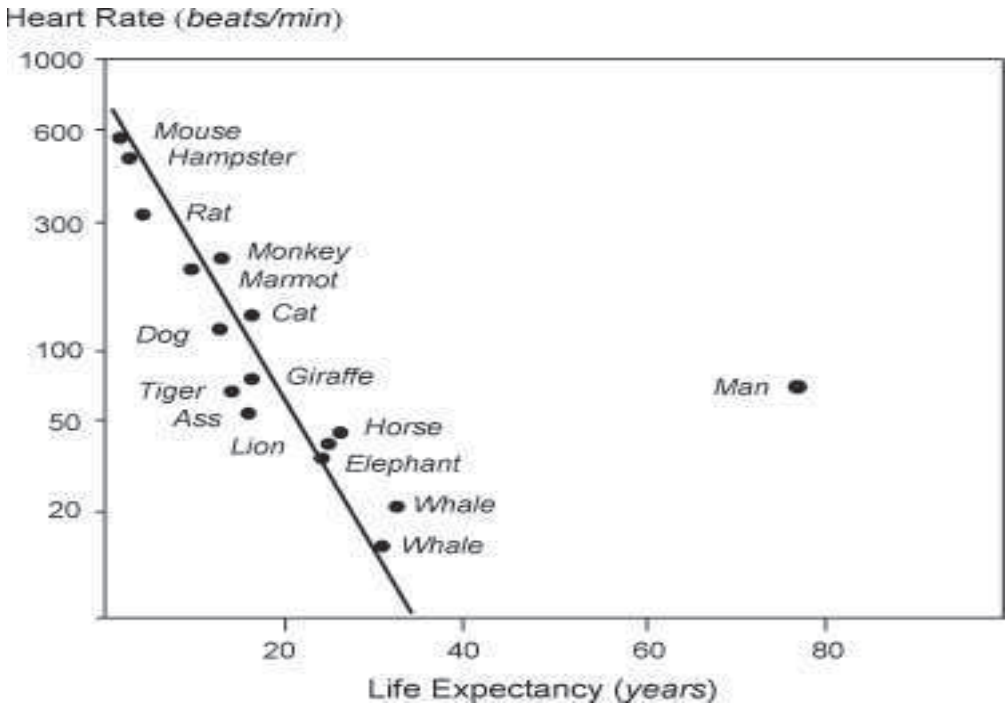


Figure 3 – Relation entre la fréquence cardiaque (*Heart rate*) et la durée de vie (*Life expectancy*) des mammifères.(13)

L'Homme est placé à l'écart dans la courbe de la figure 3 et son espérance de vie ne suit pas la loi "animale"; ceci probablement grâce à l'amélioration de l'hygiène de vie, la prévention des pathologies, aux progrès de la médecine et des traitements, qui ont prolongé la durée de vie de l'Homme (70-80 ans au lieu de 30 ans). Mais la corrélation négative entre la FC et la durée de vie est valable aussi au sein de l'espèce humaine. Une FC élevée est généralement associée à un risque d'hypertension, d'athérosclérose, de mortalité CV ou une mort subite cardiaque élevé. Ces pathologies augmentent les risques de morbidité et de mortalité et donc réduisent l'espérance de vie des patients.(13)

b) Électrophysiologie cellulaire chez les mammifères

Le développement des ECG par le prix Nobel néerlandais Willem Einthoven en 1895 a marqué le début du développement de l'électrophysiologie cardiaque.(14) Une découverte cruciale dans ce domaine a également été celle de l'électrophysiologie cellulaire. Edouard Corabœuf et Silvio Weidmann étaient les pionniers de l'électrophysiologie cellulaire cardiaque. Ils étaient les premiers à enregistrer le PA au niveau intracellulaire des ventricules cardiaques, en 1949. Pour cela, ils ont utilisé des microélectrodes intracellulaires sur des tissus de ventricules. (Coraboeuf E., Weidmann S. *(1949) Potentiels d'action du muscle obtenus à l'aide de microélectrodes intracellulaires. Présence d'une inversion de potentiel. C.R. Soc. Biol. 143:1360*). En 1953, **Edouard Cora-**



Photo d'Edouard Corabœuf

bœuf a décrit les anomalies de l'électrophysiologie cellulaire cardiaque : les EAD (*Early After Depolarizations*), associées aux arythmies de torsade-de-pointes (TdP).

La technique de ***patch-clamp*** appliquée sur cellule unique a été découverte plus tard, en 1981.(15) Cette dernière technique a permis d'affiner la compréhension des mécanismes fondamentaux à la base du cycle électrique cardiaque. Il s'agit de flux ioniques transmembranaires générés *via* des "transporteurs" ioniques tels que des canaux, des échangeurs et des pompes. Les courants électriques membranaires engendrés sont responsables du potentiel membranaire des cellules. Sur un tissu spécifique, la distribution d'un large éventail de transporteurs membranaires détermine la forme du potentiel d'action (PA) et sa propagation dans le cœur. Ainsi, les ondes QRS et T observées en ECG correspondent à la somme des PA déclenchés, propagés et repolarisés au niveau des cellules ventriculaires. A savoir, la forme et la durée du PA varient d'un tissu cardiaque à un autre comme marqué dans la figure 4a.

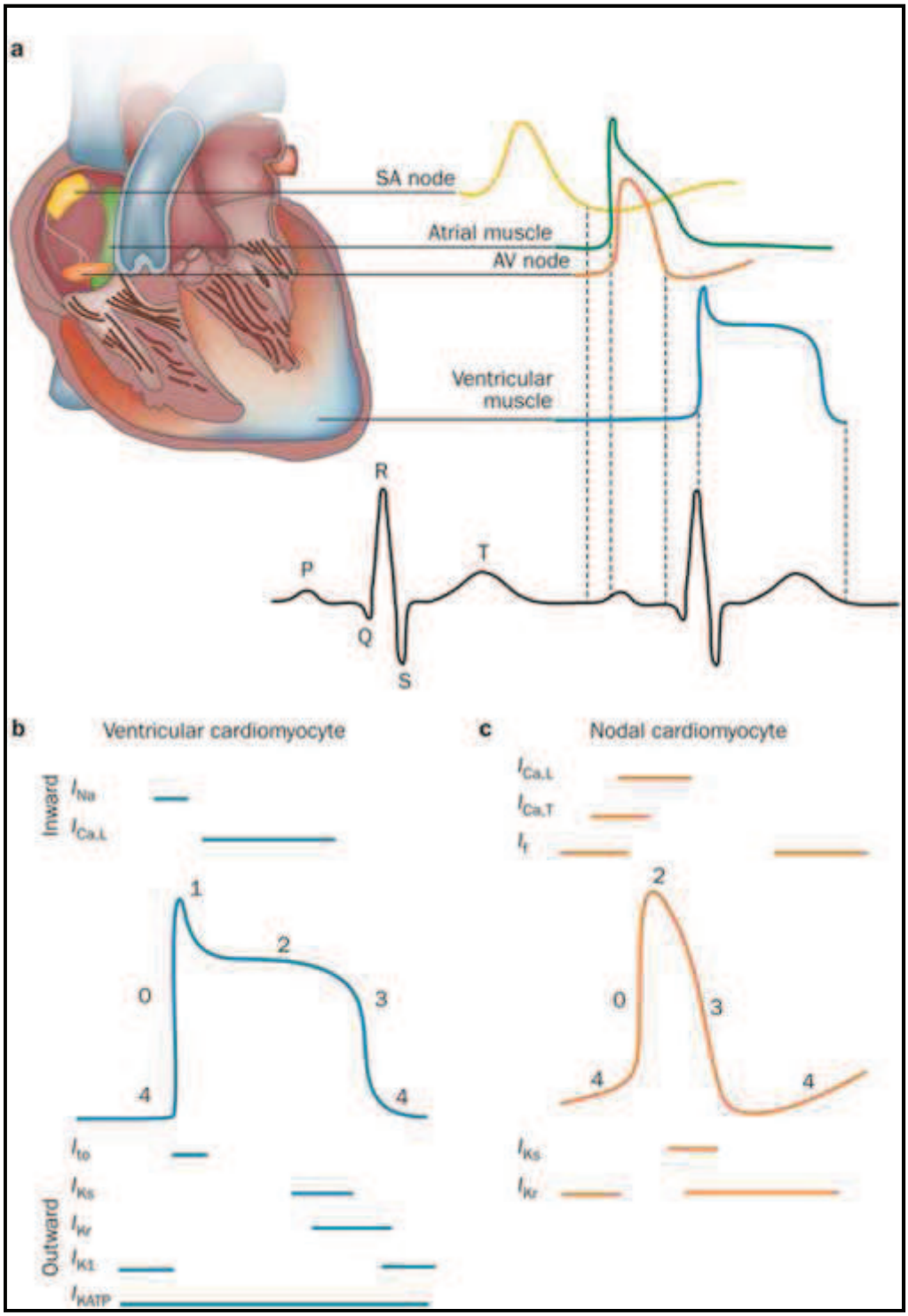


Figure 4- Activité électrique cardiaque en conditions physiologiques *in vivo* (a), au niveau des cellules ventriculaires (b) et nodales (c).(16)

Par convention, un PA cellulaire comprend 4 phases. Chacune des phases est le résultat de la mise en jeu d'une population de canaux ioniques qui génèrent à chaque fois un courant électrique transporté par l'espèce ionique concernée.(16,17) Nous allons par la suite comparer les 4 phases du PA dans les cellules *pacemaker* du NSA et dans les cardiomyocytes ventriculaires contractiles et les différences ioniques connues entre ces deux types cellulaires (figure 4b-c) :

➢ Phase 4 : elle correspond à l'intervalle diastolique situé entre les PA. Le potentiel de repos membranaire est négatif par rapport au milieu extracellulaire. Il est de ≈-90 mV dans les cardiomyocytes ventriculaires et de ≈-60 mV dans les cellules *pacemaker* du NSA. Ceci rend la phase 4 stable dans les cellules contractiles ventriculaires, mais dynamique dans les cellules du NSA, présentant une phase de dépolarisation diastolique lente à l'origine du déclenchement automatique du PA suivant. La phase de dépolarisation lente dépend de plusieurs mécanismes ioniques: un courant de fond net entrant I_{bg} (bg = *background*), un courant entrant non spécifique activé en hyperpolarisation I_f (f = *funny*) appelé aussi courant de *pacemaker*, un courant I_{NCX} déclenché par l'activité électrogénique de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} activé par le transitoire calcique intracellulaire et un courant Ca^{2+} de type transitoire I_{CaT} (T = *transient*). La phase 4 est maintenue à un potentiel stable dans les cardiomyocytes ventriculaires par l'activité du courant K^+ rectifiant entrant I_{K1} principalement.

➢ Phase 0 : phase de dépolarisation rapide de la membrane déclenchée par un courant Na^+ entrant voltage-dépendant (I_{Na}) dans les cardiomyocytes ventriculaires. I_{Na} est un courant de courte durée et d'amplitude élevée qui s'active à partir d'un potentiel de -60 mV et s'inactive à +40 mV. Mais les cellules du *pacemaker* étant moins dépolarisées, les canaux Na^+ sont absents ou inactivés, la dépolarisation ou phase ascendante systolique est principalement déclenchée par un courant Ca^{2+} entrant I_{CaL} (L = *long lasting*). La repolarisation est indispensable pour réactiver les canaux Na^+ et Ca^{2+} qui passent d'un état inactivé à un état fermé. C'est la période réfractaire pendant laquelle la cellule est incapable de produire un deuxième PA. La période réfractaire protège la cellule de dépolarisations précoces (EAD) et détermine la propagation unidirectionnelle du PA.

➢ Phase 1 : la majorité des canaux Na^+ sont inactivés et un courant K^+ sortant transitoire I_{to} (to = *transient outward*) est activé. Le courant I_{to} est responsable de la repolarisation précoce dite *notch* dans les cardiomyocytes ventriculaires et détermine la durée du PA. La phase 1 est absente dans les cellules *pacemaker*.

➢ Phase 2 : le plateau du PA est marqué par de faibles mouvements ioniques dont le courant I_{CaL} et une résistivité membranaire élevée, de très petits mouvements ioniques peuvent avoir de grands effets sur le potentiel membranaire. Le plateau n'existe pas dans les cellules *pacemaker*.

➢ Phase 3 : la repolarisation du PA a lieu lorsque le courant K^+ retardé est activé. Il comprend deux composantes: une dite rapide I_{Kr} (r = *rapid*) et une dite lente I_{Ks} (s = *slow*).

Comparaison Homme et souris

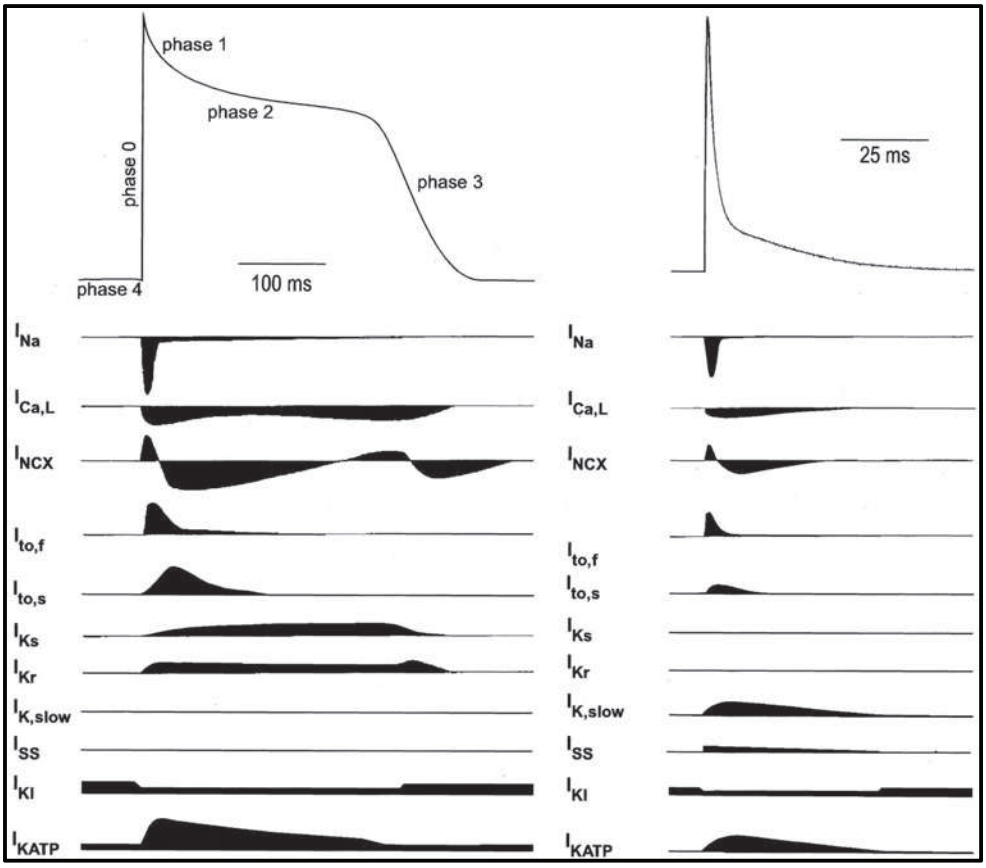


Figure 5 - Comparaison des potentiels d'action et des courants ioniques de base dans le cardiomyocyte ventriculaire de l'Homme (gauche) et de la souris (droite).(17)

La forme du PA ne diffère pas seulement entre les différents types de cellules cardiaques, mais aussi entre les espèces. En effet, les différences entre ECG de l'Homme et de la souris (figure 2) sont associées à des différences au niveau de l'électrophysiologie cellulaire de ces deux espèces. La figure 5 montre les signaux de PA enregistrés sur des cardiomyocytes ventriculaires d'Homme et de souris adultes. Le plateau est court chez la souris et relativement long chez l'Homme. Ceci est dû à la différence des courants ioniques repolarisants, principalement les courants potassiques, qui sont I_{Kr} et I_{Ks} chez l'Homme, et I_{Kslow} et I_{ss} chez la souris ainsi qu'à la base moléculaire des canaux ioniques sous-jacents.(17) Le raccourcissement de la durée du PA (DPA) chez la souris peut expliquer, au moins en partie, l'accélération de la FC par rapport à l'Homme. A noter que même si la souris, facilement manipulable, est utilisée comme un modèle d'étude de différentes pathologies cardiaques humaines, il faut prendre ses précautions dans les analyses et les comparaisons faites avec l'Homme du fait des variations électrophysiologiques notées entre ces deux espèces. Mais la souris reste un bon modèle pour les études faites aux niveaux cellulaire et moléculaire, notamment au niveau des mouvements calciques intracellulaires et du couplage excitation-contraction (CEC).

II- De la dépolarisation à la contraction: couplage excitation-contraction (CEC)

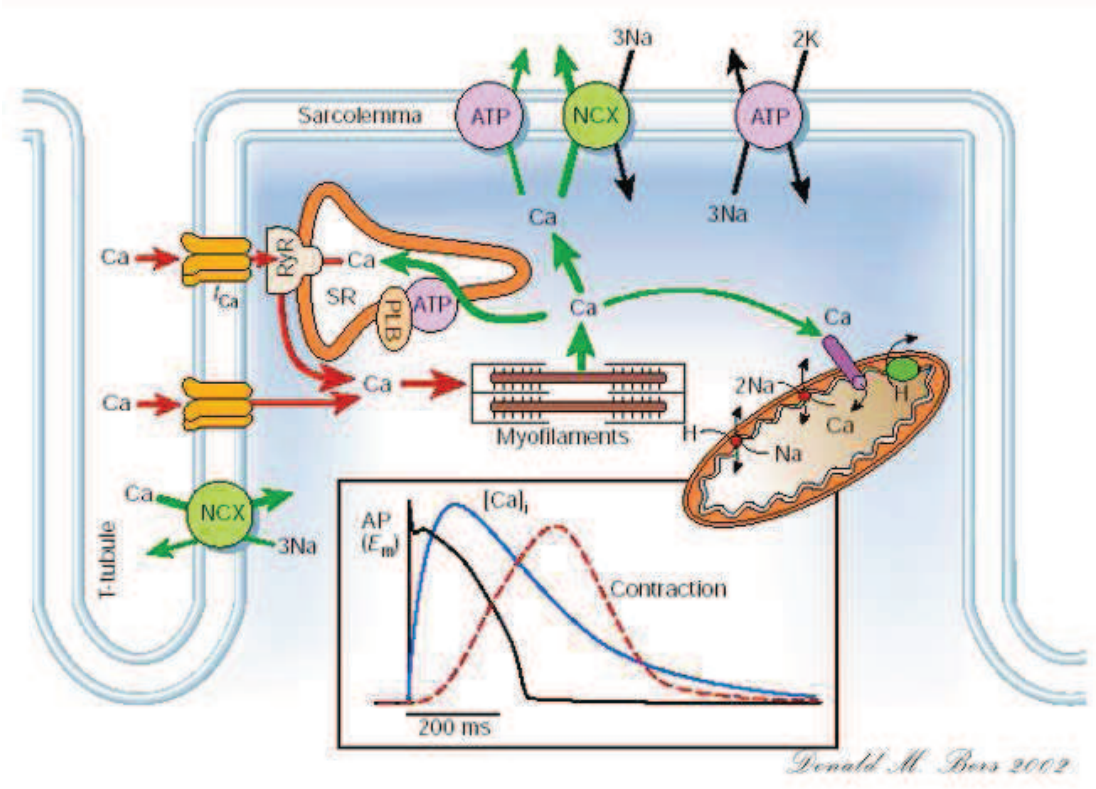


Figure 6 - Couplage excitation – contraction dans les cardiomyocytes ventriculaires.(18)

Un rôle crucial du Ca^{2+} dans la contraction musculaire a été démontré un siècle auparavant par Ringer (1883), lorsqu'il observe que le cœur de grenouille ne se contracte pas en absence de Ca^{2+} extracellulaire. L'ion Ca^{2+} joue le rôle central dans le CEC.

Le CEC est un mécanisme fondamental, caractéristique des cellules contractiles musculaires squelettiques et cardiaques.(18–20) Il désigne l'ensemble des processus qui assurent la transformation du stimulus électrique (PA) en un signal intracellulaire permettant d'activer la contraction des myocytes. La dépolarisation membranaire conduit à l'ouverture des canaux calciques de type L (LTCC = *L-type Ca^{2+} channels*, appelés aussi récepteurs des dihydropyridines, DHPR), situés essentiellement sur des invaginations membranaires appelées tubules transverses (ou **tubules T**). La structure organisée des tubules T est cruciale pour un CEC et une fonction cardiaque normaux. Cette entrée calcique se fait au cours de la phase 2 (plateau) du PA par le courant I_{CaL} (figure 4). L'entrée de Ca^{2+} qui en résulte est insuffisante pour déclencher la contraction dans les cardiomyocytes. Elle est cependant nécessaire pour activer l'ouverture du canal calcique du réticulum sarcoplasmique (RS), le récepteur de la ryanodine

(RyR), selon un mécanisme d'auto-libération appelé **CICR** (***Ca^{2+}-induced Ca^{2+}-release***). Les canaux RyR sont situés en face des canaux LTCC. C'est dans ces zones que naissent des étincelles de Ca^{2+} très localisées dites ***sparks*** **calciques**, éléments élémentaires de la sortie de Ca^{2+} des réservoirs du RS. Le CICR entraîne alors une libération des stocks calciques intracellulaires (**transitoires calciques**). Ainsi, la concentration du Ca^{2+} cytoplasmique passe localement d'une valeur de repos de ≈100 nM à 1 µM, concentration suffisante pour activer les protéines contractiles et la contraction musculaire. La quantité de Ca^{2+} libérée par le RS pendant un cycle cardiaque dépend de l'activité des LTCC, de la sensibilité des RyR au Ca^{2+} et du contenu calcique du RS. L'amplitude du transitoire calcique généré par la libération de Ca^{2+} par le RS détermine la force de contraction des cardiomyocytes lorsque le Ca^{2+} se fixe sur les protéines contractiles.

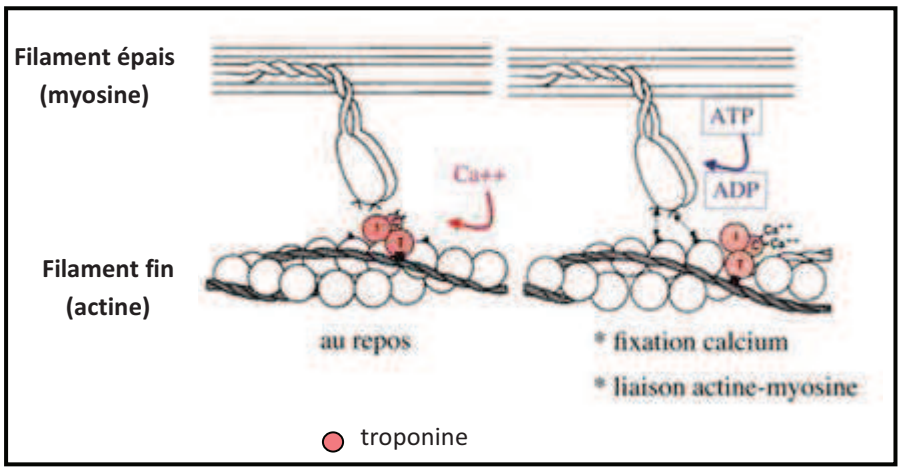


Figure 7 - Activation des ponts actine – myosine des sarcomères par le Ca^{2+} cytosolique.
(Ref: http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie)

Au niveau des protéines contractiles des cellules musculaires, l'ion Ca^{2+} libre se fixe sur la troponine C de l'actine (figure 7). En l'absence de Ca^{2+}, la troponine I interagit avec la tropomyosine pour empêcher l'actine d'interagir avec la myosine. Une fois le Ca^{2+} lié à la troponine C, un changement conformationnel des protéines du complexe troponine I – tropomyosine apparaît. Des ponts se forment entre l'actine et la myosine permettant le glissement des filaments épais sur les filaments fins, ceci engendre le raccourcissement des sarcomères et la contraction cellulaire. L'énergie de la contraction est produite par le clivage de l'ATP par les sites ATPasiques de la myosine en présence de Mg^{2+}.

La relaxation se produit lorsque le Ca^{2+} est libéré par la troponine C. La majeure partie du Ca^{2+} est recaptée dans le RS par des pompes calciques SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase*). Les SERCA assurent un transport actif de Ca^{2+} vers la lumière du RS. La séquestration du Ca^{2+} dans le RS s'effectue par différentes protéines (calséquestrine, calréti-

culine, sarluménine) qui jouent le rôle de chélateur de Ca^{2+}. Le Ca^{2+} peut également être extrudé par l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) ou par la Ca^{2+}-ATPase de la membrane plasmique. En conditions physiologiques, NCX élimine la même quantité de Ca^{2+} initialement entrée dans la cellule à travers les canaux LTCC pour maintenir la balance calcique.(21)

a) Structures moléculaires du CEC et régulations post-translationnelles

✓ Les canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCC)

Structure

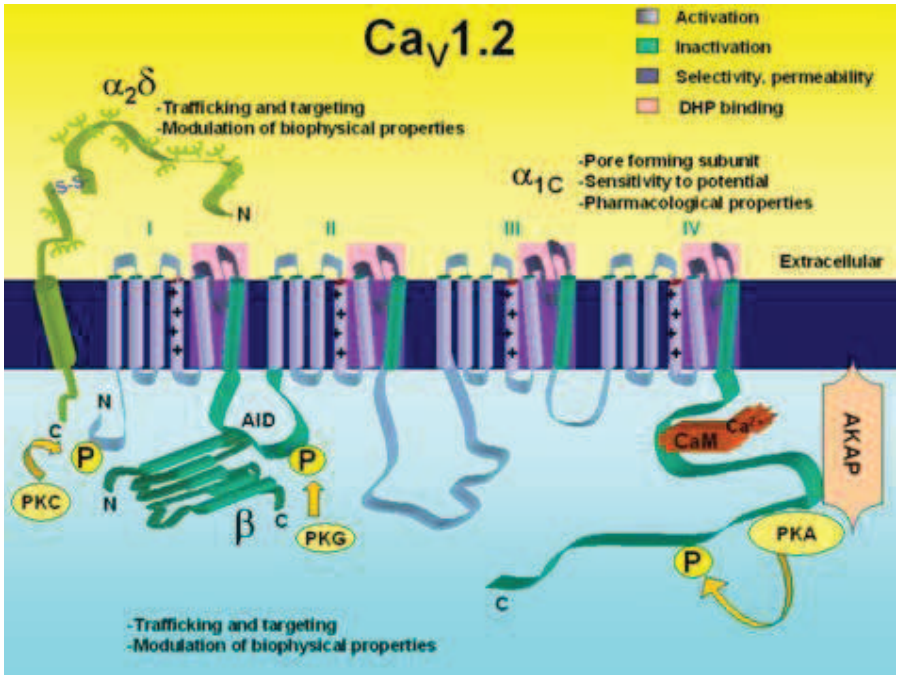


Figure 1 - Structure moléculaire du canal calcique voltage-dépendant de type L (LTCC) des cardiomyocytes ventriculaires adultes. (Ref : http://shiels.lab.ls.manchester.ac.uk/research/mammaliancardiomyocytes/)

Les canaux calciques voltage-dépendants (CaV) convertissent les signaux électriques en influx calcique pour déclencher des réponses biologiques dans les cellules excitables, comme la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, la plasticité synaptique ou encore l'expression de gènes.(22) Les CaV sont des complexes protéiques formés de plusieurs sous-unités (figure 8):

- Sous-unité α1 : formant le pore de perméabilité. Il existe 7 types de sous-unités α1 codés par des gènes différents (CaV1.1 – CaV1.4 et CaV2.1 – CaV2.3). En conditions physiologiques, les cardiomyocytes ventriculaires adultes expriment la sous-unité CaV1.2 α1C seulement. La sous-unité α1C du LTCC comprend 4 domaines homologues (DI – DIV) formés chacun de 6 segments transmembranaires (S1 – S6) reliés par des boucles intracellulaires et ayant des terminaisons N et C cytosoliques. Les segments S1 – S4 de chaque domaine comprennent le senseur de voltage et les 4 segments S5 – S6 forment le pore du canal et contiennent le filtre de sélectivité.

- Sous-unité auxiliaire β : il existe 4 sous-unités différentes de CaVβ (β1 – β4). Dans les cœurs de chiens adultes, les 4 sous-unités de β sont exprimées mais seule l'expression de la sous-unité β2 est détectée chez la souris. Pour CaV1.2, la sous-unité β se lie à la boucle située entre les domaines I et II de α1C et produit une modulation fonctionnelle spécifique. CaVβ prévient l'hydrolyse des sous-unités CaVα1 par les protéasomes, induisant une augmentation de son adressage membranaire. De plus, CaVβ régule des propriétés intrinsèques du canal, comme l'augmentation de sa probabilité d'ouverture (Po), la modification de la sensibilité pharmacologique du canal aux dihydropyridines et la génération de courants de cinétique d'activation et d'inactivation très lents.

- Sous-unités auxiliaires α2δ et γ : le rôle des 4 sous-unités α2δ et des 8 sous-unités γ reste à déterminer. Les sous-unités α2δ semblent contribuer à l'adressage de CaVα1 à la membrane. Elles augmentent l'amplitude des courants calciques. Quant aux sous-unités γ, leur participation fonctionnelle au complexe canalaire reste à définir.

- Calmoduline (CaM) : les LTCC subissent une rétroaction positive et une négative modulées par les ions Ca^{2+} dites facilitation et inactivation Ca^{2+}-dépendantes respectivement. La CaM est le senseur calcique responsable de ces 2 types de rétroaction. De plus, la CaM liée à α1C est nécessaire pour son adressage membranaire.(23)

Propriétés biophysiques : activation, facilitation, inactivation et fermeture du canal LTCC

Au repos, la différence de concentration en Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane plasmique est 10 000 fois supérieure à l'extérieur par rapport au milieu intracellulaire ($[Ca^{2+}]$ = 1,5 mM à l'extérieur de la cellule et 0,1 µM dans le cytosol). Ce gradient chimique permet l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux LTCC.

Mais l'**activation** de ce canal est une propriété intrinsèque à la sous-unité α1C, grâce au segment S4 dont le déplacement des charges suite à la dépolarisation membranaire induit le changement conformationnel nécessaire à son ouverture. I_{CaL} est donc un courant voltage-dépendant entrant qui s'active rapidement à partir d'un potentiel de l'ordre de -40 mV, atteint son pic entre 0 et +10 mV, potentiels rappelant le plateau du PA et tend à s'inverser entre +60 et +70 mV.

L'activité du canal unitaire LTCC bascule entre différents modes d'ouverture : le Mode 0 avec une très faible Po, le Mode 1 (ou mode de base) avec des ouvertures de courtes durées et une Po plus importante et le Mode 2 avec une Po élevée et des ouvertures de longue durée. Le

passage du Mode de base au Mode 2, dit **facilitation**, est favorisé par une augmentation de la fréquence de stimulation ou de la FC, par la phosphorylation du canal par des protéines kinases (PKA : *protein kinase cAMP-dependent* et CamKII : *Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II*), des agonistes, les sous-unités du canal et/ou une dépolarisation importante. La facilitation permet une augmentation de l'amplitude et du temps d'**inactivation** du courant. Ceci peut faciliter la relation de force-fréquence (RFF) dans plusieurs types cellulaires cardiaques.

Le passage de l'état ouvert à l'état inactivé du canal LTCC au cours du temps dépend de deux paramètres : le voltage et le Ca^{2+} lui-même. Ainsi l'inactivation du courant I_{CaL} s'effectue avec deux cinétiques différentes : l'une rapide (3 à 7 ms) dépendante du Ca^{2+} et l'autre lente (30 à 80 ms) dépendante du voltage. La modulation des cinétiques d'inactivation conditionne, non seulement la quantité de Ca^{2+} qui entre dans la cellule à chaque cycle, mais aussi la DPA, et donc la cascade de tout le CEC. Et réciproquement, l'inactivation étant dépendante du Ca^{2+}, toute modification du cycle du Ca^{2+} et/ou de l'homéostasie calcique intracellulaire est susceptible de modifier les cinétiques d'I_{CaL}.

La transition d'un état inactivé à réactivé nécessite le passage par un état fermé du canal pendant la phase de repos. L'accélération de cette transition peut induire une instabilité du potentiel membranaire au cours de la phase de repolarisation du PA, capable d'initier des événements de TdP.(24,25)

✓ Les récepteurs à la ryanodine (RyR)

Structure et fonction

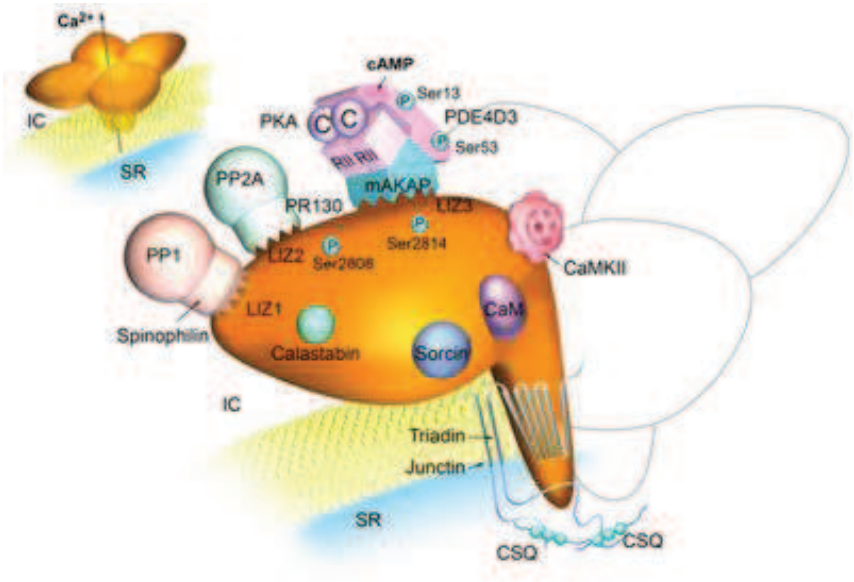


Figure 1 - Représentation schématique du complexe macromoléculaire formé du RyR2 et de ses protéines associées. (Ref: http://www.markslab.columbia.edu/marks_bio.html)

La libération intracellulaire du Ca^{2+} au cours du CEC s'effectue par les canaux RyR. Ces protéines ont été identifiées et isolées grâce à un alcaloïde végétal neutre : la ryanodine. La ryanodine stimule l'ouverture des canaux RyR lorsqu'elle est utilisée à des concentrations de l'ordre de la nM, et les inhibe à de plus fortes concentrations (µM). Les RyR existent sous 3 isoformes : RyR2 est exprimé dans le cœur et les muscles lisses, RyR1 est présent essentiellement dans les muscles squelettiques, RyR3 dans le cerveau, certains muscles lisses et les cellules non musculaires.(14)

RyR2 est un homotétramère et constitue le plus gros canal ionique connu (565 kDa par sous-unité). Chaque monomère possède une grande partie N-terminale cytoplasmique appelée « pied », 4 segments transmembranaires et une extrémité C-terminale qui forme le pore du canal. Ce canal forme un complexe macromoléculaire par ses multiples interactions dans la région du pied avec des protéines régulatrices (figure 9).

Au niveau luminal, RyR2 est relié à la triadine, la jonctine et la caluménine. Ces protéines sont sensibles au contenu calcique du RS, principalement par leur interaction avec la calséquestrine (CSQ) qui influe l'ouverture du canal.

Au niveau du pied, RyR2 interagit avec différentes protéines régulatrices : la FKBP12.6 (ou calstabine 2), la calmoduline (CaM), la sorcine, la S100A1, la protéine d'ancrage mAKAP qui lie la PKA et la phosphodiestérase PDE4D3 au canal RyR2, la CamKII, les phosphatases de type 1 (PP1) et 2A (PP2A) liées au RyR2 par leurs protéines d'ancrage respectives la spinophiline et la PR130. Ces protéines régulent la stabilité de RyR2, sa sensibilité au Ca^{2+} et sa Po. La Po des RyR2 dépend aussi d'autres facteurs endogènes comme les ions Mg^{2+}, l'ATP et l'ADP-ribose cyclique, le pH et le statut rédox.(27)

Les libérations calciques des RyR2: sparks, waves et transitoires calciques

Les *sparks* calciques sont des "étincelles" qui reflètent des libérations spontanées et localisées de Ca^{2+} par des unités de libération de Ca^{2+} (ULC). Chaque ULC est constituée d'un *cluster* de canaux RyR proches dans l'espace. Chaque *spark* peut être déclenchée par une ou plusieurs ULC. Une étincelle est confinée dans le temps (≈40 ms) et dans l'espace (≈2 µm de diamètre), atteignant un pic de concentration calcique de ≈300 nM. Les *sparks* calciques sont observés en microscopie confocale sur cellules quiescentes chargées par un indicateur calcique fluorescent de sensibilité élevée au Ca^{2+}, comme le fluo3 ou fluo4. Les mécanismes moléculaires des *sparks* calciques et la nature de déclenchement par l'entrée de Ca^{2+} restent obscurs. Plusieurs théories ont été proposées.

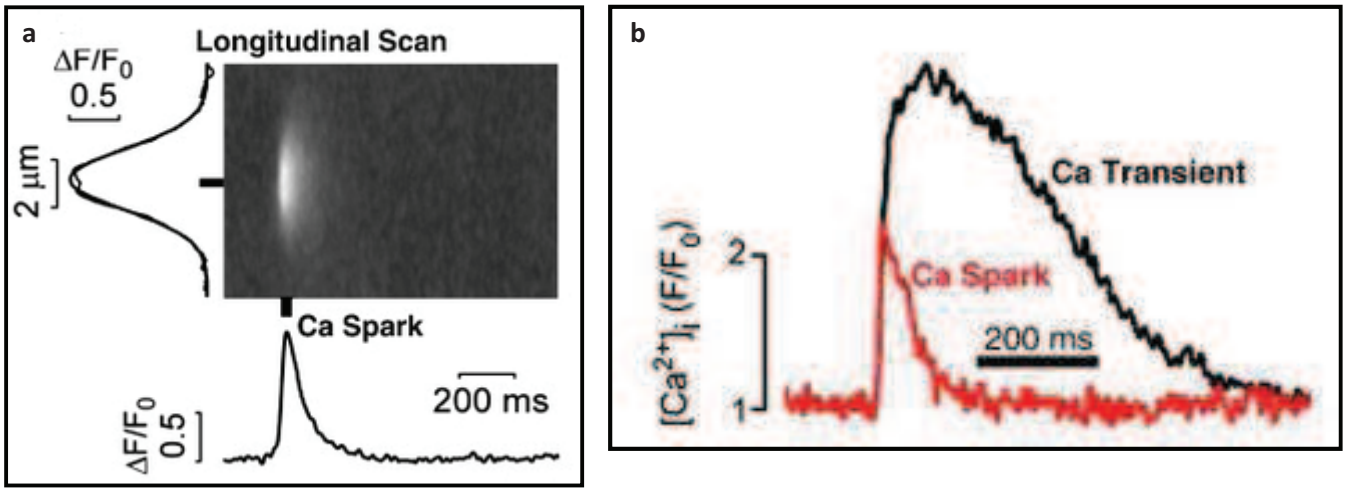


Figure 10 - a) Enregistrement d'un *spark* calcique en microscopie confocale, b) Mesure simultanée d'un *spark* et d'un transitoire calcique.(20)

L'ouverture d'un canal LTCC unique peut être suffisante pour entrainer un *spark* calcique. Les *sparks* calciques sont alors à la base de la théorie de CICR. Cependant, ils peuvent également survenir sans activation des canaux LTCC (sur des cellules maintenues à un potentiel mem-

branaire de -80 mV ou sur des cellules où les LTCC sont bloqués pharmacologiquement à l'état fermé). L'occurrence des *sparks* calciques spontanés dépend de la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol et dans le RS. Lorsque la concentration de Ca^{2+} augmente dans le cytosol ou dans le RS, la sensibilité des canaux RyR va augmenter ainsi que leur Po.(28)

Le transitoire calcique est la sommation spatiale et temporelle des étincelles individuelles en réponse à une stimulation (figure 10b). C'est la libération de Ca^{2+} par des amas de canaux RyR séparés (par des ULC séparées) qui le constitue. L'amplitude du transitoire calcique est étroitement contrôlée par l'intensité et la durée du courant I_{CaL}, elle dépend aussi de la sensibilité des RyR au Ca^{2+} et elle est proportionnelle à la concentration du Ca^{2+} dans le RS.

Une vague calcique, dite aussi *Ca^{2+} wave*, peut survenir spontanément en cas de surcharge calcique du RS. Dans ce cas, des *sparks* calciques peuvent activer des ULC voisins, ceci va déclencher une activation synchronisée de *sparks* et former une *macrospark* ou *wave*. Ce mécanisme de *Ca^{2+}-induced spark activation* est favorisé par plusieurs facteurs, par exemple une augmentation de la durée et de l'amplitude des *sparks*, une augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol et dans le RS.(28)

La FKBP12.6 ou calstabine 2

Les FKBP (*FK506 binding proteins*) appartiennent à la superfamille des immunophilines, des protéines cibles des molécules immunosuppressives telles que la FK506 et la rapamycine. Les FKBP se distinguent par leur poids moléculaire. La FKBP12.6 est une enzyme à activité peptidyl-propyl-cis-trans-isomérase de 12,6 kDa. Une molécule de FKBP12.6 se fixe sur chaque monomère de RyR2 avec une forte affinité et une stœchiométrie de 1:1. Les mesures électrophysiologiques de l'activité des RyR2 montrent que l'interaction de la FKBP12.6 avec le RyR2 stabilise l'état fermé du canal ; sa dissociation augmente sa Po et induit des états de sous-conductance.(26) La FKBP12.6 est certainement la protéine régulatrice des RyR qui a suscité à ce jour le plus grand intérêt sur le plan mécanistique en raison de son rôle important en physiopathologie et de l'émergence des molécules ciblant cette interaction (Rycall par exemple).(29)

La phosphorylation de RyR2

La stimulation β-adrénergique (β-adr) entraine la phosphorylation du RyR2 par la PKA sur le site Ser2809 chez le chien et l'Homme (Ser2808 chez la souris), ceci conduit à la dissociation transitoire de la calstabine 2 et à l'activation du canal. C'est un effet adaptatif bénéfique, en

réponse à un stress, qui permet une meilleure performance du CEC. Cependant, une hyper-phosphorylation chronique du RyR2 par la PKA a un effet délétère qui maintient le canal dans un état de sous-conductance permanent (comme dans l'insuffisance cardiaque (IC)).

Le RyR2 peut également être phosphorylé sur la Ser2815 par la kinase CamKII (Ser2814 chez la souris) *via* une autre voie en aval de l'activation du récepteur β-adr. Alors que les effets de la phosphorylation de RyR2 par la PKA sur le CEC sont bien clairs, les effets de la phosphorylation de RyR2 CamKII-dépendante semblent contradictoires selon les études. Pereira et ses collaborateurs(30) ont montré que la phosphorylation de RyR2 par CamKII diminue l'amplitude des transitoires calciques consécutivement à une augmentation de la fréquence des *sparks* calciques en diastole et une diminution du contenu calcique du RS. Cependant, d'autres auteurs trouvent que la phosphorylation de RyR2 par la CamKII augmente la sensibilité de RyR2 au Ca^{2+}, le mécanisme de CICR, l'amplitude des transitoires calciques ainsi que la contractilité.(31,32) La phosphorylation de RyR2 par la CamKII induit alors un effet inotrope positif. Mais dans tous les cas, la phosphorylation de RyR2 par la CamKII semble augmenter la sensibilité du canal au Ca^{2+} et sa Po. Elle semble jouer un rôle important dans la régulation du CEC cardiaque lors de changements du rythme et serait impliquée dans le contrôle de la RFF. Certains auteurs lui accordent cependant un rôle possible au cours de l'IC.(33)

Les phosphatases et les phosphodiesterases permettent, respectivement, de déphosphoryler le canal et de réduire localement la concentration en AMPc et de réduire ainsi les effets des phosphorylations sur les RyR.

✓ L'ATPase calcique du RS (SERCA)

Structure et fonction

Lors de la relaxation, plus de 80% du Ca^{2+} systolique est recapté dans le RS, ce pourcentage pouvant atteindre plus de 90% dans les cardiomyocytes de rat. Les 10 à 20% restants sont extrudés de la cellule majoritairement par le NCX.(34)

Le recaptage du Ca^{2+} dans le RS s'effectue par les pompes SERCA. Les SERCA assurent le transport actif de Ca^{2+} vers la lumière du RS à raison de deux molécules par molécule d'ATP hydrolysée. Les SERCA sont des protéines d'un poids moléculaire de ≈100 kDa, caractérisées par dix hélices α dans le domaine transmembranaire. La région cytoplasmique comprend le domaine catalytique et le domaine de fixation de l'ATP. Il existe 12 isoformes codés par 3 gènes (SERCA 1, 2 et 3). Le gène SERCA2, exprimé dans le cœur code pour 3 isoformes : 2a,

2b et 2c. Dans les cardiomyocytes sains, la SERCA2a est la principale isoforme exprimée. La SERCA2a augmente la relaxation cardiaque en diminuant la concentration de Ca^{2+} cytosolique et régule la contraction en contrôlant la charge calcique du RS.(34)

La SERCA2a interagit avec différentes protéines luminales comme la HRC (*histidine-rich Ca^{2+} binding protein*) et la calréticuline, des protéines chaperonnes qui maintiennent l'homéostasie calcique du RS. Au niveau cytosolique, SERCA2a interagit avec la S100A1. De plus, l'activité de la SERCA2a est modulée par le phospholamban (PLB) et la sarcolipine qui, à l'état déphosphorylé, la relient dans son domaine cytosolique et/ou transmembranaire et inhibent son activité en diminuant son affinité pour le Ca^{2+}. Le rôle de la sarcolipine dans la physiologie cardiaque n'est pas encore bien clarifié mais des évidences suggèrent que son rôle est presque absent au niveau ventriculaire.(35)

Le phospholamban (PLB)

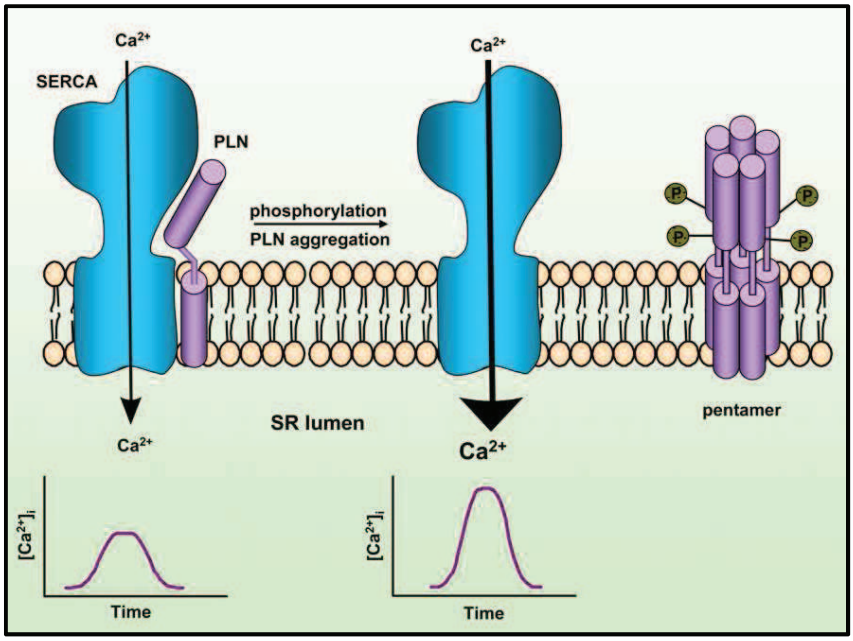


Figure 11 - Modélisation de la régulation fonctionnelle de la SERCA2a par le PLB.(34)

Le PLB est un homopentamère de 52 acides aminés. La phosphorylation de PLB relève son inhibition de la SERCA2a, l'activité de la SERCA2a s'accroit alors avec une vitesse de recaptage augmentée. Le PLB peut être phosphorylé sur 3 sites distincts : la Ser16 par la PKA et la PKG (protéine kinase GMPc-dépendante), la Thr17 par la CamKII et la Ser10 par la PKC. La stimulation β-adr peut aboutir à la phosphorylation en parallèle de la Ser16 et la Thr17 et induire une augmentation du taux de recaptage du Ca^{2+} par le RS et de l'activité de la SERCA2a. Mais le rôle physiologique de la phosphorylation de PLB par PKC et PKG n'est pas

encore bien déterminé sachant que les stimuli qui activent ces deux kinases *in vivo* n'augmentent pas la phosphorylation de PLB dans le cœur de cobaye par exemple. La phosphorylation de PLB est contrôlée par l'activité des phosphatases : la PP1 et la calcineurine.(36) Il est suggéré que le PLB lie et inhibe la SERCA sous forme monomérique. Mais à l'état phosphorylé, le PLB relève son inhibition de la SERCA et se pentamérise (figure 11). La surexpression de PLB est associée à une dépression de la fonction de la pompe SERCA, à une diminution de l'amplitude du transitoire calcique et à une diminution de la contractilité du ventricule gauche (VG).

- ✓ **L'échangeur NCX1**

Après la SERCA, l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) joue le rôle majeur dans l'élimination du Ca^{2+} cytosolique et le maintien de la balance calcique. Dans le ventricule du chien, du lapin et de l'Homme, après une stimulation, le Ca^{2+} est éliminé du cytosol à 70% par la SERCA, 28% par le NCX et 2% par l'uniport mitochondrial et la pompe Ca^{2+}-ATPasique de la membrane plasmique. Chez le rat et la souris, 92% du Ca^{2+} cytosolique est éliminé par la SERCA et 7% par le NCX. Le NCX intervient dans la régulation du gain du CEC en régulant le contenu calcique du RS et ainsi influence la contractilité, ceci à travers sa compétition avec la pompe SERCA pendant la diminution du transitoire calcique en diastole. Le NCX peut aussi réguler le CEC indépendamment du contenu du RS, en influençant la quantité de Ca^{2+} dans la dyade, au voisinage du canal LTCC situé au niveau du tubule T et des RyR du RS, cette quantité de Ca^{2+} qui conditionne la sensibilité des RyR et l'amplitude du transitoire calcique.

L'isoforme cardiaque de l'échangeur est NCX1. Les études biochimiques initiales ont suggéré que la protéine mature comprend 9 hélices transmembranaires, mais des approches récemment employées pour la détermination de la topologie de NCX1 montrent que cette protéine membranaire comprend, comme son analogue chez les procaryotes, 10 domaines transmembranaires.(37) Elle présente une large boucle cytoplasmique hydrophile entre la 5ème et la 6ème hélice contenant les sites de régulation de l'échangeur. Au niveau de la boucle, il existe un site de fixation de forte affinité pour le Ca^{2+}. La fixation du Ca^{2+} sur ce site induit un changement conformationnel de la protéine indispensable pour l'entrée ou la sortie du Ca^{2+}. Le NCX1 est alors activé par le Ca^{2+} intracellulaire mais inactivé par le Na^+ intracellulaire.

Le NCX1 peut échanger 3 molécules Na^+ contre 1 Ca^{2+}. NCX1 est donc électrogénique et induit un courant entrant de Na^+ (dépolarisant = sortie de Ca^{2+}) en mode *forward* et sortant (repolarisant = entrée de Ca^{2+}) en mode *reverse*. La durée du PA et la FC influencent le mode

d'action de NCX1. La prolongation de la DPA prolonge son activation en mode *reverse* à la fin de la phase de plateau, NCX1 va alors contribuer aux modifications du potentiel au cours du CEC. L'augmentation de la FC prolonge l'activation de NCX1 en mode *forward* pendant la diastole. L'activité de NCX1 peut également être régulée par la PKC, la PKA, la PP1, la PP2B, la mAKAP, l'ATP, le pH et la température. NCX1 joue un rôle important dans l'IC.(38–40)

- ✓ **La S100A1**

La S100A1 est une petite protéine (10,4 kDa) qui capte le Ca^{2+} par son domaine *EF-hand* et qui orchestre les flux calciques des différents compartiments intracellulaires. La S100A1 module ainsi différentes fonctions des cardiomyocytes, notamment la contractilité, l'excitabilité, le métabolisme et la survie. Elle est considérée comme un régulateur clé de la performance cardiaque aussi bien en systole qu'en diastole. La figure 12 résume les différentes localisations de la S100A1 dans un cardiomyocyte ventriculaire ainsi que les différentes fonctions régulatrices qu'elle exerce.(41)

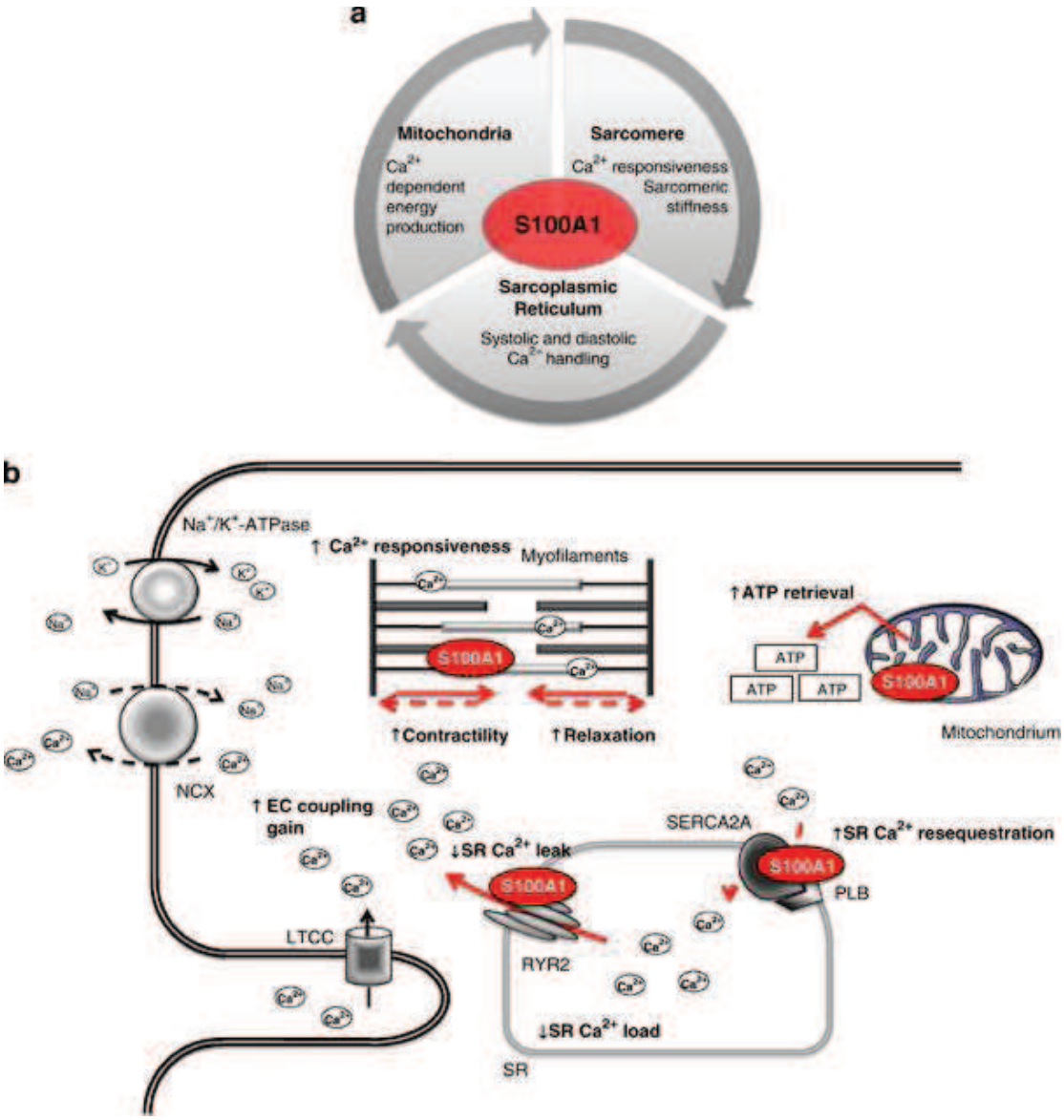


Figure 12 - a) Les effets de la S100A1 dans les différents compartiments d'un cardiomyocyte ventriculaire. b) Expression et interaction de la S100A1 avec différentes protéines cardiomyocytaires Ca^{2+}-dépendantes.(41)

Au niveau du RS, la S100A1 interagit à la fois avec la SERCA2a et avec le RyR2, les deux protéines régulatrices des échanges de Ca^{2+} entre RS et cytosol. La S100A1 interagit avec le complexe SERCA2a/PLB d'une façon Ca^{2+}-dépendante, augmentant ainsi l'activité de recaptage du Ca^{2+} dans le RS et sa charge calcique. Cette interaction semble indépendante de la liaison du PLB à la SERCA2a et de l'activité de PLB induite par sa phosphorylation. D'autre part, la S100A1 régule l'activité de RyR2 pendant la systole et la diastole. Voelkers et al., Cell Calcium, 2007 ont observé que les cardiomyocytes ventriculaires adultes de lapin surexprimant la S100A1 montrent une diminution de la fréquence et de l'amplitude des *sparks* calciques en période quiescente, et une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques systoliques. Cette dernière est le résultat de l'augmentation de l'activité des RyR2 et du recap-

tage par la SERCA2a. L'interaction S100A1/RyR2 semble indépendante de FKBP12.6 et de la sorcine. La S100A1 module alors positivement le CEC, et réduit les fuites calciques du RS en diastole.

Au niveau des myofilaments, la S100A1 interagit avec la titine d'une façon Ca^{2+}-dépendante. La titine est responsable du maintien de la tension passive des cardiomyocytes. Pendant la diastole, la titine agit avec l'actine pour garder la rigidité myocardique. L'interaction de la S100A1 avec la titine induit une inhibition de son interaction avec l'actine. Ceci peut réduire la tension passive avant la contraction et faciliter l'initiation de la contraction. La S100A1 contrôle alors la performance contractile diastolique indépendamment de l'activité du RS.

Au niveau mitochondrial, la S100A1 favorise la synthèse d'ATP et l'augmentation de la quantité d'ATP cytosolique. Mais le mécanisme précis par lequel la S100A1 augmente la production reste à déterminer.(41)

Certaines évidences montrent également que la S100A1 pourrait interagir et réguler l'activité de l'échangeur NCX d'une façon Ca^{2+}-dépendante.(39)

b) Régulation du couplage excitation-contraction

La fonction première du muscle cardiaque est de développer une force et de fournir un débit sanguin, qui s'adaptent de façon dynamique aux besoins de l'organisme. Au niveau ventriculaire, la force développée est modulée par trois paramètres principaux :

- ✓ le niveau de remplissage de la cavité myocardique avec une corrélation positive entre la pression (la force) et le volume de remplissage : c'est la relation de Frank-Starling. Il s'agit de la capacité des myofilaments contractiles du cœur à fournir une force de contraction plus importante suite à une augmentation de leur relâchement en diastole,
- ✓ la fréquence des cycles cardiaques : c'est la relation force-fréquence (RFF),
- ✓ la facilitation induite par l'activation des récepteurs β-adr.

Ces deux derniers points seront détaillés dans ce paragraphe.

✓ **Relation force-fréquence**

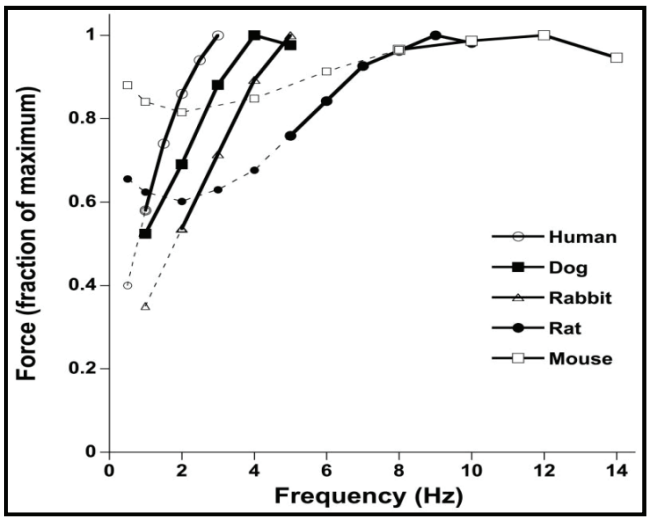


Figure 13 - Comparaison de la relation force-fréquence myocardique dans différentes espèces.(42)

La RFF a été initialement décrite en 1871 lorsque Henry Bowditch a observé que la force de contraction du cœur de grenouille augmente quand le cœur est stimulé à des fréquences croissantes. Dans le cœur des mammifères, la RFF est généralement positive, la force de contraction augmente avec la fréquence de stimulation (figure 13). La RFF est un régulateur intrinsèque important pour la contractilité cardiaque.

La FC de base ainsi que la gamme de fréquences atteintes *in vivo* varient beaucoup selon les espèces. L'accélération de la FC est prépondérante chez les grands mammifères et considérablement moins importante chez les petits animaux. Chez l'Homme adulte, la FC au repos est de ≈1 Hz (60 bpm) ; à l'exercice, elle peut atteindre 3 Hz (180 bpm), reflétant une augmentation de 200% par rapport à l'état de repos. Chez le lapin, la FC au repos est de ≈2,5 Hz et peut augmenter jusqu'à 5 Hz avec l'exercice, reflétant une augmentation de 100% seulement. Chez la souris l'augmentation de la FC est encore moindre, elle s'élève à ≈40% (augmentation de 10 jusqu'à 14 Hz). En conséquence, le gain en force de contraction en réponse à une augmentation de la FC est plus marqué chez les grands mammifères (figure 13). Le débit cardiaque (DC), qui dépend du volume sanguin diastolique et de la FC, peut augmenter de 6 à 10 fois suite à un exercice physique maximal par rapport au repos chez l'Homme, alors que chez la souris, son élévation reste modeste, pouvant à peine doubler.(42)

La relation entre la FC et la force de contraction du myocarde est principalement gérée par les mouvements calciques dans les cardiomyocytes.(43) La balance dynamique intégrée de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire est le régulateur majeur de la RFF. Elle est déterminée par la charge du RS en Ca^{2+}, le flux calcique à travers les LTCC et l'échangeur NCX. Lorsque

la FC augmente, l'amplitude des transitoires calciques augmente ainsi que la charge calcique du RS. En effet, l'augmentation du nombre de battements pendant une période de temps entraine une élévation du flux calcique à travers les LTCC. Cette augmentation de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule entraine une augmentation de la fonction de la pompe SERCA qui va transporter plus de Ca^{2+} dans le RS et amplifier sa charge. Ceci induit une augmentation du Ca^{2+} libéré du RS au cours des battements suivants et donc une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques. De plus, lorsque la quantité de Ca^{2+} qui entre dans la cellule augmente, l'activité de NCX augmente aussi pour extruder une plus grande quantité de Ca^{2+} et maintenir ce nouvel état d'équilibre. Celui-ci dépend alors des différents transporteurs calciques membranaires du CEC, surtout LTCC, SERCA2a, PLB et NCX1. L'expression et la fonction de ces différentes protéines étant dérégulées au cours de l'IC, ceci induit des altérations délétères pouvant aller jusqu'à l'inversion de la RFF dans les pathologies CV.

La différence de la RFF observée entre les différentes espèces de mammifères a été rapportée principalement à l'importance du rôle joué par la concentration de Na^{+} et la fonction de NCX1 dans le CEC. Contrairement à l'Homme, au chien et au lapin, dans le myocarde des petits mammifères à FC élevée (*e.g.* souris et rat), le PA est de courte durée, l'expression de NCX est faible et la concentration intracellulaire en Na^{+} est élevée.(40) Cette dernière condition fait que dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris et de rat, le NCX joue un rôle moindre sur l'entrée de Na^{+} pendant la dépolarisation, et par conséquent sur l'extrusion du Ca^{2+} en diastole.(44) Ceci résulte en un remplissage important du RS en diastole. Chez les grands animaux, l'activité de NCX est plus marquée et donc induit une déplétion du RS en diastole. Lorsque la FC augmente, l'augmentation de l'activité de la SERCA2a joue alors un rôle plus marqué et induit une augmentation plus importante du contenu du RS en diastole par rapport aux petits mammifères et une augmentation plus importante de la force de contraction en aval.

La RFF assure un mécanisme de survie naturel. En effet, elle est indispensable pour fournir le débit suffisant suite à une augmentation de la FC en réponse à une situation de lutte ou de fuite.

✓ Régulation β-adrénergique

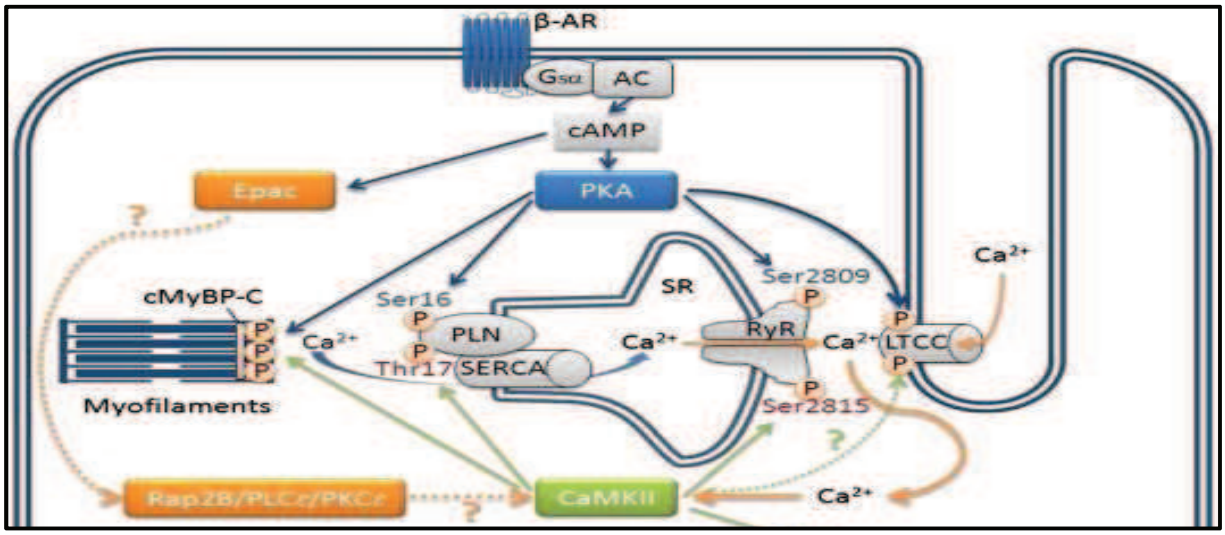


Figure 14 - Activation de la phosphorylation par PKA et CamKII en réponse à une stimulation β-adrénergique.(45)

Le CEC est modulé par de nombreux facteurs physiologiques qui impliquent, dans la majorité des cas, une cascade aboutissant à un état de phosphorylation. L'augmentation de la FC (le chronotropisme), de la contractilité (l'ionotropisme) et de la relaxation (le lusitropisme) cardiaques est régulièrement associée à la stimulation β-adr du SN sympathique essentiellement. Il est ainsi responsable de la réponse de lutte et de fuite qui augmente le DC. La fixation du ligand (naturel : la noradrénaline, dite aussi norépinephrine (NE) ; ou de synthèse : l'isoprénaline, dite aussi isoprotérénol) aux isoformes β1 et β2 du récepteur, majoritairement exprimés sur le myocarde sain, active une protéine G stimulatrice (Gs) sous-membranaire qui, après un changement conformationnel, active une adénylyl cyclase (AC). Il en résulte une production localisée du messager secondaire AMPc (adénosine monophosphate cyclique) qui stimule la cascade des différents acteurs du CEC *via* l'activation de la PKA et de la Cam-KII.(45)

La cascade β-AR/AMPc/PKA est bien étudiée. La PKA peut phosphoryler:

- le canal LTCC sur les sous-unités α et β et induire une augmentation de l'intensité du courant I_{CaL} et un déplacement de ses courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs
- le canal RyR2 et augmenter l'amplitude des transitoires calciques
- le PLB et augmenter la vitesse de recaptage et la charge du RS
- les protéines contractiles et augmenter leur sensibilité au Ca^{2+} et la force de stimulation.

Plus récemment, depuis une quinzaine d'années, des études ont mis en évidence l'implication des phosphorylations par CamKII dans la stimulation β-adr et ceci en conditions physiologiques et pathologiques.(46) La CamKII devient active suite à la fixation du Ca^{2+} à la calmoduline (CaM) et le couple Ca^{2+}/CaM se lie sur le site spécifique de la kinase. Ceci induit son autophosphorylation au niveau de la Thr286. L'activité de la CamKII pourrait être régulée indirectement par la PKA, en induisant l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire en aval de la stimulation du récepteur β-adr et en inhibant l'activité de la PP1 qui est censée moduler l'autophosphorylation de la CamKII. Mais la CamKII pourrait également être activée indépendamment de la PKA, suite à l'activation de la voie EPAC (*exchange protein activated by cAMP*) qui est une cible directe de l'AMPc. EPAC active la Rap GTPase Rap2B, qui, à son tour, active une isoforme de la phospholipase C (PLCε); la PLCε stimule la PKCε qui active la CamKII.(45)

Plusieurs études ont montré que l'activation de la CamKII peut induire une augmentation de la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+}, ainsi qu'une modification de l'amplitude des transitoires calciques (une augmentation ou une diminution, on trouve des effets contradictoires dans la littérature, détaillés dans le chapitre suivant). Si l'activation de la voie EPAC est dépendante ou non de la PKA, ceci n'est pas non plus bien identifié.

III- Conclusion

En conclusion, le système cardiaque joue un rôle crucial chez l'individu ; il permet d'assurer le débit sanguin nécessaire pour combler tous les besoins énergétiques de l'organisme. Ses fonctions sont basées sur l'automatisme électrique assuré par le tissu de conduction et sur le CEC, un mécanisme cellulaire principalement ventriculaire. Un cycle cardiaque bien orchestré repose principalement sur des mouvements calciques subtilement régulés par les différentes protéines clés du CEC. La caractéristique majeure du cœur reste sa capacité d'adapter sa fonction à différentes modifications environnementales du quotidien que vit l'individu ; ceci est possible grâce aux différentes régulations, intrinsèques et hormonales, auxquelles cet organe vital est sujet. Cette adaptation est bénéfique en conditions physiologiques. Est-ce également le cas en conditions pathologiques ? La plasticité du CEC peut-elle assurer une adaptation adéquate lorsque le cœur subit des perturbations chroniques endommageant sa fonction ?

B. Remodelage cardiaque pathologique et insuffisance cardiaque

I- Épidémiologie de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) traduit l'insuffisance du cœur à assurer son rôle de pompe et à fournir le débit sanguin nécessaire pour alimenter tous les besoins énergétiques de l'organisme. Cette maladie touche environ 600 000 personnes en France et ce chiffre ne cesse d'augmenter, notamment suite aux progrès de la médecine, aux traitements médicaux (paradoxalement), au vieillissement de la population et à l'émergence des maladies métaboliques : tous les ans, 100 000 nouveaux cas sont diagnostiqués. L'IC est aujourd'hui la cause la plus fréquente d'hospitalisation au-delà de 65 ans, avec une mortalité importante : une personne sur deux décède 5 ans après l'apparition des premiers symptômes (sources : Journée européenne de l'insuffisance cardiaque, SFC et FFC, mai 2010). L'IC constitue une cause majeure de décès dans le monde.

L'IC peut évoluer avec le temps, associée à la dégradation, non seulement de la fonction du VG, mais aussi du mode de vie, et à la morbidité du patient. Selon la **classification** de la *New York Heart Association* (**NYHA**) de l'IC, il existe 4 niveaux de ce syndrome :

- Classe NYHA I :

Pas de limitation : les efforts physiques habituels ne provoquent pas de fatigue, dyspnée ou palpitations inhabituelles.

- Classe NYHA II :

Il existe une petite limitation des capacités physiques : le patient n'a pas de symptômes au repos mais des efforts normaux provoquent fatigue, palpitations ou dyspnée.

- Classe NYHA III :

Il existe une limitation évidente de la capacité d'effort : le patient se sent toujours bien au repos mais un effort minime provoque déjà des symptômes.

- Classe NYHA IV :

Le patient ne peut plus effectuer aucun effort sans éprouver de symptômes : les symptômes de l'IC sont déjà présents au repos et s'aggravent au moindre effort.

Mann et Bristow décrivent l'IC comme un "**désordre progressif**", initié par un "**événement déclencheur**" qui, soit endommage le muscle cardiaque induisant une perte de fonction des

myocytes, soit perturbe la capacité du myocarde à générer une force, ceci l'empêche de se contracter normalement.(47) L'événement déclencheur peut :

- apparaitre brutalement suite à l'infarctus du myocarde,
- s'installer progressivement suite à une surcharge hémodynamique volumique ou de pression,
- avoir une origine héréditaire comme dans le cas des cardiomyopathies génétiques,
- être associé à une infection ou à des substances cardiotoxiques (exemple : l'alcool).

L'IC est alimentée surtout par les pathologies coronaires cardiaques, essentiellement les **infarctus du myocarde** (source : *European Cardiovascular Disease Statistics Edition 2012, © European Heart Network and European Society of Cardiology, September 2012*). Selon les statistiques des pathologies CV européennes publiées en 2012, environ 4 millions de patients décèdent tous les ans à cause de pathologies CV en Europe. Ces pathologies sont responsables de 47% des mortalités annuelles (52% des mortalités chez les femmes et 42% chez les hommes). C'est la cause majeure de mortalité en Europe (figure 15). En plus, le coût total pour l'économie de l'Union Européenne pour les pathologies CV est estimé à 196 billions d'euros par an. Ceci n'est pas négligeable et rend ces pathologies importantes à étudier et à traiter (figure 15).

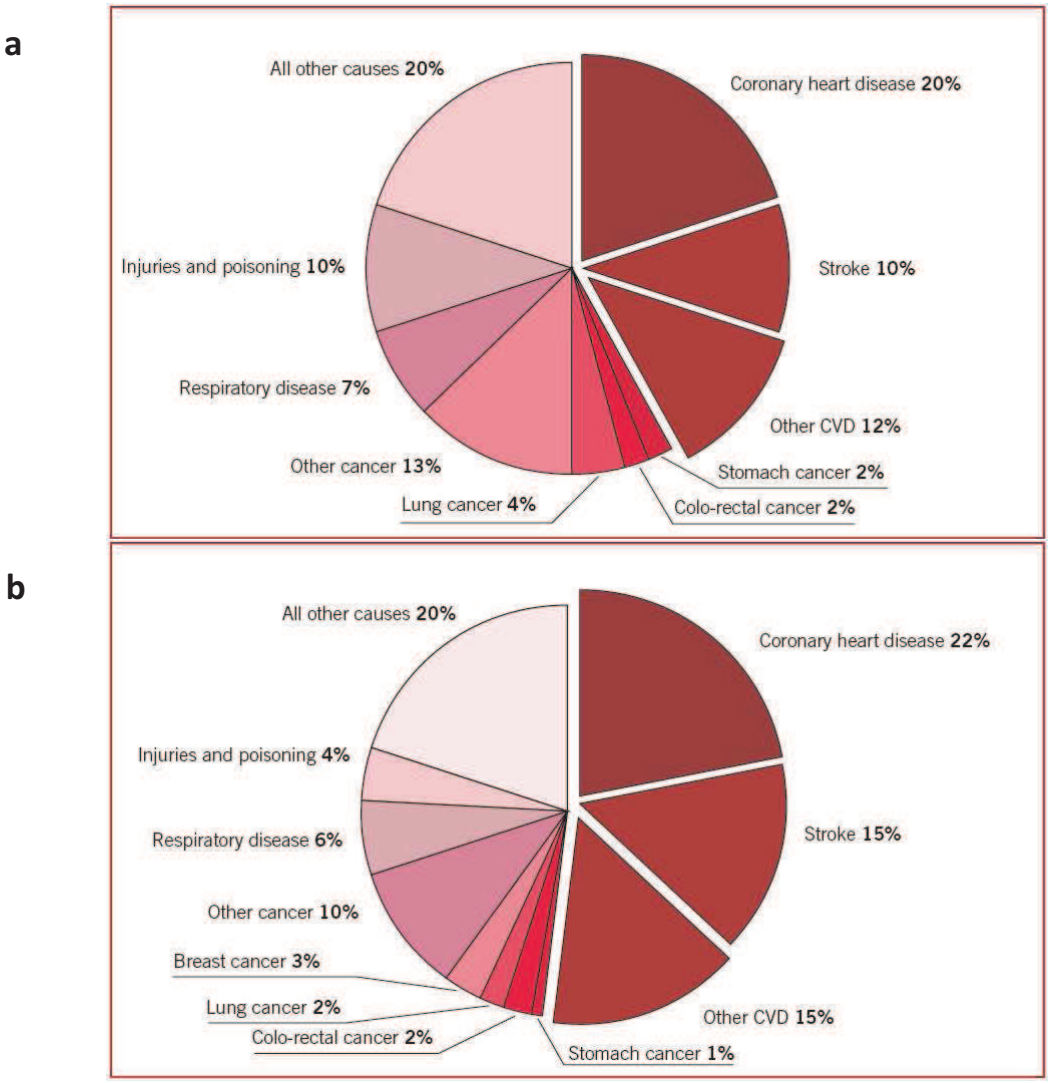


Figure 15 - Les causes de mortalité des hommes (a) et des femmes (b) en Europe. (Ref: *European Cardiovascular Disease Statistics Edition 2012, © European Heart Network and European Society of Cardiology, September 2012)*

Athérosclérose et hypertension artérielle sont les étiologies les plus fréquentes, mais les troubles métaboliques, obésité et diabète de type 2, constituent des facteurs de risque majeurs. Malgré des progrès dans le dépistage et les traitements, les thérapies actuelles, pharmacologiques ou chirurgicales (restauration précoce de la perfusion myocardique par angioplastie coronaire ou fibrinolyse) ont un impact limité. Le pronostic de l'IC sur le long terme est faible. Enfin, l'IC ne se résume pas seulement à un problème de mécanique cardiaque. Elle peut être considérée comme une maladie rythmologique du fait de la prévalence des troubles du rythme qui lui sont associés. Au stade tardif de la maladie, 50 % des décès sont imputables à une mort subite cardiaque liée à des tachycardies (TV) et fibrillations ventriculaires (FV).(48)

II- De la compensation à la phase décompensée de l'insuffisance cardiaque

Quelque soit la nature de l'événement déclencheur de l'IC, la caractéristique commune à tous les éléments déclencheurs est qu'ils induisent, d'une façon ou d'une autre, une régression de la fonction de pompe cardiaque. Dans la majorité des cas, le patient demeure asymptomatique ou peu symptomatique suite au déclin initial de la fonction de pompe mais les symptômes peuvent se développer plus tardivement.

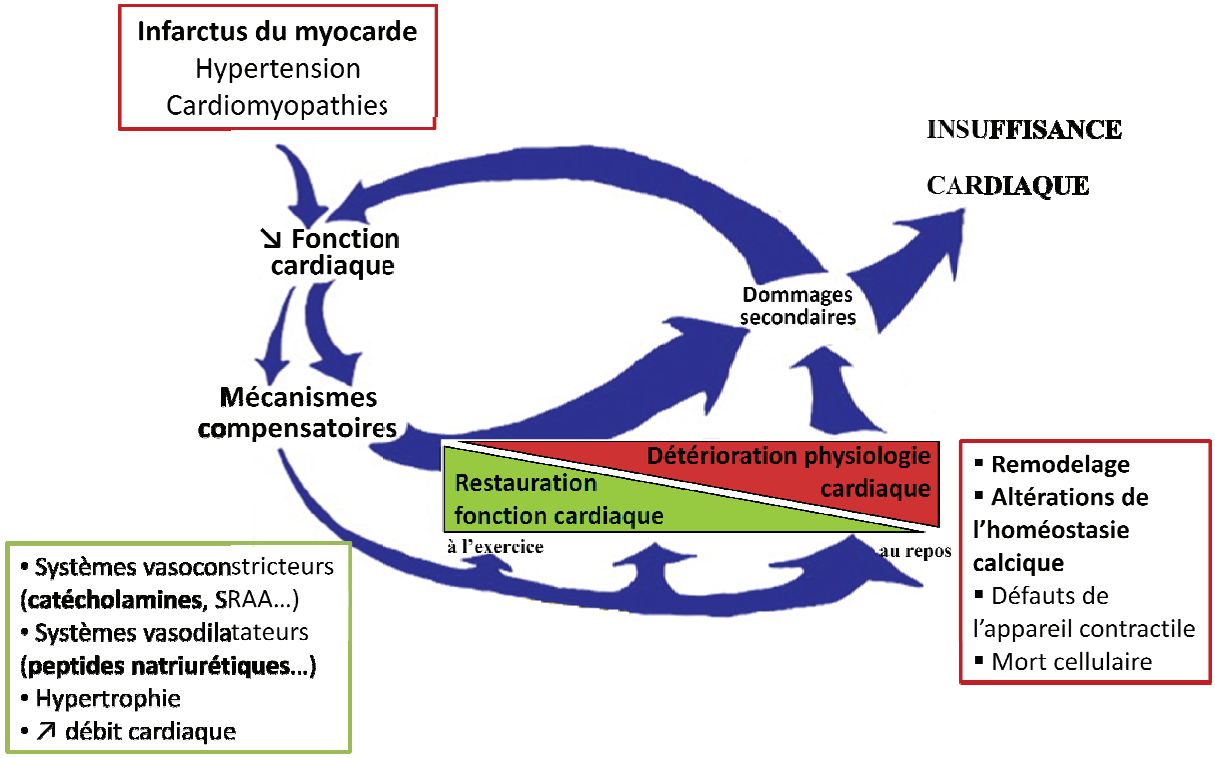


Figure 16 - Schématisation des principaux événements aboutissant à l'installation de l'IC. Modifiée de (48)

Après un infarctus du myocarde, "élément déclencheur" principal de l'IC, un système de compensation se met en place pour réduire, en phase aiguë, les conséquences de la perte de la fonction de pompe du VG et empêcher la diminution du DC. A court terme, ces mécanismes sont capables de restaurer, au moins partiellement, la fonction CV à des niveaux homéostatiques et leurs conséquences sur les patients demeurent asymptomatiques. Cette compensation se fait *via* l'activation de plusieurs systèmes neurohormonaux, entre autres : les systèmes vasoconstricteurs tels que le SN adrénergique, considéré comme le plus puissant des mécanismes compensatoires, et le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) ; ces systèmes sont contrebalancés par d'autres vasorelaxants comme les peptides natriurétiques (NP) car-

diaques et l'oxyde nitrique (NO). La figure 16 présente l'action de ces neurohormones sur le système CV en IC.

Cependant, à long terme, l'activation chronique des SN adrénergique et SRAA induit un stress cardiaque chronique qui peut entrainer des dommages organiques secondaires, surtout au niveau du VG. L'IC peut alors être considérée comme un modèle de **dérégulation neuroendocrine** où la progression de l'IC est due à la surexpression et à la suractivation de molécules et de voies de signalisation physiologiquement actives, mais qui exercent en chronique des effets délétères sur le cœur et la circulation. Ceci peut expliquer que l'IC peut se développer quelques années après un infarctus du myocarde, même en absence d'ischémie persistante. Mais les mécanismes compensatoires ne se réduisent pas seulement aux dérégulations hormonales, mais ils impliquent aussi des modifications des propriétés morpho-fonctionnelles propres au cœur, particulièrement au VG. Ces modifications sont qualifiées de **remodelage du VG**. La persistance et la progression du remodelage du VG, associées à la dérégulation neurohormonale et au stress cardiaque qu'elle induit, aboutissent à l'IC symptomatique et à la décompensation cardiaque qui s'en suit (figure 16).(47,48)

Dans ce qui suit, je vais détailler le remodelage qui survient au niveau des récepteurs catécholaminergiques cardiaques majoritairement exprimés : les récepteurs β-adr et de leurs voies de signalisation. Je vais m'attarder par la suite sur le remodelage intrinsèque cardiaque qui touche les propriétés ioniques et moléculaires du CEC et les arythmies qui en résultent.

III- Le remodelage des récepteurs β-adrénergiques

Trois types de récepteurs β-adr ont été identifiés à nos jours : les β1-, β2- et β3-adr. Les catécholamines ont des propriétés agonistes sur ces trois sous-types de récepteurs, mais avec des affinités différentes. Le profil d'affinité est : isoprénaline > NE ≥ épinephrine pour les récepteurs β1-adr ; et isoprénaline > épinephrine > NE pour les récepteurs β2-adr. L'affinité des catécholamines pour les récepteurs β3-adr est faible en comparaison aux deux autres sous-types, avec un profil : isoprénaline ≥ NE > épinephrine En conditions physiologiques, les récepteurs les plus exprimés au niveau du myocarde sont les β1- et β2-adr.

Les récepteurs β1-adr sont prédominants ; ils représentent 70 à 80 % des récepteurs β-adr globaux chez l'homme et 60 à 70 % chez le rat. Les récepteurs β1-adr sont couplés à des protéines Gs. Leur activation induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire et l'activation des protéines cibles du CEC par la PKA à l'origine des effets inotropes et lusitropes positifs. La

stimulation soutenue des récepteurs β1-adr semble changer la voie de signalisation activée, passant de la voie PKA à celle de la CamKII.(49)

Les récepteurs β2-adr sont couplés à des protéines Gs, mais leur activation induit des effets inotropes positifs et une production d'AMPc localisés et limités par rapport à ceux des récepteurs β1-adr. Ceci est dû à la concentration des récepteurs β2-adr, mais pas β1, au niveau des cavéoles et à la compartimentalisation de l'AMPc produit à travers ces récepteurs par les phosphodiestérases (PDE). La réponse fonctionnelle de l'activation β2-adr semble être due à une augmentation très localisée de l'AMPc au niveau des LTCC du sarcolemme.(50) La stimulation prolongée des récepteurs β2-adr induit une phosphorylation de ces récepteurs par la PKA et leur couplage à des protéines G inhibitrices (Gi). Les récepteurs β2-adr couplés à Gi activent l'IP_3 (inositol triphosphate) kinase qui inhibe la phosphorylation PKA-dépendante et les effets inotropes et lusitropes positifs.

La stimulation de la voie β3-adr provoque un effet inotrope négatif dans le ventricule de l'Homme, du chien, du rat et d'autres espèces. En effet, la stimulation de ce récepteur active une Gi, puis une NO synthase de type endothéliale (eNOS), dont l'activation est responsable de la production de GMPc.(51)

Dans l'IC, la stimulation chronique des récepteurs β-adr par les catécholamines entraine une diminution de l'expression des récepteurs β1-adr ainsi que la désensibilisation des récepteurs β1- et β2-adr et leur découplage des protéines Gs, en raison de la présence de sites de phosphorylation par la PKA et par la kinase des récepteurs β-adr (β-ARK) sur leur extrémité C-terminale. De plus, le couplage des récepteurs β2-adr à la protéine Gi est facilité. Ces modifications entrainent une diminution de la réponse β-adr dans les cœurs défaillants. Inversement, les récepteurs β3-adr sont surexprimés dans l'IC terminale chez l'Homme.(52)

En dépit des effets positifs de la signalisation β1-adr sur la stabilisation de la performance myocardique, cette voie activée en chronique devient cardiomyopathique.(53,54) La voie β1-adr joue le rôle délétère prédominant dans l'IC par rapport aux autres voies adrénergiques. La surexpression des récepteurs β1-adr chez la souris induit une hypertrophie cardiaque, une fibrose et une IC.(54) De plus, les molécules pharmacologiques bloquant sélectivement les récepteurs β1-adr (*e.g.* métoprolol et bisoprolol) montrent des effets bénéfiques plus importants par rapport aux β-bloqueurs non sélectifs (*e.g.* carvedilol et bucindolol).(53,55) Actuellement, l'efficacité des β-bloquants dans la prise en charge des patients en IC est clairement établie et constitue même un traitement de première intention.

IV- Le remodelage cardiaque pathologique

Après un infarctus, le myocarde est le siège d'un certain nombre de remaniements qui vont à la fois réparer la lésion et compenser, parfois pendant longtemps, la perte de substance et les anomalies de la contractilité. Le cœur ainsi remodelé sera à la fois capable de survivre et déficient en comparaison avec un myocarde normal. Le remodelage est un processus adaptateur incomplet et imparfait qui recèle en lui-même des aspects négatifs. Il touche la morphologie cardiaque, ses propriétés électriques ainsi que l'expression et l'activité des protéines régulant les mouvements calciques intracellulaires. L'ensemble de ces altérations peut être à l'origine d'arythmies cellulaires et cardiaques.

a) Remodelage morphologique et structural du VG

Le principal changement du cœur remodelé est la modification de sa géométrie et de sa structure. La figure 18 montre les principales modifications morphologiques du cœur remodelé suite à une hypertension ou une ischémie. Il existe plusieurs types de remodelage géométrique du VG. Dans un cas, la paroi du VG est hypertrophiée mais la taille de la cavité ventriculaire est conservée ; dans l'autre cas, la paroi du VG survivant est hypertrophiée mais la cavité est dilatée. **L'hypertrophie** de la paroi du VG fait évoluer sa géométrie elliptique allongée vers une forme sphérique, ceci est à l'origine de contraintes mécaniques pour le cœur défaillant, principalement par augmentation du stress au niveau de la paroi. (56)

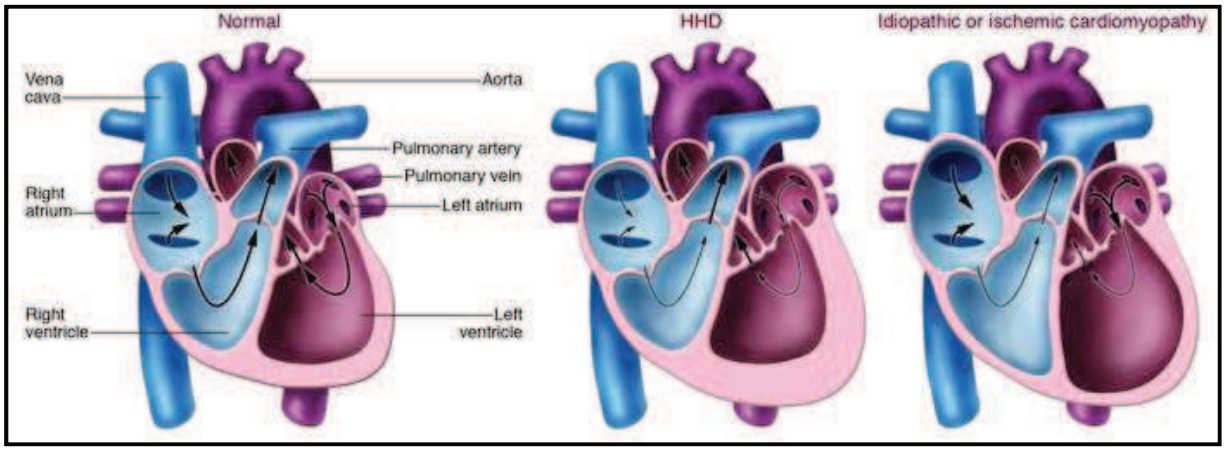


Figure 17 - Représentation schématique des principales modifications morphologiques et fonctionnelles du cœur remodelé suite à une hypertension (au milieu) et une cardiomyopathie ischémique ou idiopathique (à droite) par rapport à un cœur sain (à gauche). Les flèches représentent le trajet du sang au cours de l'activité myocardique. L'épaisseur des flèches reflète le débit éjecté.(56)

L'augmentation des facteurs neurohormonaux circulants et locaux (*e.g.* NE, angiotensine II (AngII) et endothéline) et la stimulation des récepteurs de l'étirement induisent une augmentation de la taille du cœur (une cardiomégalie) associée à une **hypertrophie des cardiomyocytes**. De plus, les peptides vasomoteurs, l'AngII en particulier, ont, en plus de leurs effets vasoconstricteurs, des effets trophiques. Le développement de la **fibrose** interstitielle empêche la propagation normale de l'influx électrique cardiaque et peut favoriser le déclenchement des **arythmies**. A noter que ces différents types de modifications : hypertrophie, dilatation, fibrose et arythmies ont été largement décrits et validés à la fois chez les patients et dans différents modèles expérimentaux.

L'hypertrophie des cardiomyocytes dans l'IC est associée à des altérations de l'ultra-structure de la membrane plasmique. En effet, les tubules T sont dilatés et perdus dans les phases tardives de cardiomyopathies dilatées ou ischémiques chez l'Homme.(57–59) Ces altérations ont été observées également dans différents modèles animaux d'IC.(60) Même si le remodelage cardiaque n'est pas assez bien étudié aux stades précoces de l'IC, des études montrent que le remodelage des tubules T s'installe tôt après l'apparition de l'événement déclencheur, pendant la phase compensatoire de l'hypertrophie, même avant que la dysfonction du VG ne soit détectable.(61,62) Ces études suggèrent que l'altération des tubules T n'est pas secondaire à l'IC, mais que, au contraire, elle peut jouer un rôle actif dans la transition vers la décompensation cardiaque. En effet, le remodelage des tubules T peut changer la distribution et l'organisation des récepteurs β-adr, des canaux et des transporteurs ioniques membranaires (principalement les LTCC) et découpler la liaison dyadique qui lie ces canaux aux RyR. Ce changement de l'ultra-structure membranaire peut engendrer une prolongation de la DPA et altérer l'échange ionique entre le milieu extracellulaire et le RS et ainsi altérer l'homéostasie des mouvements calciques intracellulaire. Ceci peut induire à un CEC défectueux et des arythmies.(60)

b) Remodelage ionique

Au niveau cellulaire, le changement électrophysiologique majeur associé à l'hypertrophie est la prolongation de la DPA (figure18).

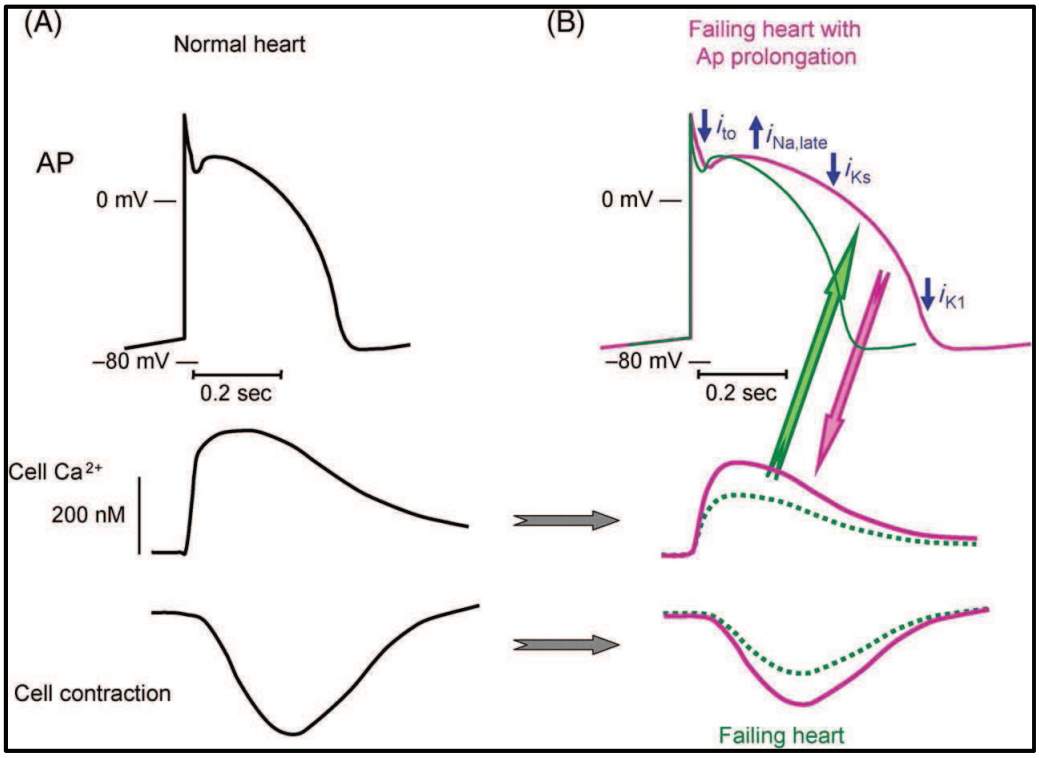


Figure 18 - Schématisation des modifications électrophysiologiques (durée du PA et des courants de repolarisation), de la concentration en Ca^{2+} et de la contractilité cellulaire du cœur en phase tardive de l'IC. La prolongation de la durée du PA dans le cœur en insuffisance est montrée en violet et les concentrations en Ca^{2+} et contraction cellulaire en vert.(63)

L'allongement de la DPA ventriculaire résulte d'une augmentation de courants ioniques entrants dépolarisants liés à une entrée d'ions positifs (Na^+ ou Ca^{2+}), ou alternativement (parfois en synergie) à la diminution d'un courant sortant repolarisant porté par un efflux cationique (K^+). Ces deux types d'altérations de mouvements ioniques ont été décrits chez l'Homme et dans différents modèles expérimentaux d'IC. En effet, il y a une diminution de l'expression des canaux potassiques (canaux de base des courants I_{to}, I_{K1} et/ou I_K), un ralentissement de l'inactivation d'I_{Na} et d'I_{CaL}.(64)

Cette prolongation de la DPA semble survenir très tôt suite à l'apparition de l'élément déclencheur. Bien que le stade précoce de l'IC ne soit pas encore assez bien étudié, des études électrophysiologiques ont montré une prolongation de la DPA chez l'Homme en phase précoce de l'hypertrophie cardiaque (65) ainsi que dans différents modèles animaux tels que le rat TAC,(66) le rat MI (67) et le chien soumis à une tachystimulation du VG.(68) Cette prolongation de la DPA est surtout associée à une diminution de la densité du courant I_{to} qui caractérise la repolarisation rapide précoce (phase 1) du PA, ce courant étant inhibé par un niveau diastolique élevé du Ca^{2+} intracellulaire.(69)

L'évolution du courant I_{CaL}, l'élément initiateur du CEC, au cours de l'hypertrophie et de l'IC, montre des divergences. Il semble notamment que la densité d'I_{CaL} augmente dans un premier temps, se normalise durant l'hypertrophie compensée, et finalement, ne change pas ou diminue dans la défaillance cardiaque sévère, y compris chez l'Homme (stade IV de la NYHA).(70) Même si la densité d'I_{CaL} n'est pas modifiée, la prolongation de la DPA et le niveau calcique élevé modifient les propriétés électrophysiologiques du courant : la fenêtre d'activation du courant est augmentée avec un ralentissement de son inactivation.(71) L'ouverture de longue durée des canaux calciques, mais aussi la facilitation de leur ouverture suite à l'activation β-adr et, surtout, suite à leur phosphorylation par CamKII peut être à l'origine d'arythmies déclenchées.(72)

Gomez et ses collaborateurs ont défini le concept de « CEC défectueux » dans différents modèles d'IC : il s'agit d'une diminution de l'amplitude de transitoire calcique malgré une conservation du courant I_{CaL} et du contenu du RS. Ce défaut du couplage est expliqué par une altération de la structure fonctionnelle entre les canaux LTCC et RyR.(73,74)

c) Remodelage des mouvements calciques

La capacité du courant calcique entrant à provoquer la libération de Ca^{2+} par le RS (CICR) est fortement réduite à n'importe quel potentiel. Ceci peut être expliqué par les altérations qui touchent l'expression et les modifications post-traductionnelles des protéines du CEC, surtout SERCA, NCX et RyR (en plus de la distanciation entre les RyR et les LTCC, mentionnée auparavant).

✓ Stades tardifs du remodelage cardiaque

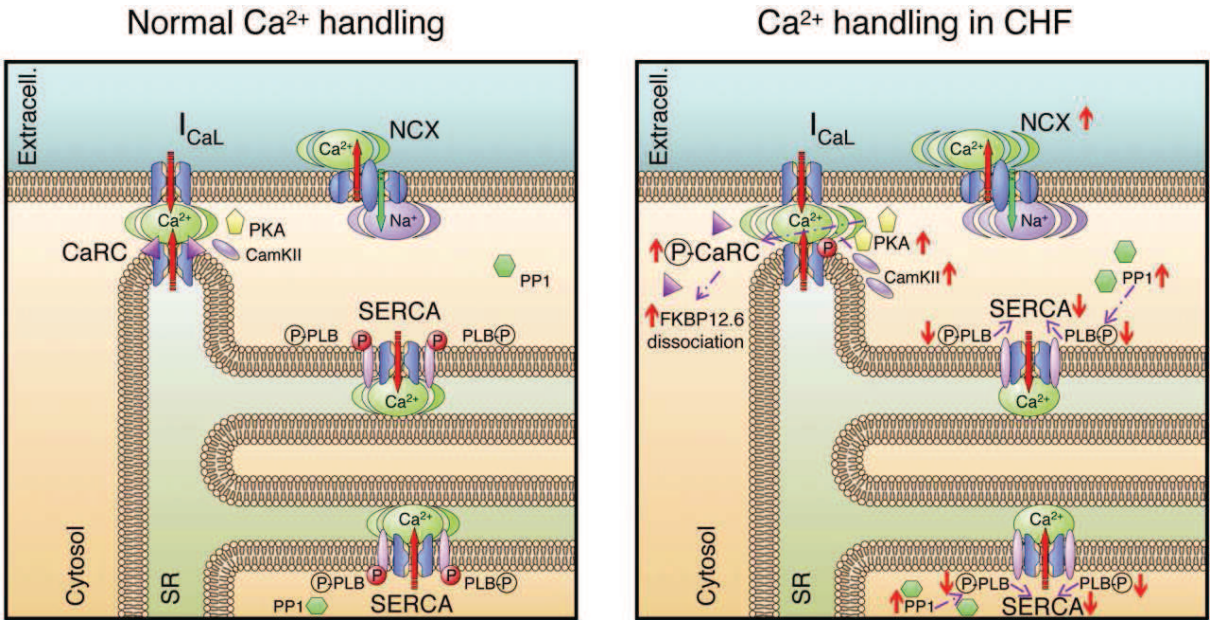


Figure 19 - Les flux calciques normaux et remodelés au cours de l'IC.(75)

Au niveau de la pompe SERCA :

L'expression et l'activité de la pompe SERCA sont diminuées dans l'IC; ceci ralentit la relaxation du transitoire calcique, diminue le contenu en Ca^{2+} du RS et peut induire une augmentation du niveau basal de Ca^{2+} diastolique (figure 19).(76) L'augmentation de la charge cardiaque et la stimulation β-adr augmentent rapidement l'expression de la pompe SERCA (au bout de 6h).(77) Ceci corrèle avec une augmentation de la RFF observée au niveau cellulaire. Cependant, dans l'IC, l'expression et la fonction de la pompe SERCA sont réduites. Ceci induit à une RFF inversée dans différentes pathologies cardiaques, ayant pour origine une accumulation du Ca^{2+} dans le cytosol et une diminution de l'amplitude du courant I_{CaL}.(78) La diminution de l'efficacité de la pompe SERCA peut être, au moins en partie, due à la forte libération de BNP qui, par ses effets autocrines et paracrines, diminue l'expression de la SERCA en agissant sur la voie de la calcineurine/NFAT.(79,80)

Au niveau de l'échangeur NCX:

L'expression de l'échangeur NCX est augmentée dans les phases tardives de l'IC chez l'Homme et dans différents modèles expérimentaux (figure 19).(76,81,82) L'augmentation de l'expression de NCX sert probablement à compenser la diminution de la fonction de SERCA pour extruder le Ca^{2+} cytosolique en diastole. Cependant, une telle augmentation de l'activité de NCX peut aussi entrer en compétition avec celle de la SERCA, ceci tendrait à favoriser la diminution du contenu du RS. Le NCX peut aussi perturber le CEC d'une autre façon : sachant que la prolongation de la DPA prolonge son activation en mode inversé (entrée de Ca^{2+})

pendant la phase de plateau, ceci peut augmenter la concentration calcique au voisinage des RyR et LTCC des tubules T pendant la diastole, augmenter la Po des RyR, induire le mécanisme de CICR et augmenter les fuites calciques spontanées sous forme de *sparks* et/ou de vagues calciques pro-arythmogéniques.(38)

Une corrélation entre la stimulation β-adr et l'expression de NCX dans les phases tardives de l'IC a été montrée *in vitro* et *in vivo* dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats (83,84) ainsi que chez l'Homme.(85) Cependant, que les effets de cette stimulation sur l'expression et la fonction de l'échangeur soient directs ou, alternativement, passent par des modifications de concentration en Ca^{2+} et/ou en Na^{+} intracellulaires reste un sujet de débat.(39)

Au niveau des RyR:

Vu que l'activité des RyR dépend, au moins en partie de la concentration en Ca^{2+} du RS, on pourrait penser que la diminution du contenu du RS dans l'IC diminuerait la Po des RyR et la survenue des *sparks* calciques en conséquence. Mais ce n'est pas le cas. Plusieurs mécanismes interviennent, comme la redistribution du Ca^{2+} du RS dans l'espace cytosolique et des modifications post-traductionnelles des RyR (hyperphosphorylation et altérations rédox), qui induisent une augmentation des fuites spontanées du RS.

- Hyperphosphorylation des RyR :

La stimulation chronique des récepteurs β-adr des cardiomyocytes ventriculaires par les catécholamines circulantes induit une hyperphosphorylation des RyR, même si la voie de signalisation et les conséquences de cette phosphorylation demeurent controversées et devraient être clarifiées (figure 14). En effet, Marx et ses collaborateurs ont montré que des cœurs de patients en IC présentent une hyperphosphorylation PKA-dépendante des RyR avec une activité accrue de ces derniers, associée à une inhibition de la liaison avec leur ligand stabilisateur FKBP12.6 (calstabine2) et une augmentation de leur Po (figure 19).(86) Ces altérations des RyR sont associées à une altération de la contractilité des cœurs insuffisants en réponse à une stimulation β-adr par rapport aux cœurs sains. Cependant, d'autres groupes n'ont pas détecté cette phosphorylation des RyR PKA-dépendante ni des conséquences pathologiques de cette phosphorylation.(87) Fischer et ses collaborateurs ont montré récemment que dans le cœur insuffisant humain, les fuites calciques diastoliques dépendent de la phosphorylation des RyR par CamKII et non pas par PKA.(88) Mais les *sparks* calciques dans les cœurs hypertrophiés avec une conservation de la FE sont moins fréquents par rapport aux cœurs insuffisants et peuvent être réduits par inhibition pharmacologique de la phosphorylation PKA-dépendante (par l'agent pharmacologique H89) aussi bien que par la CamKII (par l'AIP). Ces résultats

sont en accord avec une autre étude réalisée sur des souris KO déficientes génétiquement pour le gène de l'isoforme cardiaque de CamKII (CamkIIδ) et ayant subi une constriction de l'aorte abdominale (TAC). Ces souris développent une hypertrophie comme les contrôles (WT) mais elles ne tendent pas vers un phénotype d'IC (fibrose, dysfonction du VG, apoptose...) ni ne présentent une augmentation de la fréquence des *sparks* calciques sur le long terme.(89) Ceci suggère que la CamKII contribue à la décompensation cardiaque en augmentant la survenue des fuites calciques des RyR. Mais d'autres études montrent aussi que l'activation chronique de la voie CamKII peut induire un effet inotrope positif par augmentation de l'amplitude des transitoires calciques et de la contraction cellulaire, en augmentant la Po des RyR sans avoir d'effet sur les fuites spontanées, effets observés dans les phases précoces de l'hypertrophie compensée.(32,90) Ces contradictions dans les effets de l'activation de la voie de signalisation β-adr pourraient être dues aux modèles utilisés, au stade de la pathologie ou même à la durée de stimulation de cette voie. Il semblerait que la voie PKA-dépendante serait surtout activée en aigu après la stimulation des récepteurs, et qu'avec le temps, elle serait remplacée par la voie CamKII-dépendante. Mais toutes ces hypothèses restent à confirmer.

- S-nitrosylation des RyR :

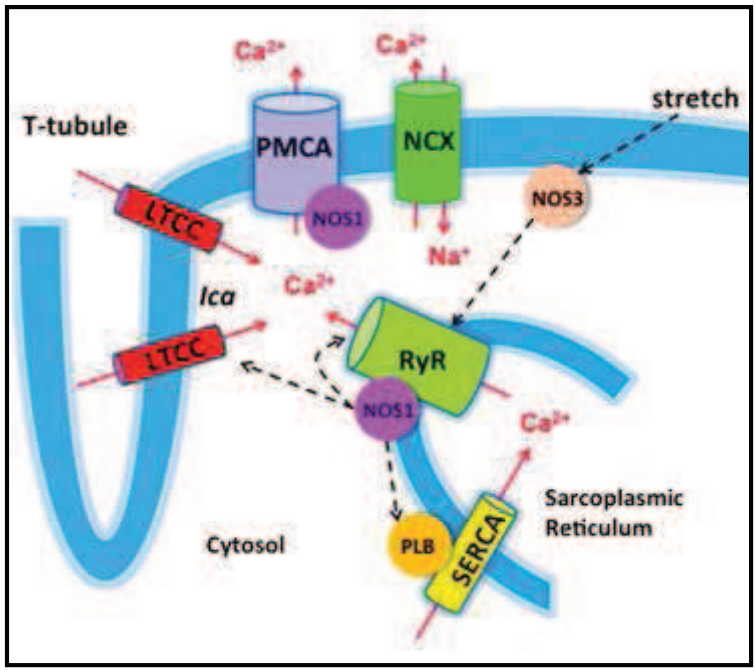


Figure 20 - Schématisation des flux calciques myocardiques induits par la S-nitrosylation des protéines du coupalge excitation-contraction. Modifiée de (91).

Les protéines RyR présentent plusieurs résidus de cystéine, ceci les rend très sensibles au statut rédox à proximité du canal dans la cellule. Dans l'IC, il existe une génération accrue d'espèces réactives oxygénées (en anglais ROS pour *reactive oxygen species*) et nitrosylées (en

anglais RNS pour *reactive nitrogen species*), comme l'anion superoxyde, le NO, le peroxynitrite et le péroxyde d'hydrogène, qui pourraient activer les RyR et générer des libérations de Ca^{2+} spontanées du RS indépendamment de la phosphorylation des RyR.(27)

Le NO est généré par des enzymes, les NO synthases (NOS) qui catalysent le L-arginine en L-citrulline, réaction dépendante de l'O_2 et de divers co-facteurs. Il existe 3 isoformes de NOS chez les mammifères (NOS1-3) dont deux sont exprimées dans le système CV d'une manière constitutive et dépendante de la calmoduline: la NOS1 ou nNOS (NOS neuronale) et la NOS3 ou eNOS (NOS endothéliale). La nNOS est exprimée à la membrane du RS et activée par le Ca^{2+} cytosolique et la eNOS au niveau des cavéoles du plasmalemme et activée par l'étirement membranaire (figure 20). Le NO généré peut soit activer une guanylate cyclase (GC) soluble dans le cytosol (GCs) et induire des effets GMPc-dépendants, soit agir directement sur les groupements cystéines des protéines et induire leur S-nitrosylation (SNO), surtout celle du RyR, mais aussi de la SERCA, du PLB et des canaux LTCC.(91) La SNO des RyR dans le cœur semble augmenter son activité et induire une augmentation des fuites calciques du RS,(92,93) mais certains auteurs montrent que l'hyponitrosylation des RyR chez les souris KO pour le gène de la NOS1, mais pas de la NOS3, est aussi à l'origine d'une fréquence élevée de fuites calciques spontanées du RS indépendamment de la liaison avec la FKBP12.6.(94) Il semble alors qu'un niveau de base de la SNO du RyR est recommandé pour une fonction normale du canal, toute augmentation ou diminution de ce niveau pouvant être délétère pour le cœur.

✓ Stades précoces du remodelage cardiaque

La cinétique d'installation des altérations du CEC **pendant la phase compensatoire** du remodelage cardiaque ainsi que les modifications moléculaires précoces ne sont pas encore bien décrites. Mais le nombre d'études sur la phase compensatoire du remodelage du CEC est actuellement croissant,(88) d'autant que l'*American Heart Association* (*AHA*) a récemment évoqué l'importance de mieux comprendre ce stade précoce de l'IC et qu'elle a souligné l'importance de développer des modèles animaux pour répondre aux besoins d'établir de nouveaux traitements de prévention de la progression de l'IC.(2)

On sait que l'hypertrophie des cardiomyocytes est plutôt adaptative dans les phases précoces suivant le déclenchement du remodelage. En effet, Mørk et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'inotropisme des cardiomyocytes du septum de souris PMI 10 jours après la ligature, par augmentation de l'amplitude du courant I_{CaL}, de celle des transitoires calciques, du contenu du RS et par accélération de la relaxation.(95) Cette relaxation rapide est expli-

quée par une augmentation du rapport SERCA/PLB (modifications moléculaires décrites aussi chez les rats Dahl-sensibles au sel et nourris avec une forte concentration de sel) et de l'expression de NCX.(96)

Je me suis intéressée au cours de mon travail de thèse à caractériser cette cinétique aux niveaux *in vivo* (en échocardiographie et ECG), cellulaire et moléculaire sur les mouvements calciques intracellulaires et le CEC en utilisant des souris PMI comme modèle d'étude.

d) Arythmies cellulaires déclenchées

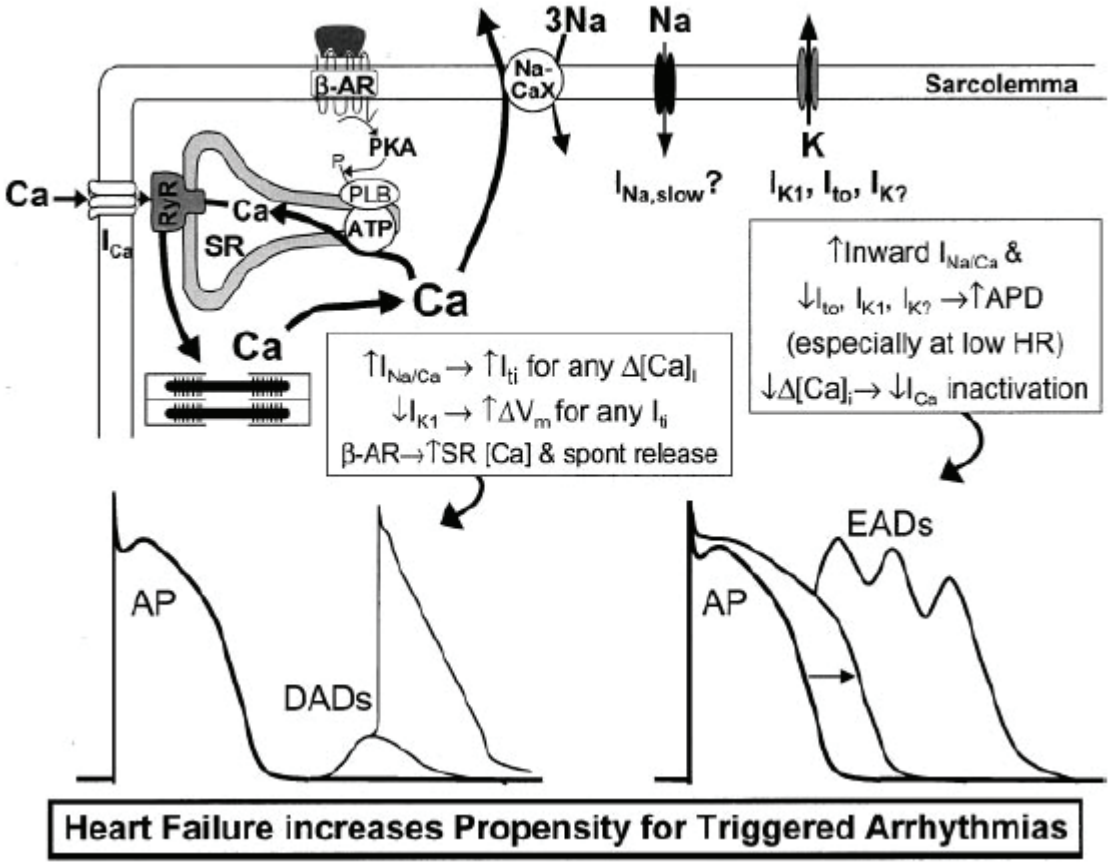


Figure 21 - Facteurs contribuant aux arythmies cellulaires déclenchées dans l'insuffisance cardiaque: les arythmies après-dépolarisations précoces (EADs) et tardives (DADs).(18)

La fibrillation ventriculaire (FV) est la cause majeure de mort subite dans l'IC. Les arythmies déclenchées: **EADs** (arythmies précoces après-dépolarisation ou ***early after-depolarizations***) et **DADs** (arythmies tardives ou ***delayed after-depolarizations***) sont les initiateurs majeurs de la FV. Pourtant, les EADs et les DADs n'ont pas la même origine et impliquent des mécanismes moléculaires différents.(18)

✓ Perturbations électriques : EADs, conséquence : modification du Ca^{2+}

Les EADs sont des dépolarisations spontanées secondaires qui apparaissent avant la fin de la phase de repolarisation du PA (figure 22). Elles sont généralement associées à une DPA prolongée, pendant une bradycardie ou chez les patients atteints d'un syndrome de QT long où une mutation congénitale touche des canaux ioniques spécifiques (dépolarisants ou repolarisants). Dans l'IC, la DPA prolongée et les altérations des propriétés électrophysiologiques d'I_{CaL} peuvent engendrer une activation spontanée d'I_{CaL} dans la phase tardive de repolarisation du PA (phases 2 ou 3). C'est la cause majeure de déclenchement des EADs (figure 21).(29)

Les arythmies ventriculaires les plus fréquemment associées aux EADs sont les extrasystoles ventriculaires (ESV), les TdP et les FV.(18,26)

✓ Perturbations du Ca^{2+} : DADs, conséquence : modification de l'activité électrique

Les DADs apparaissent au cours de la phase diastolique, c'est-à-dire après la repolarisation du PA, et résultent essentiellement d'une surcharge calcique intracellulaire et d'une activation du courant I_{ti} (*transient inward current*) généré par le NCX. Dans l'IC, l'échange Na^+-Ca^{2+} est augmenté et le courant I_{K1} est diminué (figure 21). Ce dernier est inhibé par que le niveau élevé de Ca^{2+} diastolique et réduit la stabilité du potentiel membranaire de repos (E_m) en le rapprochant du seuil de déclenchement du PA arythmogénique.(97) Donc une libération calcique spontanée du RS, qui peut traduire une dysfonction des différentes protéines qui régissent la libération (RyR) ou le stockage du Ca^{2+} (SERCA) dans le RS, conduirait à l'activation subséquente de l'échangeur NCX pour extruder ce Ca^{2+} surnuméraire de la cellule. L'échangeur NCX étant électrogénique, et la membrane légèrement dépolarisée, NCX génère un courant entrant de Na^+, dit I_{ti}, responsable de dépolarisation et de PA spontanés en diastole. Les DADs apparaissent à des FC élevées et essentiellement suite à l'activation des récepteurs β-adr.

Les DADs sont des déclencheurs d'arythmies dans les pathologies associées à des mutations impliquant une altération des interactions entre domaines au sein du RyR, des perturbations du complexe macromoléculaire et une modification de la sensibilité au Ca^{2+} cytoplasmique, typiquement les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (TVPC). Dans les TVPC, l'augmentation de la sensibilité des RyR au Ca^{2+} ainsi que la stimulation β-adr vont faciliter les fuites et les vagues calciques spontanées.(29) L'activité accrue de NCX pour ré-

duire le Ca^{2+} diastolique va créer le courant I_{ti}, déclencheur éventuel d'activité ectopique cardiaque.

Les arythmies ventriculaires associées aux DADs sont les ESV, les TV et les FV.(18,26)

e) Arythmies ventriculaires

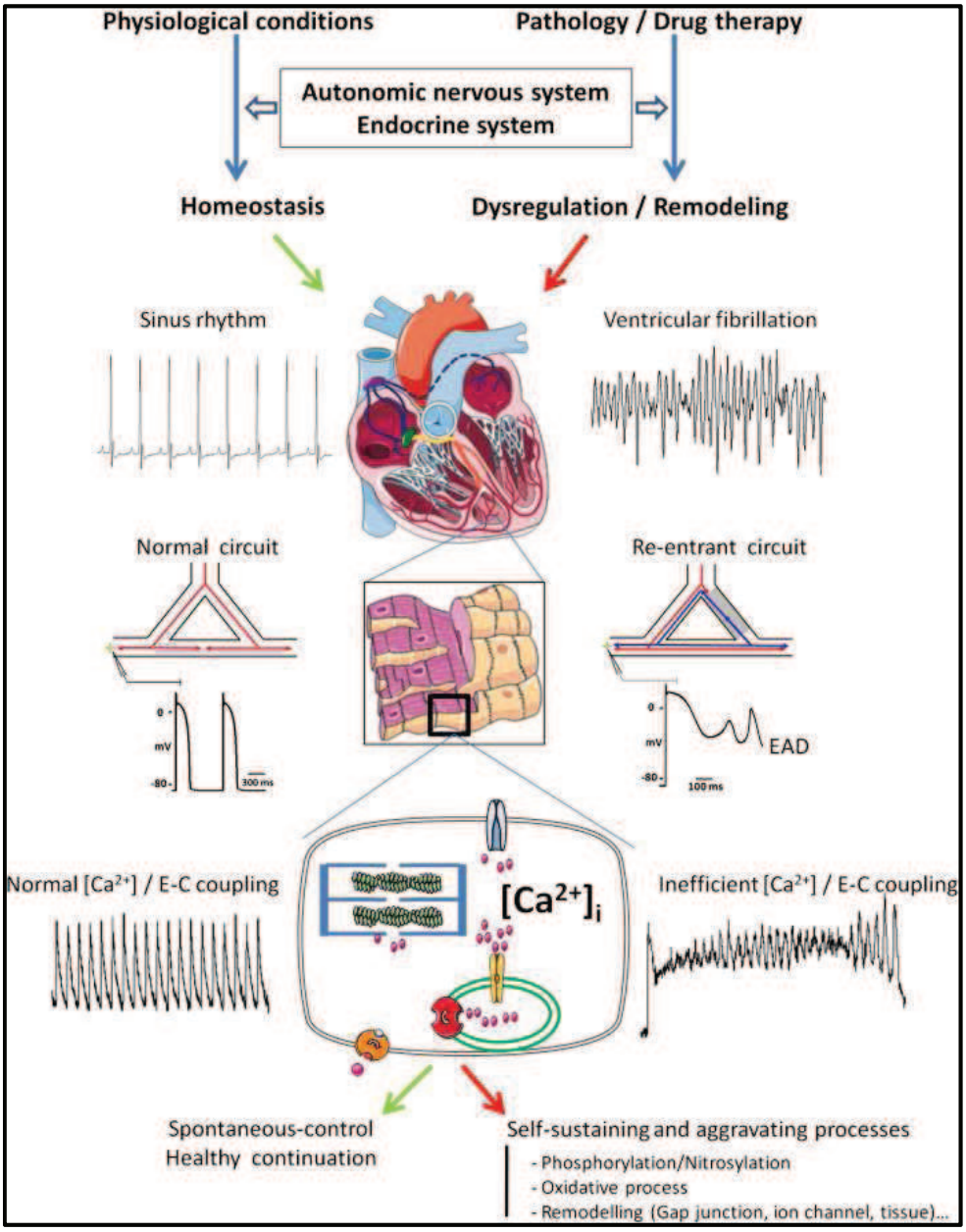


Figure 22 - Schématisation des mécanismes principaux impliqués dans les arythmies ventriculaires: de l'activité ectopique cellulaire au déclenchement des arythmies ventriculaires.(29)

Les arythmies ventriculaires restent imprédictibles et constituent la cause principale de morts subites. Les FV sont des arythmies ventriculaires chaotiques induisant un pompage désorgani-

sé du sang pouvant éventuellement mener à la mort. Dans l'IC, la surcharge calcique cytosolique constitue le déclencheur, le ***trigger***, des activités ectopiques: les EADs et les DADs. Le remodelage cardiaque entraine une défaillance de la pompe et fournit un **substrat** favorable des arythmies malignes, des circuits de réentrée. Les arythmies par réentrée (*e.g.* TdP, TV et FV) sont dues à une perturbation de la conduction de l'activité électrique au niveau du myocarde, qui permet l'initiation d'un circuit électrique qui s'auto-active. Le circuit de réentrée est créé lorsqu'un bloc de conduction unidirectionnel est localisé dans le myocarde, suite à une ischémie par exemple et la formation d'une zone fibrotique. L'influx électrique ne pouvant pas circuler dans la bonne direction, la zone en aval ne sera pas excitée. Une dépolarisation ectopique au niveau de cette zone pourrait alors se déclencher et se propager dans la direction inverse, chemin favorisé par la perturbation de la période réfractaire de dépolarisation dans le circuit suite à la redistribution des électrolytes après l'ischémie et à la stimulation β-adr accrue. Ceci est schématisé dans les figures 22 et 23.(29,98)

V- Traitements pharmacologiques de l'insuffisance cardiaque

Malgré l'évolution de la prise en charge "moderne" des patients en IC et le prolongement de leur espérance de vie, l'IC demeure la cause majeure d'hospitalisation chez les personnes âgées. Les traitements actuels peuvent ralentir la progression de la pathologie vers des stades tardifs de l'IC mais ne peuvent malheureusement pas inverser le remodelage cardiaque.(99)

Il existe 3 principaux types de traitements pharmacologiques de l'IC:
- des traitements qui visent les symptômes des patients (*e.g.* les diurétiques et les digitaliques).

- des traitements qui ciblent les systèmes neurohormononaux (*e.g.* les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les bloqueurs des récepteurs de l'AngII, les bloqueurs des récepteurs β-adr et les antagonistes de l'aldostérone). Mais l'inhibition des systèmes neurohormonaux devient de moins en moins efficace avec la progression de l'IC, le remodelage devenant plutôt indépendant du statut neurohormonal du patient et exclusivement intrinsèque au cœur.

- les anti-arythmiques: les bloqueurs des canaux ioniques. Au niveau ventriculaire, des anti-arythmiques, comme la ranolazine, ciblent l'homéostasie des ions Ca^{2+} et Na^{+}. Des bloqueurs des canaux RyR, comme le dantrolène et le flécaïnide, et des stabilisateurs des RyR, comme les Rycal, agissent en réduisant l'occurrence des fuites calciques spontanées, déclencheurs principaux des DADs. Ces différents types d'anti-arythmiques présentent un fort potentiel thérapeutique pour l'avenir.

Mais ces différents traitements restent insuffisants pour stopper l'évolution de l'IC et inverser le remodelage du VG (figure 23). Ils peuvent même avoir des effets secondaires arythmogéniques délétères chez certains patients en modulant la DPA et la FC.(29)

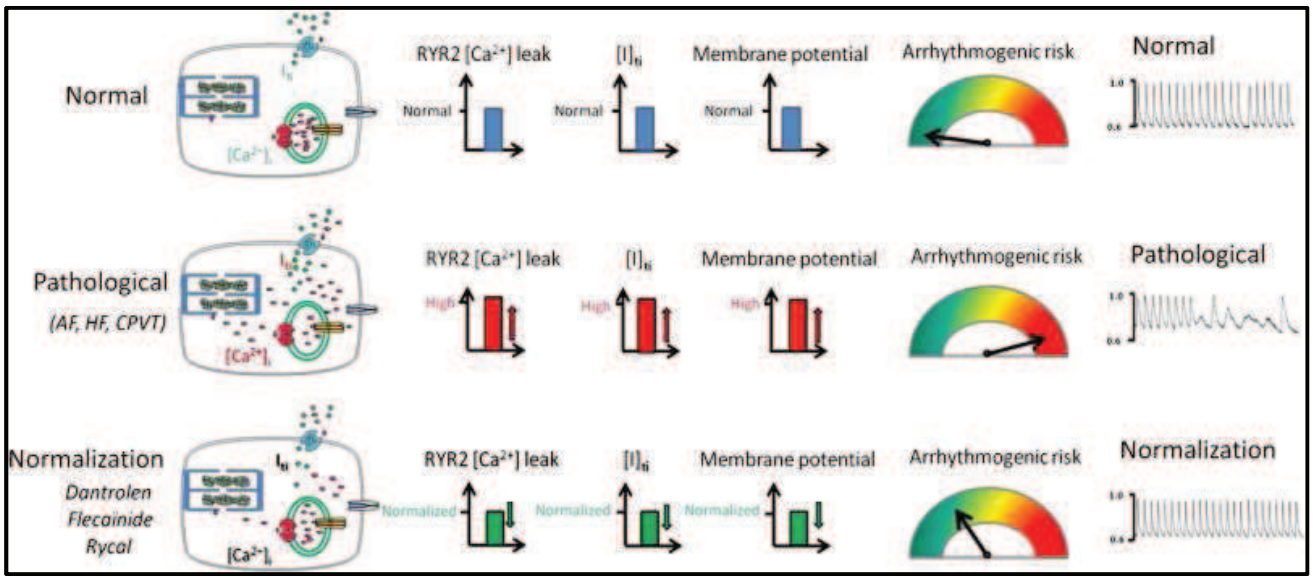


Figure 23 - L'inhibition et la stabilisation pharmacologiques du RyR réduit le risque arythmogénique dans les pathologies cardiaques telles que la fibrillation atriale (AF), l'insuffisance cardiaque (HF) et les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT).(29)

VI- Conclusion

En conclusion, l'IC est une maladie qui s'installe progressivement suite à l'apparition de l'événement déclencheur qui touche la structure cardiaque et/ou sa fonction (notamment l'infarctus du myocarde et l'hypertension artérielle). Le passage d'une phase d'adaptation compensatoire à une défaillance cardiaque est favorisé par des libérations hormonales excessives, surtout de NE et de NP cardiaques ; ainsi que par la mise en route d'une succession de modifications intrinsèques cardiaques, qualifiées de remodelage. Le remodelage touche plusieurs facultés cardiaques : principalement, la réponse β-adr, les mouvements calciques et le CEC. L'ensemble de ces modifications est bénéfique et permet de restaurer un DC à un niveau homéostatique ; mais risque d'aggraver la fonction CV sur le long terme en induisant des altérations pro-arythmogéniques. La NE est déjà connue pour ses effets délétères cardiaques en chronique, et le blocage de ses récepteurs est utilisé pour but préventif et curatif. Qu'en est-il des NP cardiaques, ces hormones à actions autocrines, paracrines et endocrines, dans l'IC?

C. Peptide natriurétique de type B (BNP) dans l'IC

Il existe 3 types de peptides natriurétiques cardiaques : l'ANP, le BNP et le CNP ; et 3 types de récepteurs : le NPR-A, le NPR-B et le NPR-C sur lesquels ces peptides se fixent avec des affinités différentes. Dans cette partie, je vais détailler dans un premier temps les peptides natriurétiques et leurs récepteurs. Je vais me concentrer par la suite sur le BNP en expliquant son rôle primordial dans l'IC et l'intérêt d'étudier ses effets cardiaques au cours de mon travail de thèse.

I- Les peptides natriurétiques cardiaques

a) Historique

Des observations en microscopie électronique avaient fait allusion à un rôle sécrétoire du cœur, peut-être même endocrine, à partir des années 1950 et 1960. C'est en 1981 que le premier NP a été découvert par Adolfo de Bold, au Canada.(100) Les auteurs ont observé des **effets natriurétiques et diurétiques,** ainsi qu'une **diminution de la pression sanguine** (PS) après injection intraveineuse de broyats d'oreillettes cardiaques – mais pas de ventricules – chez le rat. Cette hormone constitue un premier lien humoral longtemps recherché entre le cœur et les reins. Elle a été nommée **ANP** pour *atrial natriuretic peptide*, puis NP de type A dans la nouvelle nomenclature. Par la suite, les NP de type B (**BNP**; *brain natriuretic peptide* initialement) et de type C (**CNP**) ont été purifiés à partir d'extraits cérébraux de porc par une équipe japonaise en 1988 et 1990, respectivement, basés sur leur effet relaxant sur les muscles lisses.(101,102) Plus tard, des études ont montré que le BNP est synthétisé et libéré principalement par les cellules cardiaques et que le CNP provient des cellules endothéliales vasculaires.(103,104)

En 1984, les effets vasorelaxants de l'ANP ont été montrés pour être induits par une augmentation de la concentration de GMPc intracellulaire de segments isolés d'aortes de rats et ceci suite à l'activation de GC particulaires (**GCp**) et non solubles, et indépendamment de toute activité endothéliale.(105)

b) Synthèse des peptides natriurétiques

Les NP de type A, B et C sont synthétisés sous forme de pré-prohormones, puis clivés en prohormones et ensuite en leur forme active.(106)

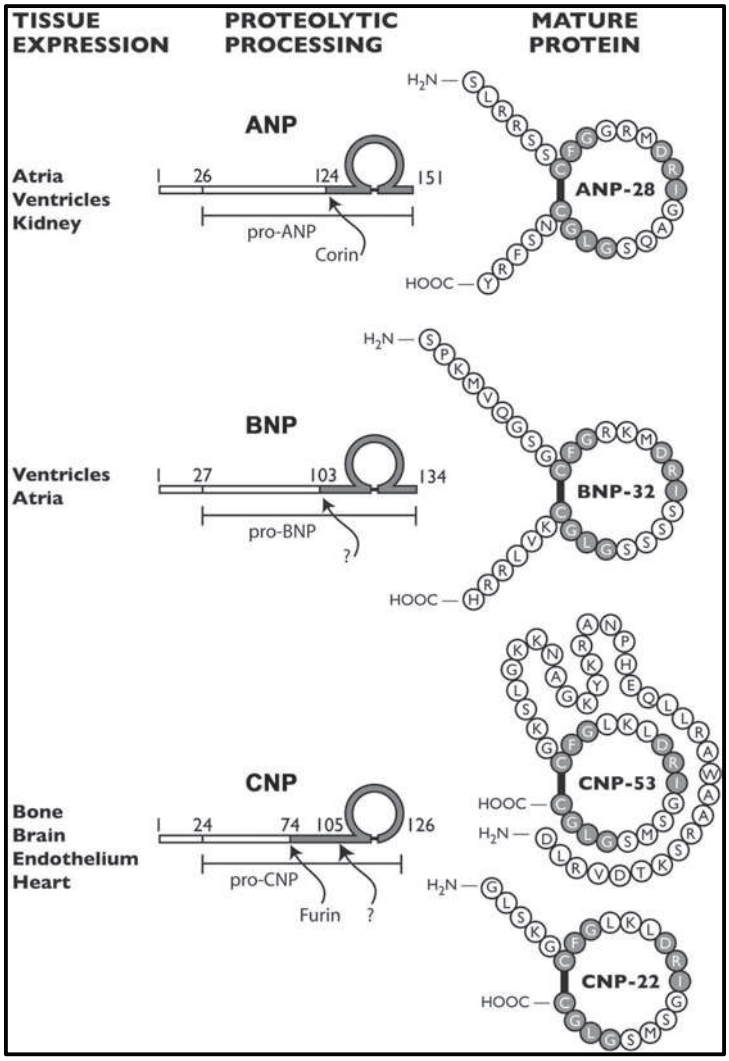


Figure 24 - Peptides natriurétiques cardiaques.(106)

✓ Le peptide natriurétique de type A

Le préproANP humain est constitué de 151 acides aminés (a.a.). Le préproANP est clivé au niveau de sa terminaison N-terminale et stocké sous forme de proANP (126 a.a.) dans des granules atriales. Le proANP est principalement clivé au moment de la sécrétion par une protéase sérine membranaire: la corine, donnant la forme circulaire active de l'ANP formé de 28 a.a. de la séquence carboxyl-terminale (figure 24). Les souris déficientes en corine sont caractérisées par une réduction de la conversion du proANP en ANP et présentent une PS élevée et une hypertrophie cardiaque.(107) L'ANP est stocké principalement dans des granules atriales et est présent en quantité moindre dans d'autres tissus comme le ventricule cardiaque et le

rein. Il est libéré en réponse à un étirement de la paroi atriale, ou à une stimulation hormonale, celle impliquant l'endothéline, l'AngII ou la vasopressine. Le niveau plasmatique d'ANP chez les sujets sains est de l'ordre de 10 fmol/ml. Ce niveau est augmenté 10 à 30 fois chez les patients en IC congestive.(106)

✓ Le peptide natriurétique de type B

Le BNP est synthétisé sous forme de préprohormone comprenant 134 résidus, puis clivé en prohormone de 108 a.a. Le proBNP subit un clivage supplémentaire par des *convertases*, qui ne sont pas encore bien déterminées, et donne une forme inactive le NT-proBNP (76 a.a.). Il a une forme circulaire constituée de 32 a.a. chez l'Homme, le cochon et le chien et de 45 a.a. chez le rat et la souris. Semenov et ses collaborateurs ont montré récemment que le proBNP peut être clivé *in vitro* par la corine et une autre endoprotéase intracellulaire : la furine.(108) Dans l'IC, l'expression de la corine est diminuée alors que la furine est plutôt surexprimée en association avec une augmentation de la libération du BNP (figure 24).(109,110)

Au niveau atrial, le BNP est stocké avec l'ANP dans les granules. Par contre, dans les ventricules, la production du BNP est régulée au niveau transcriptionnel par le stretch de la paroi pariétale suite à une surcharge en volume et/ou pression, et par des stimulations hormonales et le Ca^{2+} intracellulaire (détaillés dans le paragraphe IV-a).(111) Chez les sujets sains, le taux plasmatique de BNP est de l'ordre de 1 fmol/ml (3,5 pg/ml), ce qui correspond au dixième du taux d'ANP. Mais chez les patients en IC congestive, le niveau de BNP est augmenté de 200, voire 300 fois. Ces différences importantes du niveau sanguin font du BNP un **marqueur diagnostique** important de l'IC. De plus, certaines études associent le niveau élevé du BNP à un mauvais **pronostic**. Les souris déficientes pour le gène du proBNP ($Nppb^{-/-}$) présentent une pression artérielle normale mais développent une fibrose ventriculaire importante en réponse à une surcharge de pression ; ceci caractérise son **rôle anti-fibrotique** et son implication majeure dans le remodelage cardiaque.(112)

✓ Le peptide natriurétique de type C

Le CNP est le peptide natrurétique le plus conservé au cours de l'évolution. Il est exprimé majoritairement dans le cerveau. Il est aussi fortement exprimé dans les chondrocytes et les cellules endothéliales, surtout au cours de l'inflammation. Il n'est pas stocké dans des granules. Le proCNP humain comprend 103 résidus. Il est clivé en CNP mature (53 a.a.) par la furine dans le cerveau, le cœur et les cellules endothéliales. Dans certains tissus, le CNP-53 est clivé en CNP-22 par une enzyme extracellulaire inconnue. Le CNP-22 constitue la forme prédominante dans le plasma sanguin et le liquide céphalo-rachidien. Les deux formes CNP-

22 et CNP-53 sont retrouvées chez le cochon et le rat. Le taux plasmatique du CNP est inférieur au fmol/ml et n'est pas ou très peu augmenté chez les patients en IC congestive (figure 24).(106)

c) Dégradation des peptides natriurétiques

Les NP de type A, B et C sont dégradés par deux mécanismes connus :

1) Internalisation par le récepteur NPR-C (décrit dans le paragraphe II) suivie par leur dégradation lysosomale. L'affinité des NP pour NPR-C est comme suit : ANP ≥ CNP > BNP.
2) Dégradation enzymatique par des endopeptidases neutres (les néprilysines, NEP) : il s'agit d'enzymes dépendantes du zinc exprimées sur la membrane plasmique de différents tissus. Le clivage protéolitique ne se fait pas avec la même affinité pour les 3 peptides mais avec une vitesse d'hydrolyse: CNP ≥ ANP > BNP.

La faible affinité des récepteurs NPR-C et des NEP au BNP pourrait expliquer, au moins en partie, sa demi-vie élevée comparée à celles de l'ANP et du CNP dans le sérum (20 min *vs.* 2 et 2,6 min respectivement).(111)

II- Les récepteurs des peptides natriurétiques cardiaques

Il existe 3 types de récepteurs des NP connus chez les mammifères : NPR-A, NPR-B et NPR-C, connus aussi sous la terminologie NPR-1, NPR-2 et NPR-3, respectivement. Les NPR-A et B sont couplés à un domaine GC : GC-A et GC-B, respectivement. Le récepteur NPR-C n'est pas associé à une GC.

✓ Le récepteur NPR-A

Le NPR-A est exprimé au niveau de la glande surrénale, le cerveau, les muscles lisses vasculaires, les poumons, les reins, le tissu adipeux et le cœur. Les NP ont une affinité différente pour ce récepteur selon la séquence : ANP ≥ BNP >> CNP. Le NPR-A présente plusieurs sites de phosphorylation : 4 sérines (Ser-497, Ser-502, Ser-506 et Ser-510) et 2 thréonines (Thr-500 et Thr-513), la phosphorylation, régulée par un domaine d'homologie de kinase intracellulaire, étant indispensable pour l'activation hormonale. Une exposition chronique du récepteur à son ligand induit une diminution de la phosphorylation des sites actifs avec le temps.(113) Mais cette **désensibilisation** du récepteur reste indépendante de l'élévation du GMPc et du Ca^{2+} cytosoliques.(114) Des souris transgéniques invalidées pour le récepteur NPR-A présentent une PS élevée, une hypertrophie et une fibrose interstitielle car-

diaques.(115) Chez l'Homme, une mutation mono-allélique a été identifiée dans le promoteur du gène de NPR-A. Elle réduit l'expression du récepteur de 70 %. Sur huit patients japonais possédant cette mutation, 7 présentaient une hypertension et un développait une hypertrophie du VG, ces pathologies sont associées à une augmentation significative du taux de BNP circulant par rapport aux patients hypertrophiques dénués de la mutation.(116) Donc la perte de fonction de NPR-A est responsable d'une augmentation de la PS et du remodelage cardiaque pathologique.

✓ Le récepteur NPR-B

Le récepteur NPR-B est exprimé dans les chondrocytes, le cerveau, les poumons, l'utérus, les muscles lisses vasculaires et les fibroblastes. Il présente la même topologie que celle du NPR-A avec plusieurs sites de phosphorylation connus : Thr-513, Thr-516, Ser-518, Ser-523 et Ser-526, indispensables pour son activation. L'affinité du récepteur NPR-B pour les différents NP est comme suit : CNP >> ANP ≥ BNP. Les souris présentant une perte de fonction de NPR-B, comme celles déficientes en CNP, présentent une achondroplasie, la forme la plus commune de nanisme.(117,118) Le nanisme a été également reporté chez des patients présentant des mutations au niveau du NPR-B, suite à une dysplasie acromésomélique de type Maroteaux, caractérisée cliniquement par un nanisme sévère avec raccourcissement des segments médians et distaux des membres.(119) Ces patients ne présentent pas d'anomalie au niveau de la PS, ni au niveau cardiaque. Comme le récepteur NPR-A, l'activation chronique de NPR-B par son ligand induit une désensibilisation du récepteur, corrélée avec sa déphosphorylation et démontrée comme étant reliée à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire.(120,121)

Les récepteurs NPR-A et NPR-B étant couplés à des domaines GCp, les NP exercent leurs effets sur ces récepteurs *via* la synthèse du messager secondaire **GMPc**, effecteur aussi du NO à travers l'activation de la GCs. Les cibles du GMPc sont trois types de protéines dont deux sont exprimées dans le tissu cardiaque : les PKG, les PDE et les CNG (figure 25).

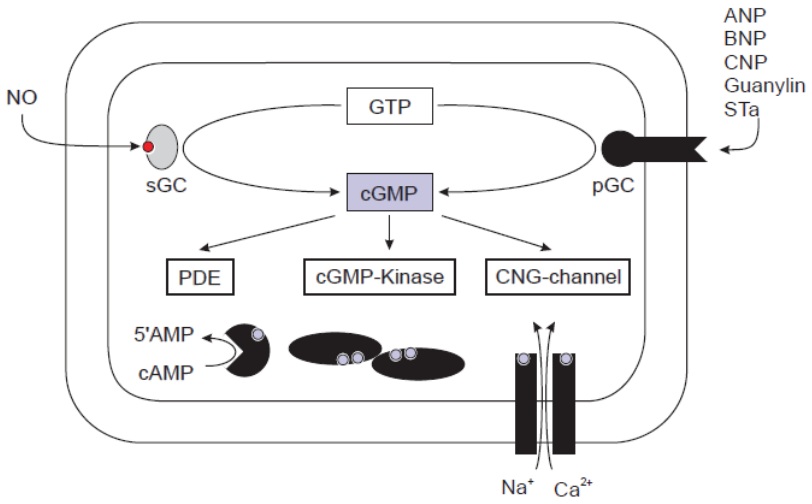


Figure 25 - Les voies GMPc-dépendantes des récepteurs des peptides natriurétiques de type A et B.(122)

1) Les protéines kinases GMPc-dépendantes (**PKG**) :

Il existe deux types de PKG exprimés par deux gènes différents : PKGI et PKGII. La PKGI existe sous deux isoformes : α et β. La PKGI est principalement cytosolique et exprimée dans les plaquettes, les muscles lisses, le cerveau et les cardiomyocytes. La PKGII est plutôt reliée à la membrane et exprimée dans l'intestin, le rein, le cerveau, les chondrocytes et les os. Au niveau vasculaire, la PKGI intervient dans la régulation du tonus des muscles lisses, en régulant la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, la sensibilité des protéines au Ca^{2+}, comme les récepteurs à l'IP_3 au niveau du RS et les protéines de la machinerie contractile.(122) Au niveau cardiaque, la PKGI module la contractilité, augmente la relaxation et améliore la rigidité des myocytes ventriculaires. Les effets GMPc/PKGI sont médiés par la phosphorylation des protéines du CEC, comme les canaux LTCC, le PLB, la troponine I et la titine (protéine élastique qui régule la raideur des protéines contractiles). La PKGI inhibe le courant I_{CaL} et la contractilité.(123) Les effets inotropes négatifs et lusitropes positifs de PKGI ont été étudiés principalement en réponse au NO et sont éliminés dans les cardiomyocytes des souris invalidées pour le gène exprimant PKGI.(124,125)

2) Les phosphodiestérases (**PDE**) dépendantes de GMPc :

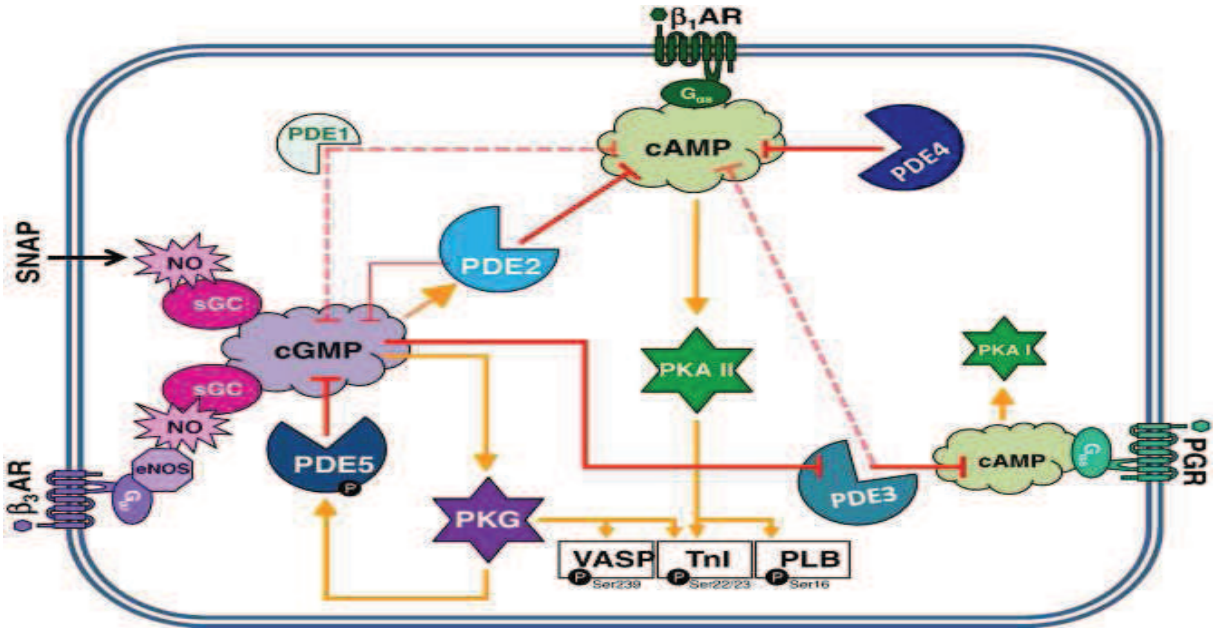


Figure 26 - Schéma des principales phosphodiestérases cardiaques (PDE1, 2, 3, 4 et 5) et du *cross-talk* AMPc - GMPc dans un cardiomyocyte ventriculaire.(126)

Les PDE sont les régulateurs principaux des nucléotides cycliques *via* la modulation de leur concentration intracellulaire. Ils sont responsables de leur hydrolyse en une forme linéaire inactive. Il existe 11 familles différentes de PDE (PDE1-11), organisées en fonction des substrats et des activateurs ou inhibiteurs des PDE. Sont exprimées dans le cœur les PDE1, 2, 3, 4, 5, 8 et 9. Les plus étudiées sont les PDE1, 2, 3, 4 et 5. Les PDE1, 2, et 3 dégradent le GMPc et l'AMPc. La PDE1 est activée par la Ca^{2+}/calmoduline et hydrolyse l'AMPc et le GMPc. La PDE2 est activée par le GMPc et peut hydrolyser l'AMPc et le GMPc avec la même affinité, mais la PDE2 fonctionne plutôt comme une estérase de l'AMPc - activée par le GMPc. La PDE3 présente aussi une double spécificité d'hydrolyse mais agit comme une estérase de l'AMPc - inhibée par le GMPc. Alors que les PDE4 et 8 n'hydrolysent que l'AMPc et les PDE5 et 9 que le GMPc (figure 26).

Certaines PDE présentent des sites allostériques pour le GMPc : telles que la PDE2, la PDE3 et la PDE5. Les **PDE2 et 3** sont responsables du ***cross-talk* AMPc-GMPc intracellulaire** mais induisent des effets inverses : la PDE2, activée par la GMPc, réduit les effets de l'AMPc, alors que la PDE3 qui est inhibée par la GMPc potentialise les effets AMPc-dépendants.(106,123) Des effets cardiaques des NP passeraient à travers ce *cross-talk* avec la

voie β-adr en conditions physiologiques,(127) aussi bien que pathologiques,(128,129) et seront dans le paragraphe V-b) de cette partie.

3) Les canaux ioniques dépendants du GMPc (CNG) :

Les CNG constituent une famille de canaux cationiques non sélectifs. Ils sont exprimés dans le cerveau et le rein, mais pas dans le système CV.

Dans l'IC, les récepteurs NPR-B augmentent en expression et en activité alors que les NPR-A perdent de leur efficacité dans les modèles animaux aussi bien que chez l'Homme.(130,131)

- ✓ **Le récepteur NPR-C**

Le NPR-C présente une expression ubiquitaire dans différents organes dont les reins, le cœur et les vaisseaux. Contrairement aux deux autres NPR, le NPR-C n'est pas lié à une cyclase, donc ses effets ne dépendent pas du GMPc intracellulaire. La perte de fonction de NPR-C chez des souris transgéniques montre que le rôle de ce récepteur est d'éliminer les NP de la circulation et du milieu extracellulaire en induisant leur internalisation et leur dégradation lysosomale.(132) Ces souris présentent des phénotypes associés à des actions exagérées de NPR-A et NPR-B comme l'hypotension et le gigantisme. Le NPR-C sert alors principalement à réguler la concentration des NP en fonction des besoins de l'organisme. Des études ont montré que le NPR-C peut aussi être impliqué dans l'inhibition de la signalisation β-adr, indépendamment du GMPc et de la clairance des NP (voir paragraphe V-c).(133)

III- Effets physiologiques du peptide natriurétique de type B

L'ANP, le BNP et le CNP sont des hormones qui, une fois libérées dans la circulation, vont activer leurs récepteurs et induire différents effets endocrines. Ces effets sont résumés dans la figure 27 :

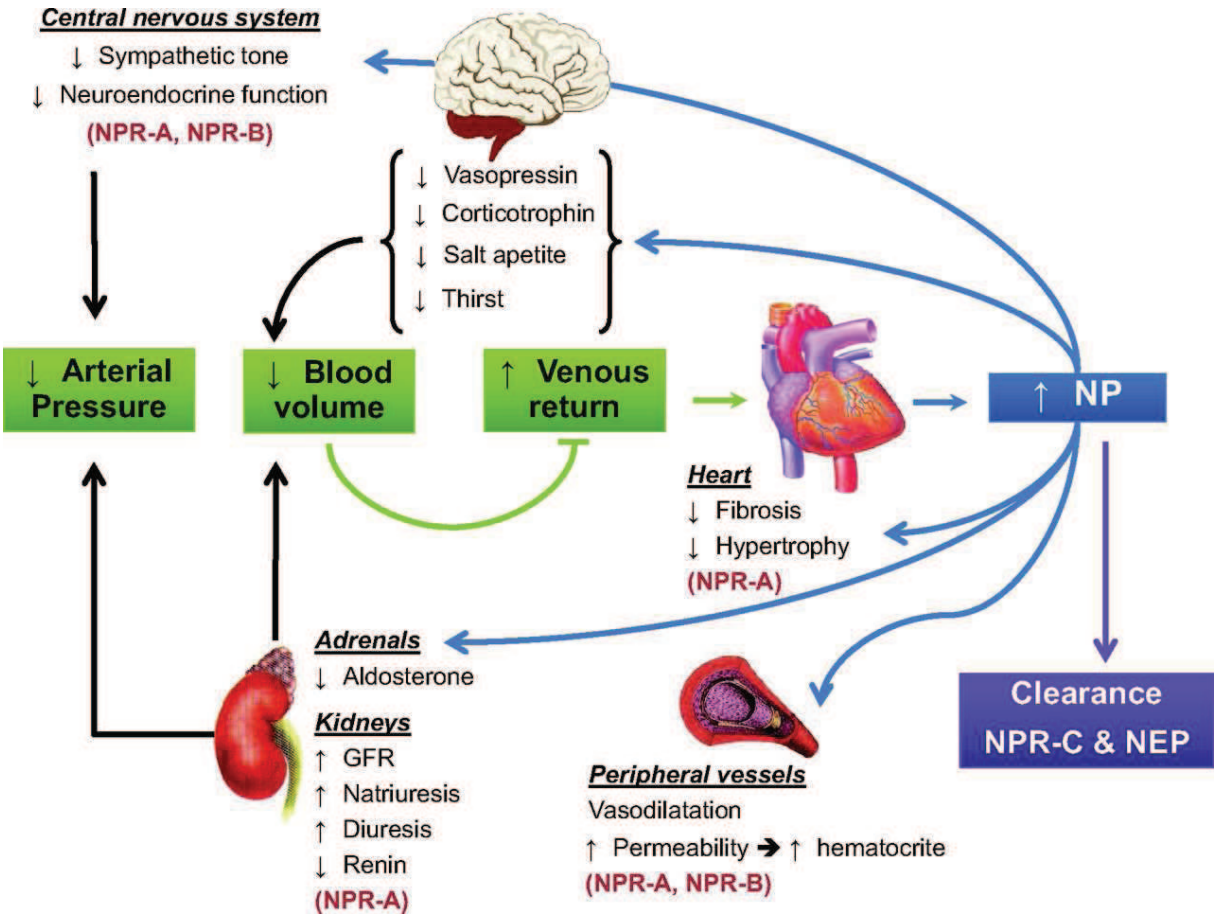


Figure 27 - Effets physiologiques majeurs des NP cardiaques en réponse à des modifications aigues du volume sanguin.(134)

Les effets principaux des NP sont des modifications hémodynamiques par réduction des pressions et volumes sanguins, facilitant ainsi la pré-charge, la post-charge et la fonction cardiaques.

Dans ce qui suit, je vais me concentrer sur les effets physiologiques induits par le BNP, notre hormone d'intérêt.

1) le BNP inhibe le SRAA et ceci en inhibant la synthèse et la libération d'aldostérone et de rénine par une action directe sur la glomérulosa adrénale et sur les cellules juxtaglomérulaires respectivement.(135) L'AngII et l'aldostérone augmentent la rétention hydro-sodée et peuvent en conséquence augmenter la volémie. L'AngII présente également des propriétés vasoconstrictrices puissantes et peut ainsi augmenter la pression artérielle. L'aldostérone a des propriétés pro-hypertrophiques et pro-fibrotiques. Activé en chronique, comme dans l'IC, le SRAA semble alourdir la fonction cardiaque. Le BNP réduit l'efficacité du SRAA et induit alors une augmentation de la natriurèse et de la diurèse et diminue la volémie.

2) le BNP module le SN autonome : comme l'ANP et le CNP, le BNP peut moduler la FC et la PS et faciliter la neurotransmission vagale en sensibilisant les baroréflexes et induire ainsi la bradycardie, d'une manière GMPc-dépendante.(136,137) Le BNP peut également agir sur l'activité du SN sympathique, modulation complexe détaillée dans le paragraphe V.

3) le BNP est vasorelaxant, un effet qui a été montré chez l'Homme et dans des modèles animaux. [89,](138,139) Cet effet peut être exercé indirectement en bloquant le SRAA et/ou directement à travers des effets cGMP/PKGI-dépendants.

4) au niveau cardiaque, le BNP présente des effets autocrines et paracrines :

- Le BNP est anti-fibrotique : les souris déficientes pour le gène du BNP ($Nppb^{-/-}$) présentent des cœurs avec des lésions fibrotiques focales et une fibrose cardiaque exagérée en réponse à une surcharge ventriculaire de pression.(112) Ces effets peuvent être le résultat de l'inhibition du SRAA par le BNP et la diminution de l'aldostérone circulant. Des études ont montré que le BNP peut inhiber la prolifération des fibroblastes cardiaques humains *in vitro* en bloquant la voie TGFβ et la synthèse de protéines de la matrice extra-cellulaire (*e.g.* collagène 1 et fibronectine).(140) De plus, le BNP augmente la perméabilité vasculaire, favorise l'infiltration des neutrophiles et la synthèse et l'activation de la métalloprotéinase matricielle de type 9 (MMP9), une collagénase fortement impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque, en réponse à un infarctus.(141,142) Le BNP intervient donc directement sur le remodelage cardiaque et le mécanisme de cicatrisation après infarctus.

- Le BNP possède des propriétés anti-inflammatoires : une étude récente a montré que le BNP inhibe la chimiotaxie des monocytes *via* son récepteur NPR-A. Mais ces effets ne sont pas observés chez des patients hypertendus ou en IC, suggérant que les mécanismes anti-inflammatoires induites par le BNP sont perdus dans les pathologies cardiaques chroniques.(143)

- Les effets du BNP sur l'hypertrophie cardiaque sont contradictoires. Des études effectuées *in vitro* ont montré que les NP, notamment le BNP, présentent des effets anti-hypertrophiques, qui interviennent *via* l'activation du NPR-A et de la voie GMPc/PKG intracellulaire. La PKG peut phosphoryler et inhiber ainsi l'activité du canal TRPC6 (*transient receptor potential canonical 6*), un canal calcique indépendant du voltage membranaire et activé par le diacylglycérol (DAG), *via* la stimulation des récepteurs Gαq.(144) La diminution de l'entrée de Ca^{2+} à travers ce canal empêche alors la stimulation de la voie calcineurine/NFAT, voie nucléaire pro-hypertrophique activée par un stress de surcharge car-

diaque.(145) Ces effets sont aussi observés avec le sildénafil, un amplificateur du GMPc intracellulaire par inhibition de la PDE5, *in vivo* sur des souris TAC.(146,147) Cependant, en clinique, **le BNP est un marqueur de l'hypertrophie du VG**. Il existe une forte corrélation chez les patients ayant une hypertrophie du VG entre leur taux sanguin endogène de BNP et de NT-proBNP et le degré d'hypertrophie et de dysfonction du VG.(148,149) Ce paradoxe des effets du BNP sur l'hypertrophie cardiaque peut être dû, soit à la désensibilisation des récepteurs NPR-A suite à leur activation chronique par leurs ligands et la perte des effets anti-hypertrophiques, soit le BNP induit lui-même des effets pro-hypertrophiques en chronique dans le cas de pathologies cardiaques. Cette dernière hypothèse reste à valider.

- Effets aigus du BNP sur l'électrophysiologie cardiaque :

- au niveau du tissu de conduction, le BNP, par activation de son récepteur NPR-A, augmente la fréquence de stimulation des cellules *pacemaker* et la vitesse de conduction de l'influx électrique. Au niveau des cellules du NSA, ceci est expliqué par une augmentation des courants de dépolarisation diastolique I_{CaL} et I_f dépendamment de la PDE3.(150)
- au niveau des cardiomyocytes du VG, le BNP altère les flux calciques intracellulaires : le BNP induit une prolongation de la DPA, réduit le courant I_{CaL}, diminue l'amplitude des transitoires calciques et la vitesse de recaptage par SERCA et diminue la contractilité cellulaire.(151,152)

D'après la littérature, on voit alors que le BNP présente des effets contradictoires selon les études (pro-/anti-hypertrophique, pro-/anti-inflammatoire, activation/inhibition du SN sympathique, etc). Ceci peut être lié au modèle utilisé, au temps d'exposition à cette hormone et à la condition physiologique des patients ; sachant qu'il n'existe pas une étude qui décortique les effets chroniques du BNP sur la morphologie et la fonction du cœur sain.

IV- BNP et insuffisance cardiaque

a) Libération du BNP

Les surcharges de volume et de pression et l'étirement des cardiomyocytes sont les stimuli majeurs de libération de l'ANP et du BNP des cardiomyocytes atriaux et ventriculaires, respectivement. Plusieurs autres facteurs tels que le stress chimique (*e.g.* l'exposition aux ROS), le stress métabolique (*e.g.* l'hypoxie et l'ischémie), la tachycardie et des stimulations hormonales comme la NE, l'AngII et l'endothéline (figure 28). L'acteur majeur dans la modulation des NP reste le Ca^{2+} intracellulaire.(153)

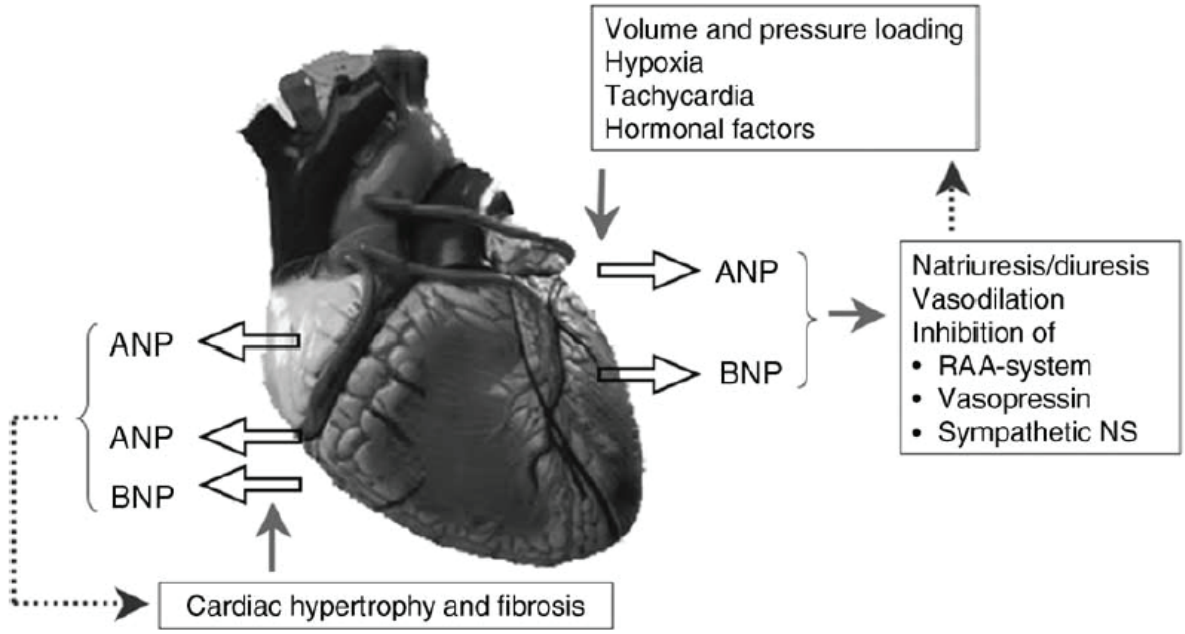


Figure 28 - Régulation et effets des NP cardiaques dans les pathologies cardiaques. Les flèches pleines indiquent une stimulation et pointillées une inhibition.(154)

L'AngII, l'endothéline et les agonistes α1-adr agissent sur des récepteurs couplés à des protéines G. Suite à leur activation, ces récepteurs produisent du DAG et de l'IP_3. L'IP_3 active alors des récepteurs spécifiques au niveau du RS, dits récepteurs à l'IP_3 (IP_3R) ; ceci induit une libération du Ca^{2+} des stocks du RS. L'IP_3 a été documenté comme étant un messager secondaire important dans la voie de transduction impliquée dans la libération des NP. L'antagonisme de ces récepteurs hormonaux et des IP_3R a été associé à une inhibition de la libération des NP.(153)

La stimulation des récepteurs β-adr et l'augmentation de l'AMPc intracellulaire sont également associées à une majoration de la libération de NP, même en absence de stimulation cellulaire.(155) L'inhibition de PKA par le H-89 et de la CamKII par KN-62 réduisent la libération des NP des cellules cardiaques.(156,157)

La stimulation électrique est un activateur puissant de libération des NP. Ainsi, la stimulation électrique croissante de myocytes atriaux néonatals en culture induit une augmentation croissante du Ca^{2+} intracellulaire, associée avec une quantité croissante d'ANP libéré.(158) L'inhibition du canal RyR empêche la libération des NP stretch-dépendante,(159) alors que le blocage de la SERCA par la thapsigargine, et donc l'accumulation du Ca^{2+} dans le cytosol, n'affecte pas cette libération.(160) Ajoutons que l'augmentation du Ca^{2+} extracellulaire,(161) et l'utilisation de l'agoniste du canal LTCC Bay K 8644 (162) induisent une majoration de la

synthèse et de la libération basale et/ou stimulée des NP. En conséquence, la libération cardiaque du BNP est directement liée à l'homéostasie calcique cellulaire.

Comme je l'ai précédemment décrit dans la partie II (sur l'IC), tous ces stimuli (la surcharge de volume et de pression, l'hypoxie, la production de ROS, les libérations hormonales exagérées ainsi que la surcharge calcique intracellulaire) surviennent dans les pathologies cardiaques pendant le remodelage. Ceci accentue la libération et les effets chroniques du BNP.

b) BNP : marqueur de pathologies cardiaques en clinique

Le BNP constitue un marqueur biochimique très couramment utilisé en pratique clinique pour évaluer le risque de développer une IC avant même les premiers signes de dysfonction myocardique.(5) Le niveau plasmatique sanguin de **BNP** est un **indicateur de diagnostic et de pronostic de l'IC**.

Après un infarctus, le taux de BNP augmente selon deux pics de libération distincts (figure 30). L'un intervient pendant les premières heures, en relation avec la chute de la fonction cardiaque, tandis que le second intervient quelques jours plus tard pendant le remodelage.(3)

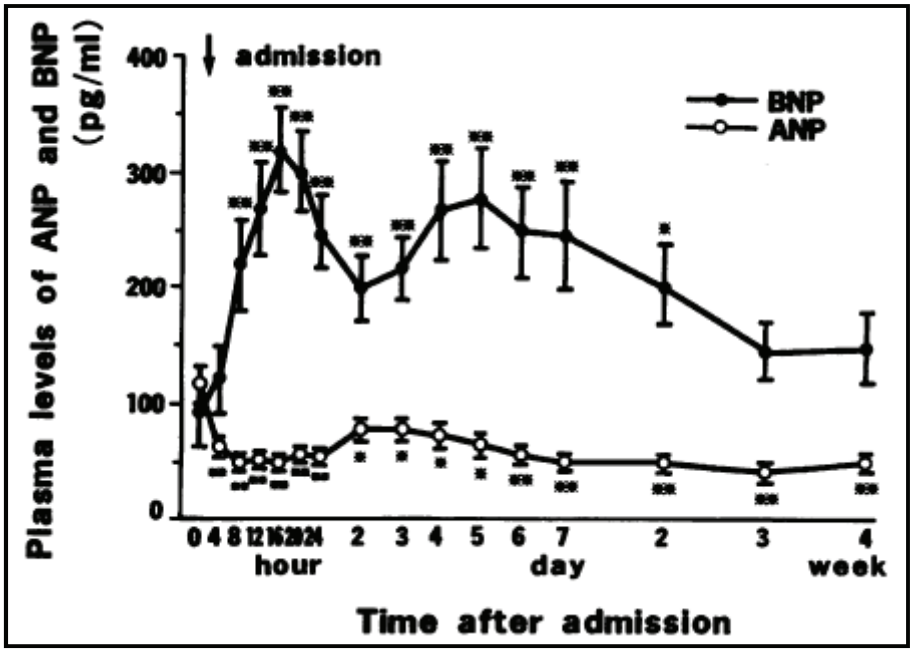


Figure 29 - Cinétique d'augmentation du taux plasmatique sanguin de l'ANP et du BNP chez des patients après un infarctus du myocarde. *p<0,05; **p<0,01.(3)

Les auteurs de cette étude ont montré que le taux d'ANP augmente dans les premières phases suivant la survenue de l'infarctus mais d'environ 3 fois moins celle du BNP (figure 29). Ceci rend le BNP l'acteur majeur de la phase aigue. Le BNP est alors considéré comme un biomar-

queur de la fonction cardiaque et comme une hormone d'urgence. Cette différence d'augmentation entre les taux de BNP et d'ANP peut être due à la durée de vie élevée du BNP par rapport à celle de l'ANP, à l'épuisement du contenu des myocytes atriales en granules d'ANP alors que le BNP est synthétisé et libéré directement dans la circulation sans stockage préalable, cette libération peut également être plus facilement stimulée par la nécrose et l'hypoxie par rapport à celle de l'ANP.

Le deuxième pic de BNP est continu et augmente au fur et à mesure avec la dysfonction ventriculaire et la progression de la pathologie cardiaque (figures 29-30). Le taux sérique de BNP peut augmenter jusqu'à 1000 fois chez les patients en IC congestive par rapport aux sujets sains ; une augmentation qui corrèle étroitement avec la sévérité de l'IC (classification NYHA) (figure 31).(5) Dans les services d'urgence, le taux sanguin de BNP ainsi que l'échocardiographie sont utilisés pour évaluer la fonction cardiaque.(4)

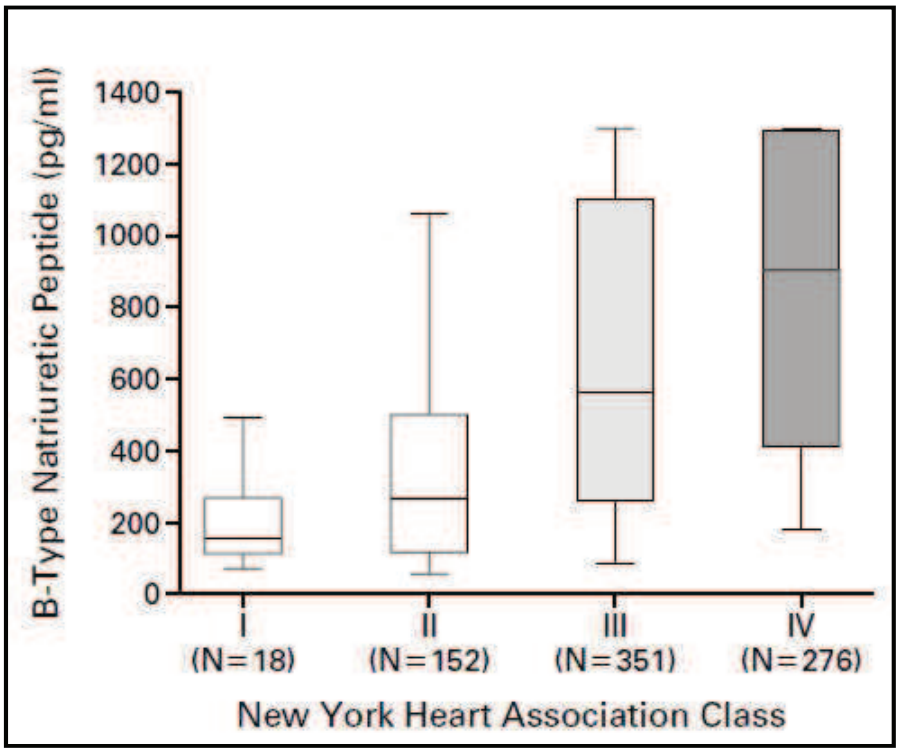


Figure 30 - Boites à moustaches montrant les niveaux médians du BNP chez des patients en IC appartenant aux 4 groupes du classement NYHA.(5)

Dans une étude effectuée par De Lemos et ses collaborateurs, les auteurs signalent une corrélation entre le taux de BNP mesuré chez 2525 patients atteints de diabète et de pathologies vasculaires dans les 3 premiers jours suivant la survenue d'un malaise ischémique et la mortalité dans les 30 jours et les 10 mois suivants (figure 31A).(163) Le taux de BNP a prédit également la survenue d'un nouvel infarctus du myocarde ou l'aggravation de l'IC. Cet effet pronostic du taux de BNP a été également montré dans d'autres études.(164,165) Mais ce taux peut fluctuer avec les traitements. Ainsi, Cohen-Solal et ses collaborateurs ont montré que des

patients en IC aigue décompensée peuvent répondre à des traitements tels que le levosimendan, un sensibilisateur calcique, et la dobutamine, un sympatho-mimétique, par une réduction du taux sérique de BNP.(166) Une réduction importante de ce taux de BNP dans les 5 premiers jours d'hospitalisation est associée à une diminution du risque de mortalité à court (31 jours) et long (180 jours) termes (figure 31B).

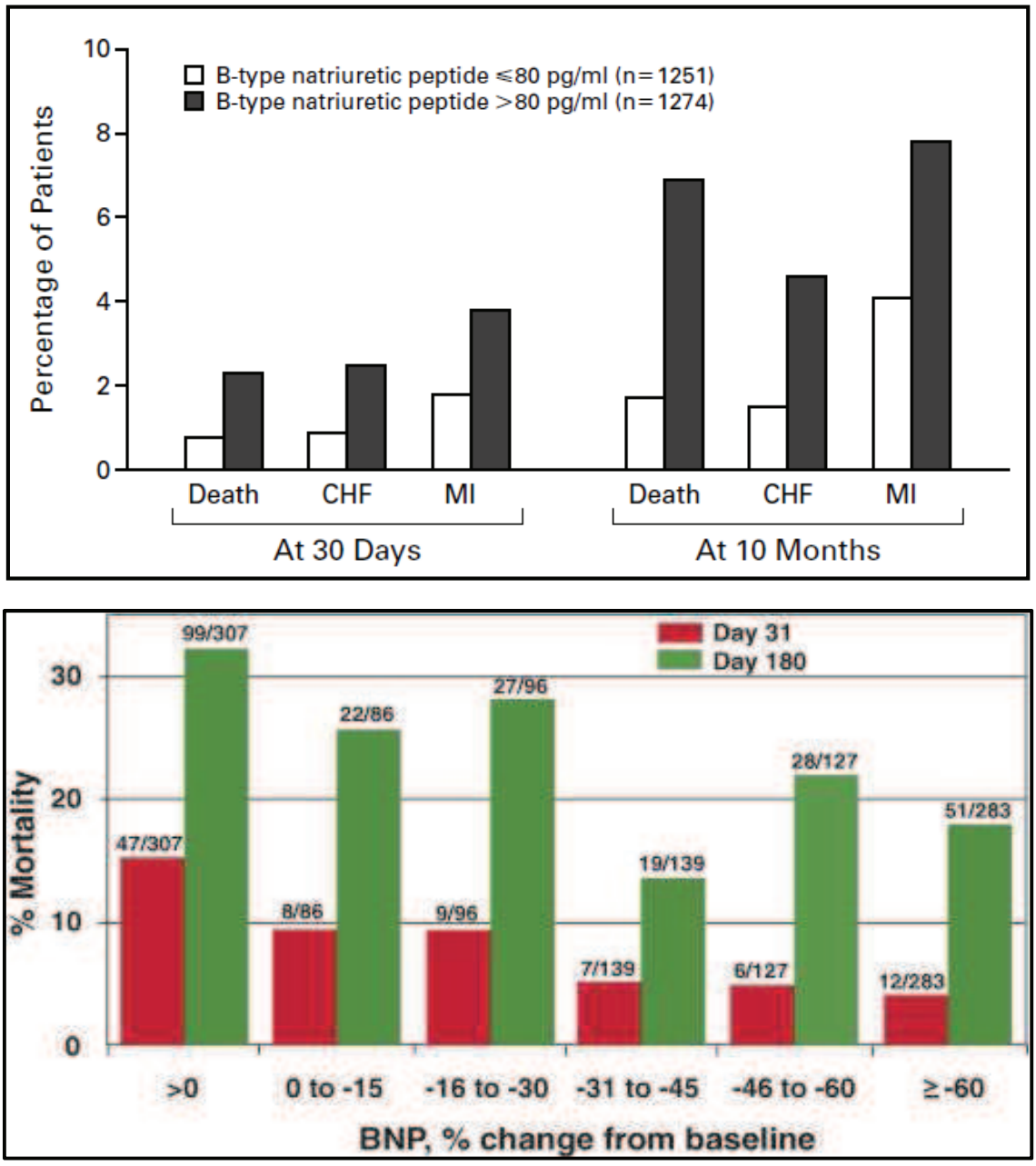


Figure 31 - BNP: évaluateur pronostic de l'IC. (A) Incidence de mort, de survenue d'une IC ou d'un infarctus du myocarde dans les 30 jours et 10 mois en fonction du taux sérique de BNP au moment de l'hospitalisation.(163) (B) Taux de mortalité des patients après 31 et 180 jours par rapport à la diminution du taux de BNP en réponse aux traitements.(166)

Selon toutes ces méta-analyses décrites, la mesure du taux de BNP fournit alors d'importantes informations pour l'évaluation du risque d'un syndrome coronarien aigu et du risque de mortalité à long terme. Le taux de NT-proBNP peut également avoir une valeur prédictive chez les patients en IC.(167,168) Ce taux est d'habitude proportionnel à celui du BNP mais avec des

valeurs plus élevées que celles du BNP, ceci peut être dû à la différence dans la demi-vie des deux peptides.

A noter que le taux de BNP après infarctus du myocarde fluctue entre les 2 pics de libération, ce qui peut donner des valeurs pronostiques fautives.(169) De plus, d'autres pathologies comme l'insuffisance rénale et la dyspnée peuvent modifier le taux de libération de BNP et induire à des imprécisions sur l'état pathologique du cœur.(154) La combinaison de la mesure du taux de BNP avec celle d'autres marqueurs de la fonction cardiaque : la troponine I cardiaque (marqueur de la nécrose des cardiomyocytes) et la protéine C-réactive (marqueur de l'inflammation), chacune fournissant une information unique, pourrait alors avoir une valeur pronostique plus précise.

c) Effets thérapeutiques contradictoires du BNP

Une forme recombinante du BNP humain (le nésiritide : Natrecor® ou Noratak®) a été approuvée par le FDA (*Food and Drug Administration*) aux Etats-Unis en 2001 dans le traitement des patients en IC aigue décompensée. Le nésiritide est généralement administré par perfusion intra-veineuse, à des concentrations comprises entre 0,015 et 0,03 µg/kg/min.

Le nésiritide induit les effets hémodynamiques bénéfiques connus du BNP (figures 27-28) : une dilatation artérielle et veineuse, une diminution de la PS, une augmentation de l'excrétion sodique, une suppression du SRAA et du taux de NE pendant la perfusion.(170,171) Les auteurs de ces études réalisées en double-aveugle ont décrit également une amélioration des paramètres cardiaques par le nésiritide comme l'augmentation significative de la FE.

Le nésiritide utilisé dans le traitement des patients en IC aigue décompensée semble être meilleur que la dobutamine. En effet, la dobutamine pourrait avoir des effets secondaires fatals (tachycardies, arythmies cardiaques, infarctus du myocarde...) alors que le nésiritide semble améliorer le rendement cardiaque sans augmenter ni l'inotropisme ni le chronotropisme.(172,173)

Cependant, d'autres méta-analyses, comparant des patients recevant le nésiritide à d'autres recevant un traitement contrôle dépourvu d'inotropes positifs (traitements avec des vasodilatateurs et des diurétiques), ont montré que le nésiritide pourrait augmenter la morbidité et la mortalité des patients en IC aigue décompensée (figure 32A).(6) Les effets délétères du nésiritide peuvent être expliqués, au moins en partie, par l'aggravation de la fonction rénale, diagnostiquée chez les patients recevant le nésiritide par rapport à un traitement contrôle.(7) Le

nésiritide induit une augmentation du niveau de créatinine sérique et le risque d'intervention médicale et de dialyse qui sont généralement associés à un mauvais pronostic de l'IC.

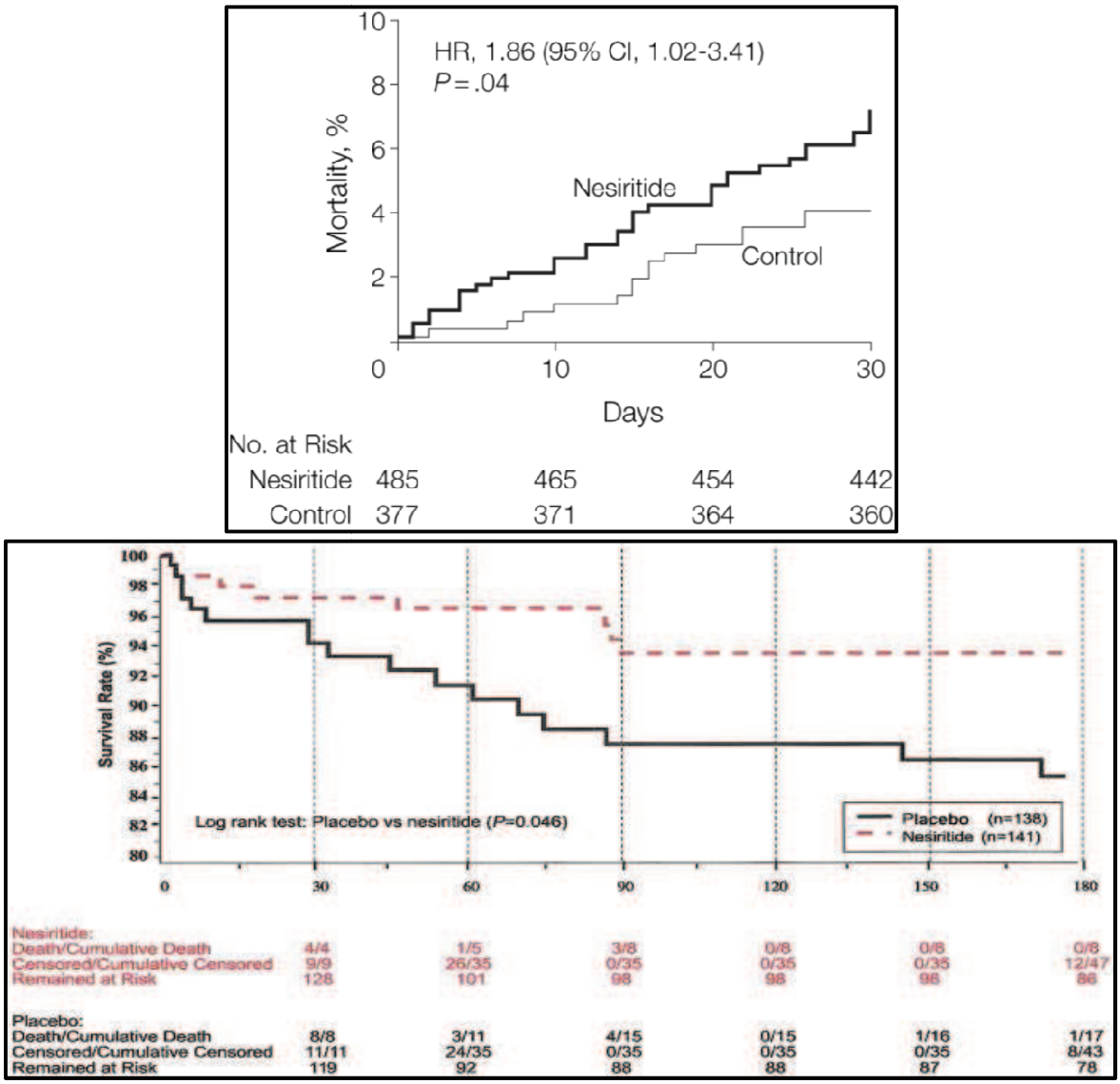


Figure 32 - Courbes de Kaplan-Meyer montrant des effets contradictoires du traitement au nésiritide sur la mortalité au bout de 30 jours de : (A) patients en IC aigue décompensée, (6) et (B) d'autres ayant une dysfonction du VG.(174)

Ces effets délétères du nésiritide ont poussé le Dr. Eric Topol, prévôt du *Cleveland Clinic Lerner College of Medicine of Case Western Reserve University* et président du *Department of Cardiovascular Medicine au Cleveland Clinic*, à remettre en question, en 2005, l'utilité du nésiritide dans les traitements de l'IC, surtout que son coût est "50 fois supérieur à celui des thérapies standards", qu'il existe "un manque de preuve sur la sécurité de ce traitement".(8)

Deux ans plus tard, Mentzer et ses collaborateurs ont observé des effets bénéfiques du nésiritide administré en peropératoire pendant ≈ 30h à des patients ayant une dysfonction du VG et

subissant un pontage aorto-coronarien.(174) En comparaison avec un traitement contrôle, les patients ayant reçu le nésiritide ont une élévation moindre du niveau de créatinine dans le sérum, un meilleur débit urinaire post-opératoires et une augmentation de la survie sur les 6 mois suivant l'intervention chirurgicale (figure 32B).

Pour résoudre le paradoxe des effets thérapeutiques du nésiritide, une méta-analyse récente a été conçue sur une grande échelle (7007 patients dans différents pays : Amérique du Nord, Europe, Amérique Latine et dans la région Asie-Pacifique): l'ASCEND-HF (*Acute Study of Clinical Effectiveness of Nesiritide in Decompensated Heart Failure*). Cette étude a montré que le nésiritide administré à des patients en IC aigue décompensée n'a pas d'effet sur la mortalité ni sur l'incidence de ré-hospitalisation pour IC dans les 30 jours suivant le traitement. Le nésiritide n'est pas associé à une aggravation de la fonction rénale, mais il induit une augmentation de survenue d'épisodes d'hypotension et il contribue à une augmentation du coût des traitements chez ces patients.(175,176)

Ces contradictions peuvent être dues :

- aux différences dans les administrations du médicament : avec ou sans bolus intraveineux, la concentration utilisée (de 0,003 à 0,3 µg/kg/min dans les études présentées), la durée du traitement (30 minutes à 72h),

- à l'hétérogénéité des groupes expérimentaux utilisés dans les méta-analyses du point de vue histoire du patient, son statut sanitaire, son âge, les opérations qu'il a subi, les traitements qu'il a eu avant l'indice étudié,

- au manque de compréhension des effets chroniques du BNP dans les pathologies cardiaques où même les études fondamentales montrent des effets controversées du BNP selon le modèle expérimental utilisé, la pathologie cardiaque et le stade de l'IC étudié.

V- BNP et voie β-adrénergique

Les études fondamentales et cliniques ont montré des effets contradictoires du BNP sur le SN sympathique et la signalisation β-adr. Certains auteurs trouvent que la supplémentation en BNP (nésiritide) chez des patients cardiaques réduit le taux de NE circulant et augmente la variabilité du rythme sinusale (HRV: *Heart Rate Variability*), indicateur de la diminution de l'activité du SN sympathique cardiaque.(177,178) Cependant, d'autres études montrent l'effet inverse.(179) Pour mieux comprendre ces contradictions, je vais détailler dans ce qui suit les

voies connues à travers lesquelles le BNP interagit avec la voie β-adr surtout en conditions pathologiques cardiaques :

a) BNP et libération synaptique de norépinephrine

Une équipe américaine a récemment montré, dans deux études consécutives, que le BNP augmente la libération de NE dans les terminaisons nerveuses sympathiques isolées du cœur (synaptosomes). Cette exocytose de NE dépend du Ca^{2+}, du GMPc et de l'AMPc intracellulaires. Le GMPc active la voie AMPc en inhibant la PDE3 et induit l'exocytose de NE en présence de Ca^{2+} et ceci à travers le schéma suivant: NPR-A → ↗GMPc → PKG —| PDE3 →↗AMPc → PKA → ↗$[Ca^{2+}]_i$ → libération de NE.(180,181) Cette voie peut également être induite par d'autres activateurs de GMPc : l'ANP et le nitroprusside sodique (SNP), un donneur de NO. L'activation chronique du SN sympathique par le BNP pourrait aggraver le remodelage cardiaque dans l'IC.

b) *Cross-talk* GMPc - AMPc à travers PDE2 et PDE3

1- Effets du BNP sur la signalisation AMPc-dépendante

Les NP, en activant les récepteurs NPR-A et NPR-B, augmentent le GMPc intracellulaire. Le GMPc peut agir en modulant la voie AMPc-dépendante en activant et en inhibant les PDE2 et PDE3 respectivement, et peut ainsi modifier la fonction cardiaque.

Qvigstad et ses collaborateurs ont montré que chez des rats PMI, 6 semaines après la ligature, l'activation des récepteurs NPR-B et non NPR-A réduit la contractilité des lambeaux musculaires du VG isolés *via* la PKG. Mais simultanément avec l'activation de la voie β1-adr par la NE, l'activation des récepteurs NPR-B induit des effets inotropes positifs.(128) Ces effets inotropes sont expliqués par une inhibition de la PDE3 par le GMPc intracellulaire, résultant en une diminution de l'hydrolyse de l'AMPc et donc la potentialisation de la voie β1-adr par les NP. Les récepteurs NPR-B présentent une grande affinité pour le CNP, mais peuvent aussi être activés par le BNP à forte concentration, ce qui rappelle la situation dans l'IC. Les effets inotropes négatif et positif n'étant pas induits par les récepteurs NPR-A, malgré l'augmentation du GMPc dans la cellule, ils peuvent être expliqués par une localisation des effets des messagers secondaires et une **compartimentalisation** (figure 33). Dans ce modèle expérimental, la PDE3 joue un rôle prédominant, comme cela a été déjà montré dans des cœurs insuffisants humains.(182) Il est de plus en plus accepté actuellement que dans l'IC, les récepteurs NPR-B augmentent en expression et en activité alors que les NPR-A perdent de leur efficacité dans les modèles animaux aussi bien que chez l'Homme.(130,131) Les mêmes effets inotropes positifs PDE3-dépendants ont été induits par activation du récepteur NPR-B simul-

tanément avec un autre récepteur AMPc-activateur, le récepteur 5-HT4R, mais avec une efficacité moindre.(183) Le 5-HT4R est le récepteur de la sérotonine, il est couplé à une AC et son activité est augmentée dans l'IC.(184) Le NO, en activant les GCs, potentialise les effets des 5-HT4R en inhibant la PDE3 aussi, mais pas la réponse β1-adr. Ceci appuie l'hypothèse de la compartimentalisation, schématisée dans la figure 34. A des stades plutôt précoces du remodelage cardiaque induit par ischémie du VG, la voie GMPc-dépendante tend plutôt à sensibiliser la signalisation AMPc-dépendante et β-adr en particulier.

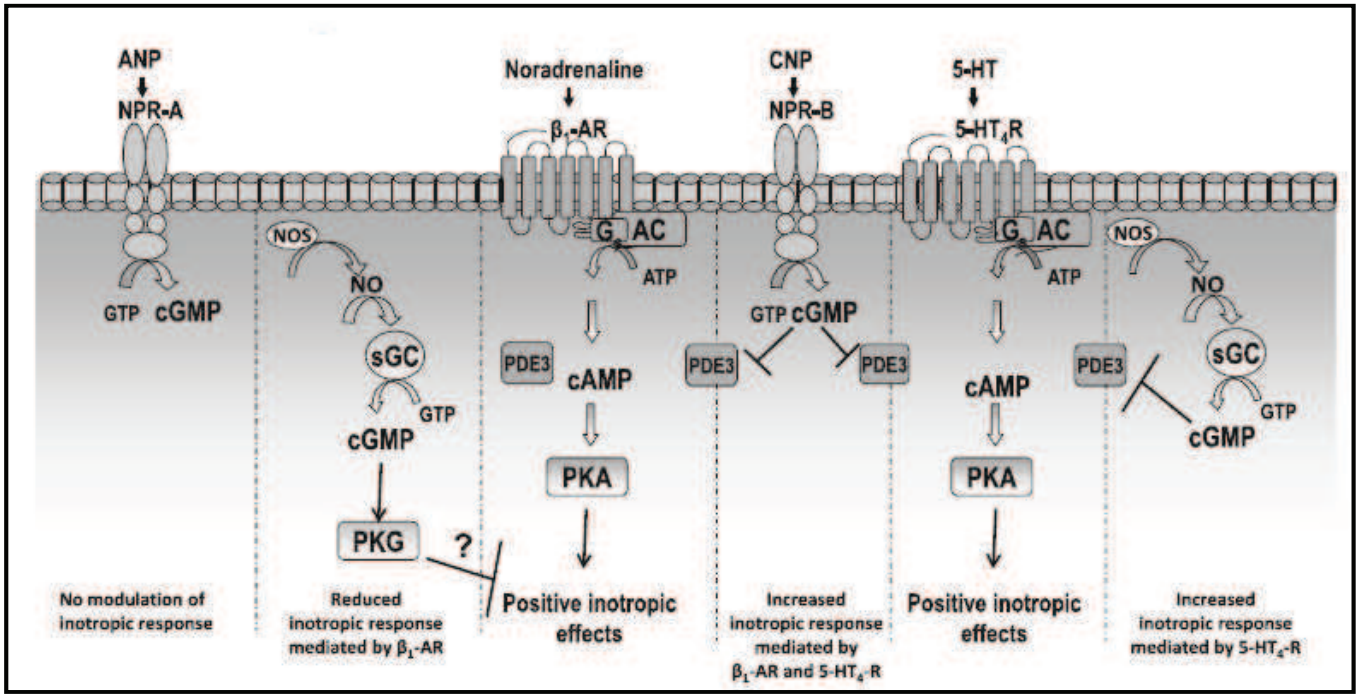


Figure 33 - Schématisation du *cross-talk* GMPc-AMPc dépendant de la PDE3 et de la compartimentalisation dans les cellules ventriculaires dans l'IC.(183)

2- Effets de la norépinephrine sur la signalisation GMPc-dépendante

Dans l'IC, les récepteurs β1- et β2-adr sont « *down* » -régulés alors que les récepteurs β3-adr gagnent en fonction dans les cardiomyocytes ventriculaires (voir le paragraphe III de la deuxième partie de l'introduction). Les récepteurs β3-adr induisent des effets inotropes négatifs, en stimulant la synthèse de NO. Les effets des récepteurs β3-adr sont invalidés chez des souris déficientes pour le gène de l'eNOS (185) et chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique et ayant reçu une infusion de N(G)-monomethyl-L-arginine qui inhibe les NOS.(186) Mongillo et ses collaborateurs ont montré que l'activation des récepteurs β3-adr induit une augmentation du GMPc intracellulaire ; ce messager secondaire active la PDE2 qui hydrolyse l'AMPc. Ceci réduit les effets β1- et β2-adr.(187) Ce *cross-talk* GMPc-AMPc par la PDE2 et dépendant des récepteurs β3-adr est illustré dans la figure 34. En clinique, ces effets

sont recherchés et potentialisés dans certains cas d'IC comme l'insuffisance ventriculaire droite, principalement par l'inhibition de la PDE5 par le sildénafil ; ceci potentialise la voie GMPc en réduisant l'hydrolyse de ce messager.(188)

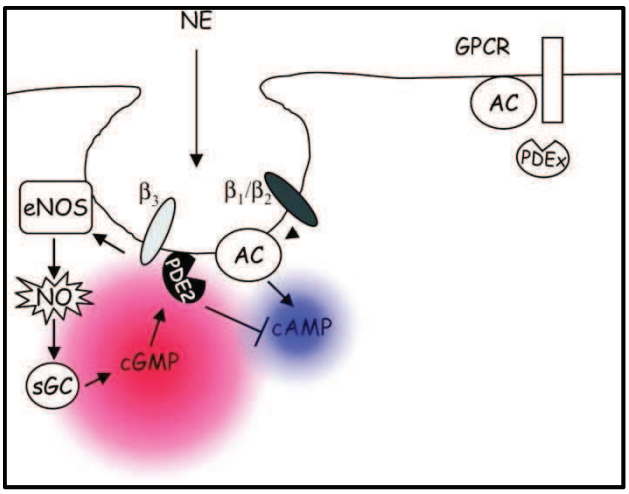


Figure 34 - Représentation schématique de la boucle de rétroaction de la voie β3-adrénergique.(187)

c) BNP et inhibition de la signalisation adrénergique

Le rôle des récepteurs NPR-C semble ne pas se limiter à la clairance des NP. En effet, certaines études ont montré que le NPR-C peut inhiber l'AC en activant une protéine Gi dans le cœur de rat et le muscle lisse gastro-intestinal.(189,190) Les travaux de Rose et ses collaborateurs montrent, en effet, que l'activation aigue de NPR-C réduit les effets β-adr, en diminuant les effets de l'isoprotérénol sur l'augmentation de l'amplitude du courant I_{CaL} (PKA-dépendante) sur les cellules atriales de grenouilles et de la fréquence de décharge spontanée sur les myocytes du nœud sino-atrial.(191,192)

Pour résumer, le BNP présente des effets contradictoires sur la signalisation β-adr cardiaque. En effet, le BNP peut induire plusieurs voies de signalisation dans les cellules cardiaques selon l'emplacement du récepteur, son taux d'expression, le *cross-talk* PDE-dépendant local et l'expression des PDE. Tous ces facteurs sont modifiés en pathologie par rapport à un cœur sain. Ils sont également variables d'une pathologie cardiaque à une autre, et même d'un stade pathologique à un autre. Ceci complexifie la compréhension des effets du BNP et le traitement de l'IC. Ajoutons à cela les effets endocrines du BNP sur d'autres organes tels que le SN, les reins, le tissu adipeux et d'autres, qui vont modifier, à leur tour, la fonction cardiaque et le remodelage. Ceci peut explique les contradictions observées dans la littérature dans les études cliniques mais aussi fondamentales.

VI- Conclusion

En conditions physiologiques cardiaques, le BNP induit plusieurs effets hémodynamiques, comme la vasodilatation, l'inhibition du SRAA, l'augmentation de la natriurèse/diurèse et la diminution de la pression et du volume sanguins. Ces effets empêchent la surcharge de l'activité du cœur et sa fatigue. Mais, en conditions pathologiques, la libération massive et chronique du BNP dans les premières phases suivant un infarctus (hormone d'urgence) et tout au long du remodelage cardiaque présente des effets controverses en recherche fondamentale et en clinique. Le taux de BNP augmente avec la dysfonction du VG et le remodelage cardiaque, il est alors utilisé comme un marqueur de diagnostic et de pronostic de l'IC. De plus, le traitement des patients en IC aiguë décompensée au nésiritide, forme recombinante du BNP humain, a montré aussi des effets contradictoires. Ces contradictions peuvent être dues à la complexité du remodelage cardiaque qui touche aussi bien les récepteurs β-adr que les NPR, à l'étroite liaison entre ces deux voies de signalisation gérée principalement par les PDE, au remodelage de l'expression et de l'activité des PDE, aux différents types d'effets induits par le BNP sur les différents NPR. En chronique, le BNP semble également agir sur la balance hormonale et la fonction de différents organes, notamment les reins et le SN autonome. Au cœur de cette complexe désharmonie créée par le BNP en chronique, quelles seraient les conséquences sur l'hypertrophie cardiaque, sur son activité électrophysioloque, sur les mouvements calciques, le CEC et la survenue d'arythmies? Quels seraient donc les effets chroniques du BNP sur la fonction et sur le remodelage cardiaque en conditions physiologiques cardiaques et après ischémie?

Objectifs du travail

L'objectif de ma thèse est de caractériser les effets cardiaques et le mécanisme d'action d'une exposition chronique de BNP sur les mouvements calciques ventriculaires et les arythmies. Ceci est d'un intérêt majeur pour élucider les mécanismes du remodelage cardiaque s'établissant progressivement au cours de l'IC ischémique, leurs conséquences sur le CEC (arythmies et troubles contractiles pouvant, notamment, résulter d'altérations de la signalisation calcique) et valider/infirmer les potentiels effets thérapeutiques du nésiritide.

Au cours de mes trois ans de thèse, j'ai concentré mes efforts sur l'identification des effets *in vivo* du BNP et les modifications de la signalisation calcique sur deux groupes expérimentaux:

1. Des souris saines afin d'étudier les effets cardiaques spécifiques d'une supplémentation en BNP en absence de pathologie sous-jacente et en absence d'activation des systèmes neurohormonaux compensatoires de l'IC.

2. Des souris PMI ayant subi un infarctus au niveau du VG afin d'étudier les effets du BNP sur le remodelage cardiaque et la progression de l'IC.

Sur ces deux groupes, les effets du BNP sont caractérisés à différents niveaux fonctionnels, allant de l'*in vivo* (échocardiographie, ECG en télémétrie), aux cardiomyocytes (imagerie calcique et contraction cellulaire) et au niveau moléculaire (biochimie).

Les résultats seront présentés en 3 parties principales:

a. Des évidences fonctionnelles sur un rôle actif du BNP sur le remodelage cardiaque et la pro-arythmogénicité suite à une supplémentation chronique de 2 semaines sur des souris saines (cette partie sera présentée en anglais sous forme d'un article).

b. La caractérisation morpho-fonctionnelle de la cinétique du remodelage cardiaque post-ischémique sur des souris PMI, obtenues par ligature chirurgicale de l'artère coronaire descendante gauche. Les conséquences sur l'électrophysiologie cardiaque et le CEC cellulaire sont suivies longitudinalement à 3, 7, 14 et 28 jours après la chirurgie (partie rédigée en français).

c. La caractérisation des effets chroniques du BNP en phase compensatoire sur le remodelage cardiaque post-ischémique. Ces effets sont suivis en longitudinal sur des souris PMI supplémentées ou non au BNP à 7 et 14 jours après la chirurgie (article en soumission).

Méthodologie du travail

I- Modèles expérimentaux

Au cours de ce travail, le modèle animal utilisé est la souris *c57bl6/J* âgée de 7 à 8 semaines et pesant entre 21 et 28 g. Tous les protocoles expérimentaux appliqués sur ces souris sont conformes à la directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil sur la Protection des Animaux du 22 septembre 2010 et sont approuvés par le comité local de recherche animale institutionnel (Languedoc Roussillon, n ° CE-LR-0714).

Le modèle pathologique est un modèle de souris post-infarctus (**PMI**, pour *post-myocardial infarction*). Les souris sont anesthésiées par inhalation d'un mélange gazeux d'isoflurane à 3% (Iso-vet®, *Dechra Veterinary Products*) et d'oxygène à un débit de 1 L/min. Elles subissent par la suite une intubation orotrachéale, sont placées en *decubitus dorsal* sur une couverture chauffante et subissent une ventilation à 1,5% d'isoflurane et un débit d'oxygène à 0,3 L/min, en mode volume et vitesse contrôlés. Une thoracotomie latérale gauche est réalisée au niveau du 3ème espace intercostal. Le péricarde est ensuite déchiré et la ligature de l'artère coronaire principale gauche effectuée. L'artère coronaire est ligaturée ≈1 mm en-dessous de la pointe de l'oreillette gauche, ceci induit à ≈ 70 % d'ischémie du VG (figure 35). L'occlusion complète est visible avec un changement de couleur du myocarde et une dyskinésie immédiats. L'air est ensuite chassé de la cage thoracique avant fermeture. La ligature de l'artère coronaire gauche induit une ischémie irréversible et localisée dans le territoire inférieur du VG. L'IC qui en découle se caractérise par une dilatation ventriculaire et une augmentation de la pression télé-diastolique. Cette technique est décrite plus en détails dans (193). L'évaluation de la qualité de la ligature et de la sévérité de l'IC qui s'en suit est effectuée par échocardiographie.

Les souris contrôles (***Sham***) ont subi les mêmes actes opératoires sans la ligature. Les opérations Sham et PMI ont été réalisées par Cécile Cassan et Patrice Bideaux.

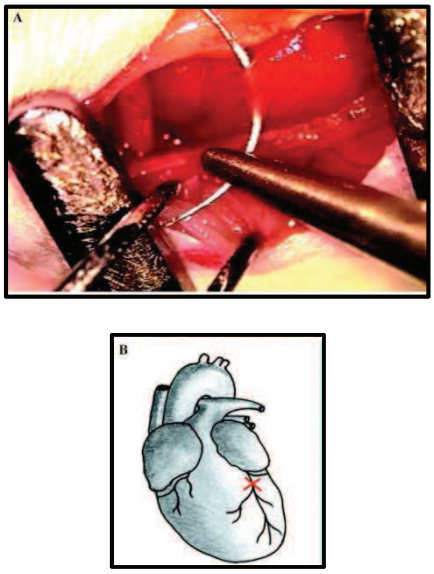


Figure 35 - Illustration de la ligature de l'artère coronaire gauche du modèle souris PMI.(194)

Les limites du modèle PMI :

L'infarctus du myocarde est une pathologie rare, voire anormale, chez les animaux, notamment la souris. Le modèle PMI est induit expérimentalement pour vérifier des hypothèses sur certains mécanismes impliqués dans des pathologies cardiaques humaines. Notre modèle de souris PMI présente alors plusieurs inconvénients : 1) un large infarctus au niveau du VG est recommandé pour induire une IC ; ceci s'accompagne d'un taux de mortalité élevé surtout au cours de la première semaine suivant la chirurgie ; 2) les souris PMI supportent moins bien la ligature quand elles ont subi au préalable d'autres chirurgies exigées par le protocole expérimental, comme l'implantation du capteur de télémétrie et/ou de la pompe osmotique, ce qui a influencé nos études ; 3) la sévérité du modèle nous empêche de détecter au niveau *in vivo* des effets des traitements, vu que la majeure partie du VG est morte et remplacée par la fibrose ; 4) une partie infime de cardiomyocytes du VG, localisés au niveau de la base du cœur, reste vivante et fournit une quantité limitée de matériel nécessaire pour les manipulations cellulaires, mais insuffisante pour la biologie moléculaire ; les *western blot* ont alors été faites sur le tissu entier du VG congelé, ceci pourrait créer un biais entre les résultats cellulaires (obtenus sur les cardiomyocytes) et moléculaires.

Le **BNP murin** (45 acides aminés, *American Peptide Company*) a été administré en chronique aux souris à l'aide d'une micro-pompe osmotique (modèle 1002, *Alzet*, *Charles River*) implantée en sous-cutané en position dorsale (figure 36). Le modèle de pompe utilisé assure une perfusion continue de l'agent pendant 2 semaines et il possède de petites dimensions (1,5 cm de longueur, 0,6 cm de diamètre et 0,4 g de poids), ne gênant pas ainsi l'activité de la souris dans sa cage.

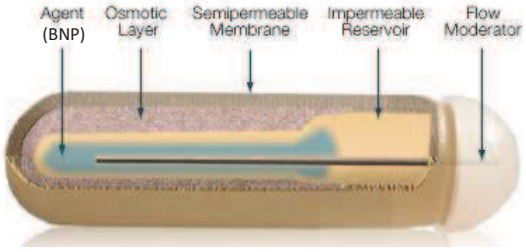


Figure 36 - Illustration d'une pompe osmotique *Alzet* et des différentes parties qui la constituent. (Ref : http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/howdoesitwork.html)

Les pompes osmotiques fonctionnent en raison de la différence de pression existant entre l'intérieur de la couche osmotique (*osmotic layer*), dite manchon de sel, et l'environnement tissulaire entourant la pompe. L'osmolalité élevée du manchon de sel induit une infiltration hydrique dans la pompe à travers sa membrane semi-perméable. Cette eau pénétrant dans le manchon comprime le réservoir flexible et induit ainsi une perfusion de la solution qu'il contient à une vitesse bien définie (0,24 µL/h pour le modèle 1002).

Le BNP est perfusé à 0,03 µg/Kg/min ; cette dose a été choisie pour 2 raisons :

- elle est cohérente avec la dose de BNP humain industriel (nésiritide) administrée en clinique chez des patients en IC aigue décompensée (voir partie introduction),
- au bout de 2 semaines de traitement des souris Sham à cette dose, le taux de BNP plasmatique atteint équivaut celui trouvé chez les souris PMI au stade décompensé de l'IC en absence de stimulation (voir 1ère partie des résultats). Ceci nous a permis de comparer les effets de cette dose de BNP sur cœur sain et cœur malade, en partant d'un modèle contrôle et d'un modèle ischémique connu par ses dérégulations hormonales précoces.

Le **protocole expérimental** suivi au cours de mon travail de thèse est schématisé dans la figure 37. Dans un premier temps, nous avons traité des souris Sham avec du BNP pendant 2 semaines, nous avons étudié ses effets chroniques au niveau cardiaque et comparé à des souris PMI non traitées. Dans un second temps, nous avons effectué un suivi longitudinal de l'évolution du remodelage cardiaque et de la pathologie en mesurant différents paramètres sur des souris PMI. Dans un troisième temps, nous avons suivi les effets du BNP administré aux stades précoces du remodelage cardiaque post-ischémique. Dans un dernier temps, nous avons étudié les effets du BNP sur la phase décompensée de l'IC.

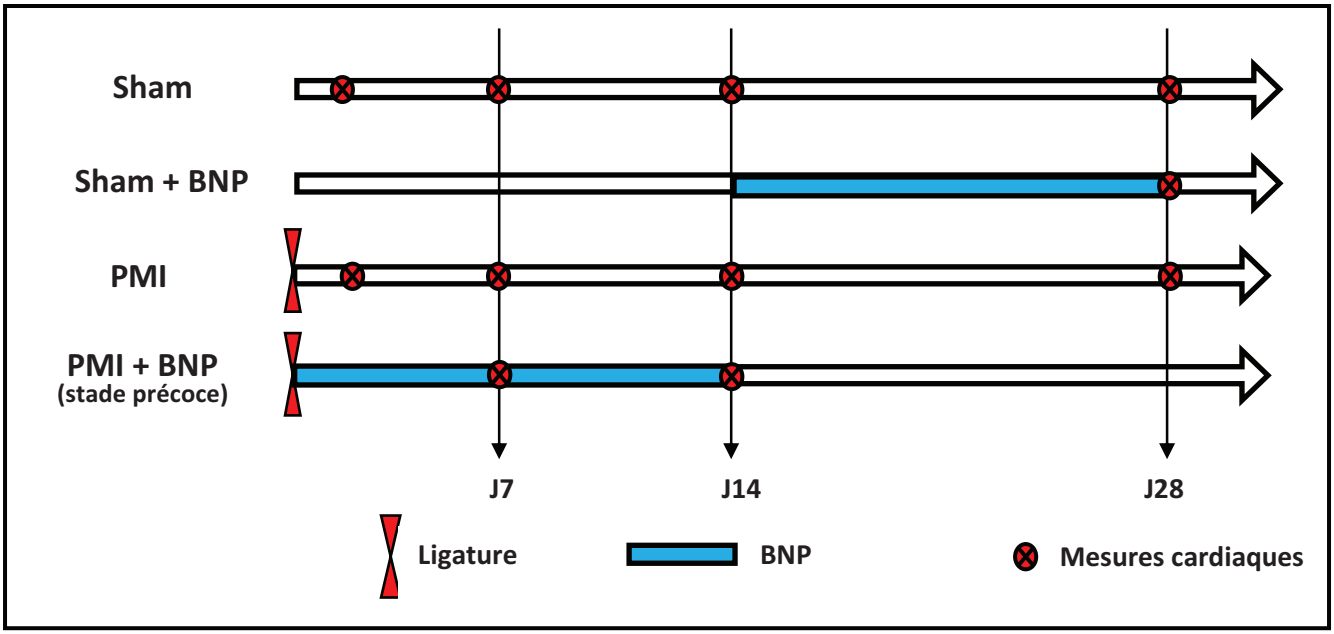


Figure 37 - Protocole expérimental suivi pendant le travail de thèse.

Les différents types de mesures cardiaques appliquées aux niveaux *in vivo*, cellulaire et moléculaire seront détaillés dans ce qui suit de la partie « Méthodologie du travail ».

II- Exploration morpho-fonctionnelle cardiaque

a) Echocardiographie

Dans le but de caractériser les phénotypes morphologiques et fonctionnels cardiaques des différents modèles expérimentaux utilisés, une échocardiographie sur souris éveillée a été réalisée à différents stades suivant les interventions chirurgicales. L'appareil utilisé est un Vivid 7 Pro (*GE Medical System*, USA) équipé d'une sonde linéaire 14 MHz. Une vue 2D parasternale petit axe du VG a été obtenue au niveau des muscles papillaires, puis les paramètres morphologiques du VG ont été mesurés à partir d'une coupe temps-mouvement tracée perpendiculairement aux parois antérieures et postérieures du VG. La fraction de raccourcissement (FR) a été calculée de la façon suivante : FR = [(Did-Dis)/Did x 100] où Did et Dis sont respectivement le diamètre interne de la cavité du VG en diastole et en systole. Le débit cardiaque (DC) a été calculé de la façon suivante : $DC = FC \times ITV \times Ao^2 \times \pi / 4$ où FC est la fréquence cardiaque, ITV l'intégrale temps-vitesse du flux aortique mesuré par Doppler dans une vue suprasternale, et Ao le diamètre de l'aorte mesuré en systole dans une vue parasternale grand axe. La vitesse maximale de l'onde E a été mesurée par Doppler dans une vue parasternale grand axe. Les échographies ont été effectuées par Cécile Cassan et Charlotte Farah.

b) Electrocardiographie en télémétrie

Les enregistrements Holter sont effectués chez la souris vigile et libre de ses mouvements à l'aide d'un système télémétrique.(195)

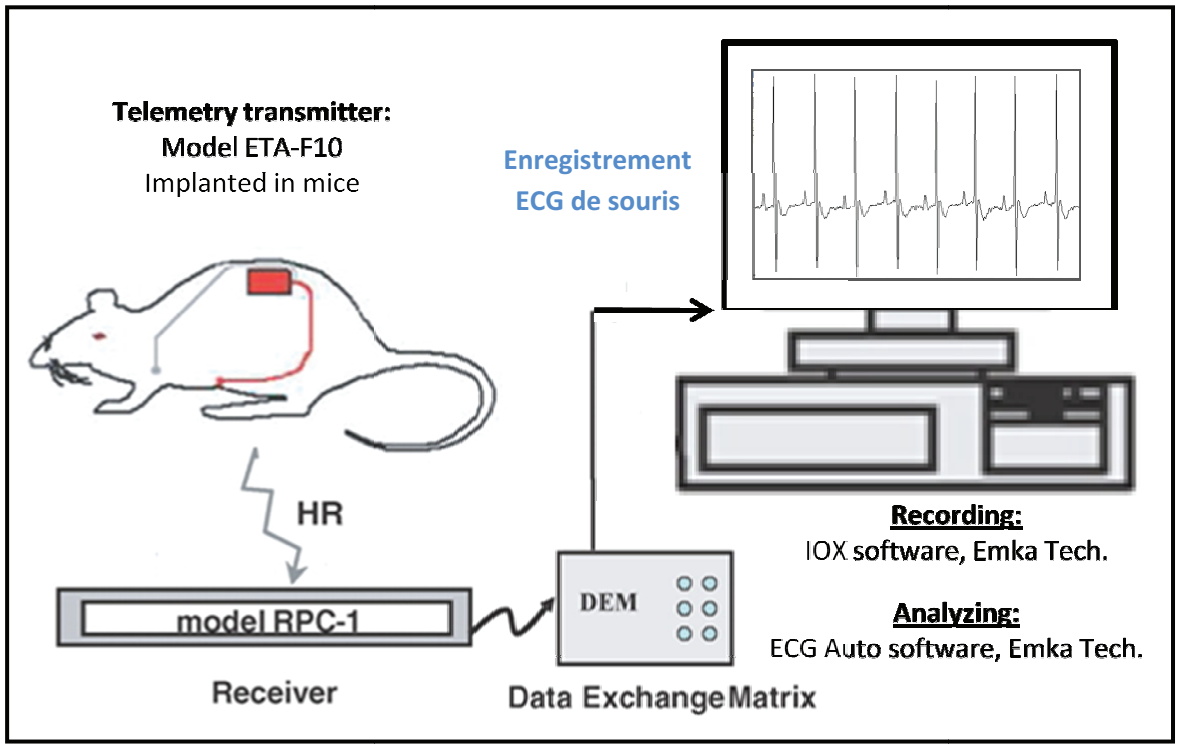


Figure 38 - Système télémétrique d'acquisition des ECG chez la souris. Modifiée de (196)

Le système d'acquisition de l'ECG chez la souris est composé de deux parties principales : un télé-transmetteur (le capteur) et un récepteur (la plaque) (figure 38).

Le transmetteur bipolaire ETA-F10 ou F20 (*Data Sciences International*, USA) est implanté en sous-cutané en position dorso-latérale suivant une dérivation DII chez l'Homme. Le capteur de télémétrie est composé d'une batterie, d'un amplificateur, de composants nécessaires pour la radio-transmission et de deux électrodes flexibles, en acier inoxydable, le tout est recouvert de silastic® biocompatible. Il permet l'enregistrement des ECG *in vivo* en temps réel. Les capteurs ETA-F10 et F20 pèsent moins de 4 g chacun, ceci permet une mobilité normale de la souris implantée. La chirurgie d'implantation du capteur se fait en conditions d'asepsie sur l'animal sous anesthésie générale. Pour cela, les souris sont anesthésiées par inhalation sous isoflurane (Iso-vet®, 1 - 2%, débit d'O_2 à 0,4 L/min), et placées sur une couverture chauffante. Trois incisions sont pratiquées pour recevoir le transmetteur et les électrodes unipolaires :

- Dans la zone dorsale postéro-médiane : logement du corps de l'implant

- Sous la patte avant droite : électrode négative (blanche)
- Sous la grille costale gauche : électrode positive (rouge)

Les plans cutanés sont par la suite suturés et les souris placées dans des cages individuelles pour s'accoutumer.

L'émetteur de télémétrie implanté chez la souris transmet les variations de signaux sous la forme d'un signal amplifié à un récepteur (RPC1) placé sous la cage de l'animal. Les différents signaux recueillis sont ensuite transmis à une matrice de conversion transformant ces signaux radio en impulsions électriques. Les données numériques sont stockées et envoyées vers un ordinateur. Ces données peuvent être facilement visualisées en temps réel avec le logiciel IOX2 (*EMKA Technologies*, France) disponible dans notre laboratoire. Les signaux sont enregistrés en continu pendant 24h, au minimum une semaine après l'implantation des capteurs. L'acquisition est faite à une fréquence de 2 kHz, avec un filtre numérique de 0,1 à 1 kHz qui supprime le « bruit » de fond. Les animaux doivent suivre un rythme clair-obscur synchronisé 12h - 12h pour conserver leur rythme circadien.

Le système d'analyse ECG Auto (*EMKA Technologies*, France) permet de mesurer la durée des intervalles PR, QRS et QT, la FC, de visualiser les arythmies et d'analyser les différents paramètres de la variabilité du rythme sinusal (dite HRV pour *Heart Rate Variability*).

III- Manipulations cellulaires

a) Isolement des cellules cardiaques

L'isolement des cellules cardiaques de souris constitue une étape clé pour la suite des manipulations au niveau cellulaire. La qualité des cellules obtenues peut influencer les résultats au niveau des mouvements calciques et du CEC.

La technique d'isolement cellulaire utilisée suit un protocole standard basé sur la digestion enzymatique de la matrice extracellulaire,(197) et elle est utilisée depuis longtemps dans notre laboratoire.(198) Nous la réalisons par perfusion rétrograde sur le système de Langendorff, initialement créé par le physiologiste allemand Oskar Langendorff, en 1895. Les étapes principales de cette procédure sont illustrées dans la figure 39.

La souris est dans un premier temps euthanasiée par dislocation cervicale. Le cœur est vite retiré après thoracotomie et placé dans une solution saline (dite Tyrode 1) héparinée et dépourvue de Ca^{2+} (contenant en mM: 113 NaCl ; 4,7 KCl ; 0,6 KH_2PO_4 ; 0,6 Na_2HPO_4 ; 1,2

$MgSO_4$-$7H_2O$; 12 $NaHCO_3$; 10 $KHCO_3$; 10 HEPES ; 30 Taurine et 5,5 glucose). Le cœur est ensuite canulé par l'aorte sur un dispositif de perfusion.

Lors de la perfusion, le cœur est lavé pendant quelques minutes avec la solution Tyrode 1 de perfusion à ≈37°C. La paroi cardiaque est ensuite digérée avec un mélange d'enzymes (0,05 g/L, Liberase TH®, *Roche diagnostics*, France) en solution dans le Tyrode 1 jusqu'à digestion des valves aortiques, marquée par accélération du flux sortant du cœur (généralement au bout de 5 – 6 min de perfusion). La libérase® est formée d'un mélange standardisé contenant principalement différents isoformes de collagénases et des protéases neutres purifiées. Cette digestion enzymatique est complétée par une digestion mécanique : le VG est découpé en morceaux et aspiré avec une pipette dans la solution « STOP1 » (0,1 mM sérum de veau fœtal SVF et 5 mM BDM dans la solution Tyrode 1). L'activité de l'enzyme est arrêtée par le SVF et par sa dilution dans la solution STOP1. La contraction cardiaque est bloquée pendant les différentes étapes d'isolement cellulaire en abscence de Ca^{2+} dans la solution saline utilisée et par ajout du BDM (2,3-Butanedione monoxime) dans la solution de digestion (10 mM) et dans le STOP1 (5 mM) ; le BDM étant un inhibiteur de la myosine-II des muscles squelettiques *via* l'inhibition de l'activité de l'ATPase spécifique de cette protéine contractile.(199)

Les cellules myocardiques subissent ensuite une remontée progressive de la concentration en Ca^{2+} jusqu'à atteindre 1 mM dans la solution « STOP2 » (0,05 mM SVF dans la solution Tyrode 1). A la suite de cette étape finale, nous vérifions le rendement de l'isolement et la qualité des cellules au microscope. Le reste des manipulations sur ces cellules est poursuivi seulement si le nombre des cellules vivantes et intactes est important, le reste des manipulations sur ces cellules est poursuivi. Les cellules du VG sont laissées au « repos » pendant 30 min – 1h pour qu'elles « déstressent », restructurent leur membrane plasmique dégradée par la digestion et pour qu'elles s'adaptent au nouveau milieu dans lequel elles baignent. Elles sont gardées à température ambiante pendant toutes les manipulations suivantes (3 à 5 heures).

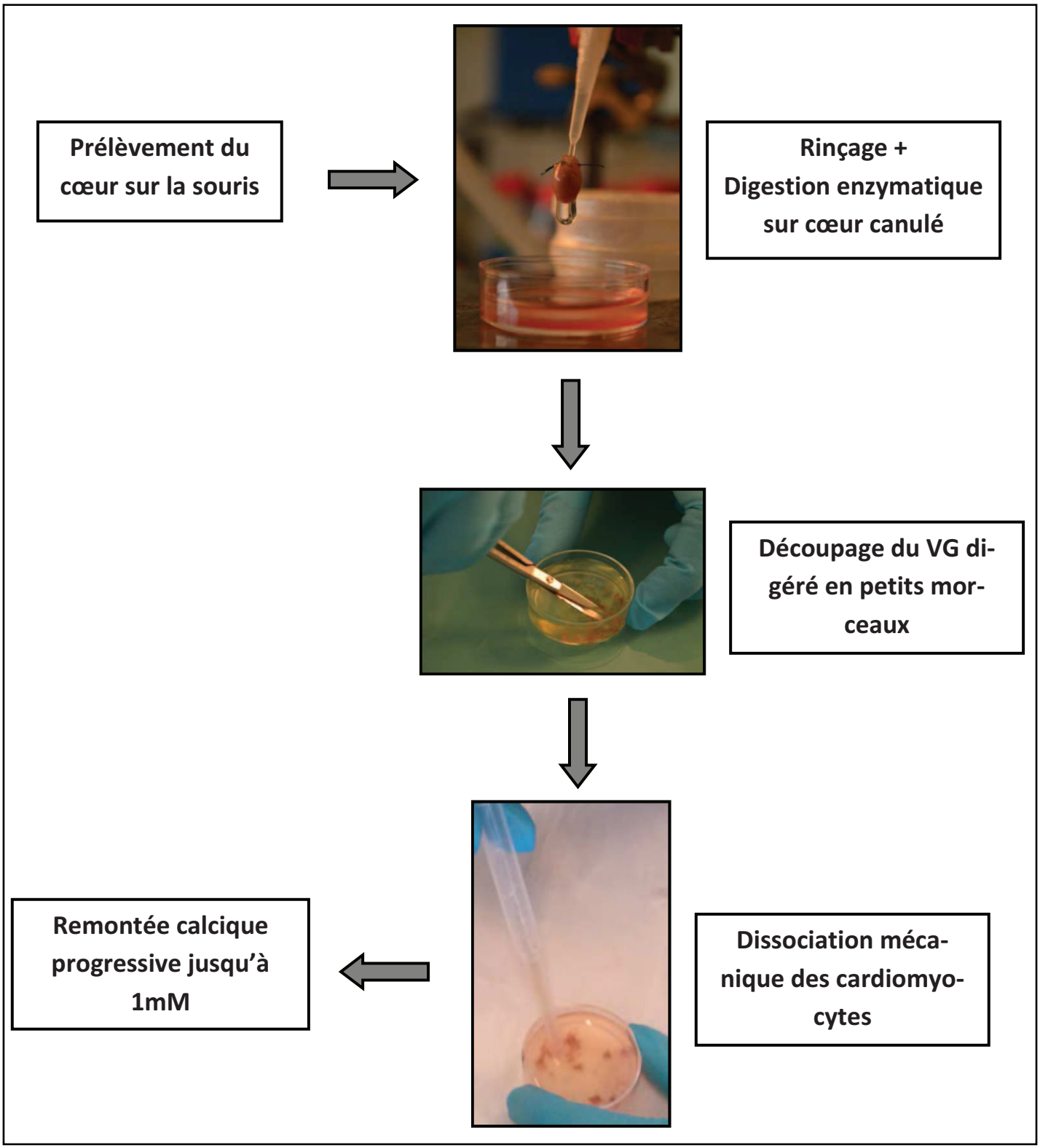


Figure 39 - Etapes principales de l'isolement des cellules cardiaques du VG.

b) Techniques d'imagerie calcique

1- Les marqueurs calciques utilisés

Il existe une multitude de marqueurs calciques fluorescents avec des propriétés différentes. Suivant l'indicateur utilisé, la fixation au Ca^{2+} modifie :

- Soit la longueur d'onde (λ) d'excitation du fluorophore sans modifier la λ d'émission (*e.g.* Fura-2, Fluo-3, Fluo-4)
- Soit la λ d'émission sans modifier la λ d'excitation (*e.g.* Indo-1).

Deux types de sondes calciques fluorescentes ont été utilisés pendant mon travail de thèse pour étudier différents paramètres du Ca^{2+} intracellulaire : le Fluo-4 AM et l'Indo-1 AM. Le groupement acétoxy-méthylester (AM) permet de rendre lipophiles les sondes et de traverser la membrane cellulaire. Les estérases cytosoliques hydrolysent par la suite la fonction ester et piègent la sonde dans la cellule.

Le Fluo-4 est un fluorochrome utilisé en simple excitation (λ = 488 nm) et simple émission qui augmente au contact d'une concentration croissante en Ca^{2+} (λ_{max} = 506 nm). La fluorescence émise par le Fluo-4 peut augmenter d'une intensité supérieure de 100 fois lorsqu'il se lie au Ca^{2+}. Le Fluo-4 se lie au Ca^{2+} avec une meilleure affinité que l'Indo-1 et un K_d = 345 nM. Cette propriété nous a permis de l'utiliser pour la mesure des libérations de quantités infimes de Ca^{2+} au cours des *sparks* calciques. Le fluo-4 a également été utilisé pour la mesure des transitoires calciques. Mais la charge calcique mesurée avec le Fluo-4 dépend de la charge cellulaire en sonde. Cette barrière est affranchie par l'utilisation d'une sonde ratiométrique.

L'Indo-1 est un fluorochrome ratiométrique utilisé en simple excitation (UV, λ = 360 nm) et double émission (λ = 480 nm et 405 nm). La fluorescence à 480 nm est émise par la forme libre de l'Indo-1 et celle à 405 nm par la forme liée au Ca^{2+}. Ainsi, quand la concentration intracellulaire en Ca^{2+} augmente, l'amplitude du pic à 480 nm va baisser alors que celui à 405 nm va augmenter. Le rapport F405/480 reflète alors la concentration en Ca^{2+} intracellulaire dans une gamme de concentration comprise entre 5 nM et 30 µM et une constante de dissociation K_d = 0,23 µM. Ceci permet de ne tenir compte que de la concentration en ion à mesurer indépendamment des concentrations en fluorochrome et de la photolyse de la sonde. Les caractéristiques intrinsèques de l'Indo-1 nous ont permis de l'utiliser pour l'étude du niveau basal de Ca^{2+} dans le cardiomyocyte par sa propriété ratiométique ainsi que pour la mesure du transitoire calcique grâce à sa sensibilité à des concentrations calciques élevées.

Au cours de nos études, nous avons utilisé deux dispositifs expérimentaux : un système de microscopie photonique avec l'indicateur Indo-1 AM et un système de microscopie confocale avec le Fluo-4 AM. Les cellules du VG fraichement isolées sont incubées dans 2 µM d'Indo-1 AM (*Invitrogen*) pendant 30 min ou dans 4 µM de Fluo-4 AM (*Invitrogen*) pendant 20 min. Au cours des manipulations cellulaires microscopiques, les cellules baignent dans une solution de Tyrode 2 à concentration calcique et pH physiologiques (contenant en mM : 117 NaCl ; 5,7 KCl ; 4,4 $NaHCO_3$; 1,5 KH_2PO_4 ; 1,7 $MgCl_2$ heptahydraté ; 21 HEPES ; 1,8 $CaCl_2$ et 11 glucose).

2- Mesure de la signalisation calcique intracellulaire et de la variation de longueur des sarcomères

La technique d'imagerie calcique permet d'étudier le couplage entre la quantité de Ca^{2+} cytosolique mesurée à l'aide de la sonde Indo-1 et la contractilité des cardiomyocytes en condition isotonique.

Les cellules sont placées dans une cuve contenant la solution physiologique à 1,8 mM Ca^{2+} et sont stimulées électriquement par des électrodes de platine. Les signaux sont enregistrés par le système IonOptix (Boston, USA), qui permet de mesurer simultanément la fluorescence émise par l'Indo-1 et la longueur des sarcomères par analyse d'image. Les transitoires calciques et le raccourcissement des sarcomères sont alors enregistrés en parallèle sur une cellule stimulée électriquement en temps réel grâce au dispositif présenté dans la figure 5. Un microscope photonique inversé est utilisé (Zeiss 40x oil, 0,36 µm/pixel), il est équipé d'une caméra numérique (250 Hz) et de deux photomultiplicateurs (PM). L'ensemble du dispositif est monté sur une table anti-vibratoire pour limiter les vibrations.

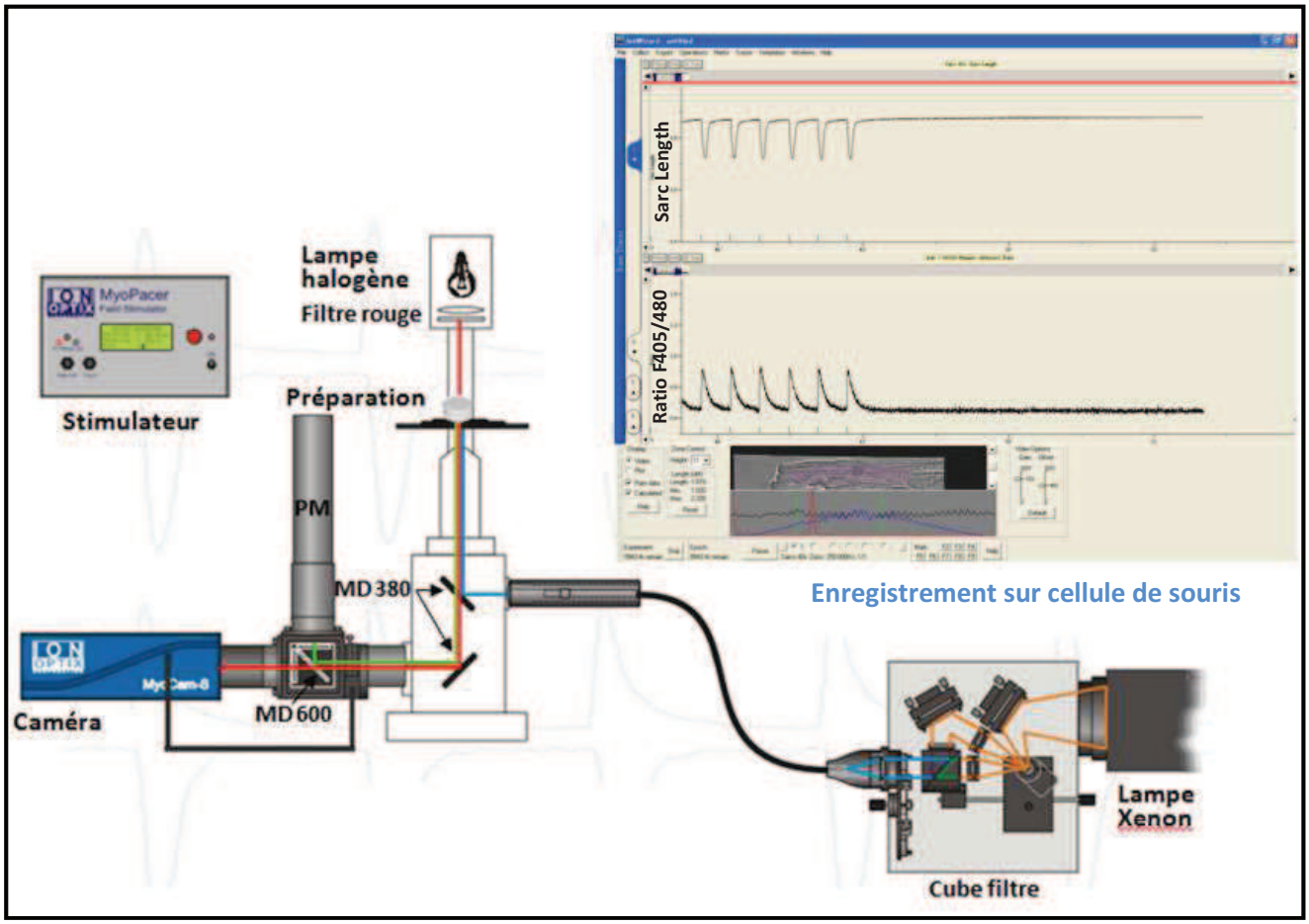


Figure 40 - Dispositif du système Ionoptix muni d'un microscope à fluorescence utilisé dans l'étude du CEC sur des cellules chargées en Indo-1 AM. Le cube filtre contient: un filtre diviseur, un obturateur et un filtre interférentiel; MD: miroir dichroïque; PM: photomultiplicateur. Le faisceau bleu est la lumière Xénon filtrée (λ = 360 nm); le rouge schématise la lumière rouge émise par la lampe halogène filtrée (λ > 600 nm) et le vert la fluorescence émise par la préparation (λ = 405 et 480 nm). Modifié de Ref : http://www.ionoptix.com/products/calcium_and_contractility_myocytes

L'excitation de l'Indo-1 est assurée par une lampe Xénon (75 W, λ = 300 à 700 nm). Pour réduire la photolyse de la sonde au cours de l'expérimentation, un filtre diviseur neutre et un obturateur sont placés entre la lampe et l'objectif (figure 5). Le filtre diviseur reçoit la lumière émise par la lampe et permet le passage d'une certaine proportion du spectre originel pour atténuer le signal. L'obturateur est contrôlé de manière à s'ouvrir au début de l'acquisition du signal calcique et à se refermer à la fin de celle-ci. Un autre filtre existe: le filtre interférentiel; il assure le passage de la longueur d'onde d'excitation λ = 360 ± 5 nm. Un miroir dichroïque (MD) à 380 nm permet de diriger l'excitation vers la préparation et de recueillir toutes les λ > 380 nm c'est-à-dire la fluorescence de la préparation ainsi que l'image de la cellule éclairée en lumière rouge par une lampe halogène tamisée par un filtre rouge (λ > 600 nm). Cette lumière est dirigée vers un circuit de mesure. Dans le circuit de mesure, un MD à 600 nm sépare la lumière qui va vers la caméra CCD (λ > 600 nm) de celle qui va vers les PM (λ < 600 nm).

Ensuite, les signaux de fluorescence à $\lambda < 600$ nm sont séparés par un MD à 455 nm et projetés sur les 2 PM qui collectent la fluorescence à $\lambda = 410 \pm 10$ et 480 ± 20 nm après passage des signaux au travers de filtres interférentiels de 405 et 480 nm respectivement. Le rapport des tensions de sortie des 2 PM est effectué par un diviseur analogique. L'acquisition et l'analyse du ratio d'émission de l'Indo-1 et de la longueur des sarcomères sont réalisées sur le logiciel IonWizard.

La mesure du Ca^{2+} intracellulaire est alors basée sur le ratio des 2 fluorescences émises par l'Indo-1 entre ses états libre et lié au Ca^{2+} (F405/480).

L'éclairage des cellules par la lumière rouge assure la visualisation des sarcomères sans abimer la sonde fluorescente ni les signaux émis par cette sonde. La mesure de la longueur des sarcomères s'appuie sur la structure en alternance des bandes claires et sombres des protéines contractiles (actine et myosine) qui peut être assimilée à une fonction périodique T dans l'espace. L'analyse se fait par la transformée de Fourier rapide (FFT pour *Fast Fourier Transformation*) qui transforme le signal périodique T en une fréquence 1/T. La FFT transforme alors le signal périodique en un spectre de fréquence 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 contraction d'une cellule cardiaque qui est de l'ordre de 200-300 ms. L'analyse s'effectue à l'aide d'une fenêtre d'acquisition en temps réel.

Les protocoles suivis au cours des différentes manipulations sont les suivants:

✓ Pour la mesure de différents paramètres des transitoires calciques et du raccourcissement des sarcomères (amplitude, vitesse, durée..), les cellules dans la cuve subissent des stimulations électriques à 1 Hz pendant ≈ 30 s, par des électrodes de platine (20 V; 2 ms).

✓ La mesure de la longueur basale des sarcomères et de la concentration calcique basale dans le cytosol est effectuée en fin d'une période quiescente de 30 s.

✓ Pour l'évaluation du contenu du RS en Ca^{2+}, ce compartiment est déplété au profit du cytosol par une forte concentration en caféine (10 mM), activateur puissant des RyR, appliquée dans le milieu. La sonde va alors capter le Ca^{2+} et manifester un transitoire calcique dont nous analyserons l'amplitude.

✓ Les arythmies étant rarement déclenchées dans les cellules cardiaques de souris, elles sont évaluées sur une phase de quiescence de 30 s selon 2 protocoles de « stress » :

- stimulation à 3 Hz - arrêt 30 s - en conditions basales
- stimulation à 1 Hz - arrêt 30 s - après application de 10 nM d'isoprotérénol, un agoniste β-adr.

3- Mesure des *sparks* calciques

Les *sparks* calciques, correspondant à des libérations locales de Ca^{2+} par un petit réseau de RyR, existent dans tous les types musculaires. Cette activité spontanée peut être mesurée sur des cardiomyocytes du VG fraichement isolées, chargées avec l'indicateur Fluo-4 AM et en phase de quiescence. La fluorescence est mesurée sur un microscope confocale inversé couplé à une source laser (Zeiss, 63x oil, LSM 510).

La microscopie confocale consiste, par la présence d'un diaphragme (*pinhole*) placé en amont du PM, à enregistrer uniquement la lumière émise dans un plan focal déterminé (figure 41).

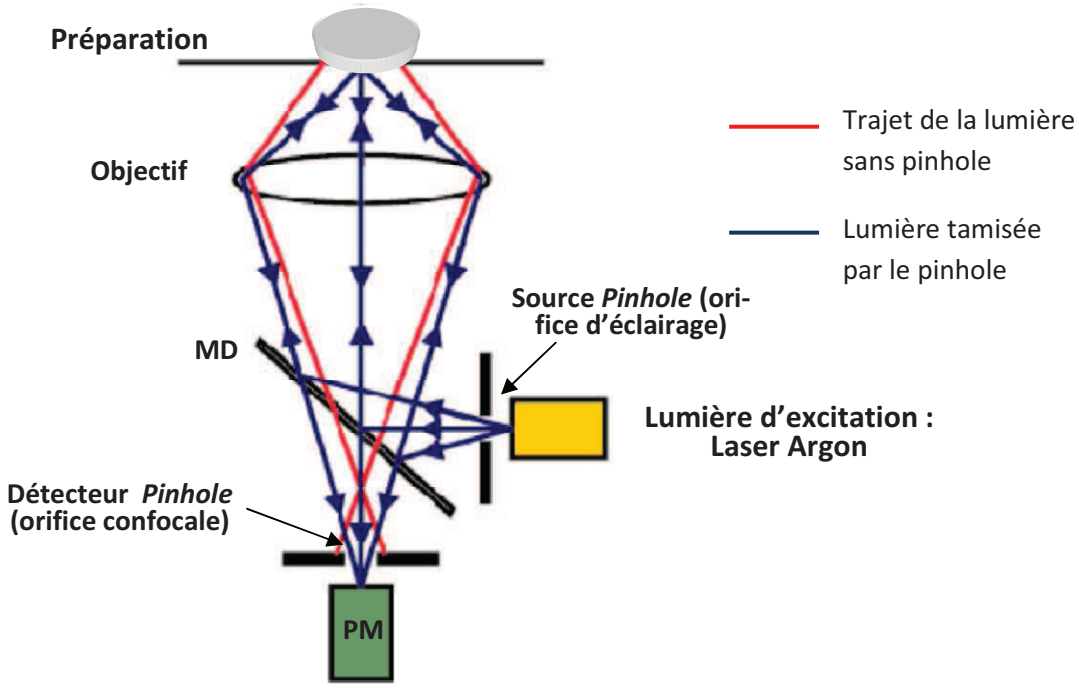


Figure 41 - Représentation schématique du trajet de la lumière dans un microscope confocal inversé. Le *pinhole* permet de rejeter toute lumière contaminante provenant de zones non focalisées.

Le rayon laser excitateur (λ = 488 nm) pénètre dans l'échantillon marqué avec le Fluo-4. Grâce au diaphragme *pinhole* qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage des longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection par PM.

Les *sparks* calciques sont mesurées en mode balayage linéaire, sur une ligne faisant 50 µm placée le long de l'axe de la cellule, grâce au système AIM4.2 (figure 42). La fréquence d'acquisition par ligne est fixée à 1,54 ms/ligne ; 512 pixels x 3000 lignes. Dix images sont

enregistrées par cellule, elles sont enregistrées sur des lignes d'acquisition différentes pour empêcher la dégradation de la cellule par le rayon laser.

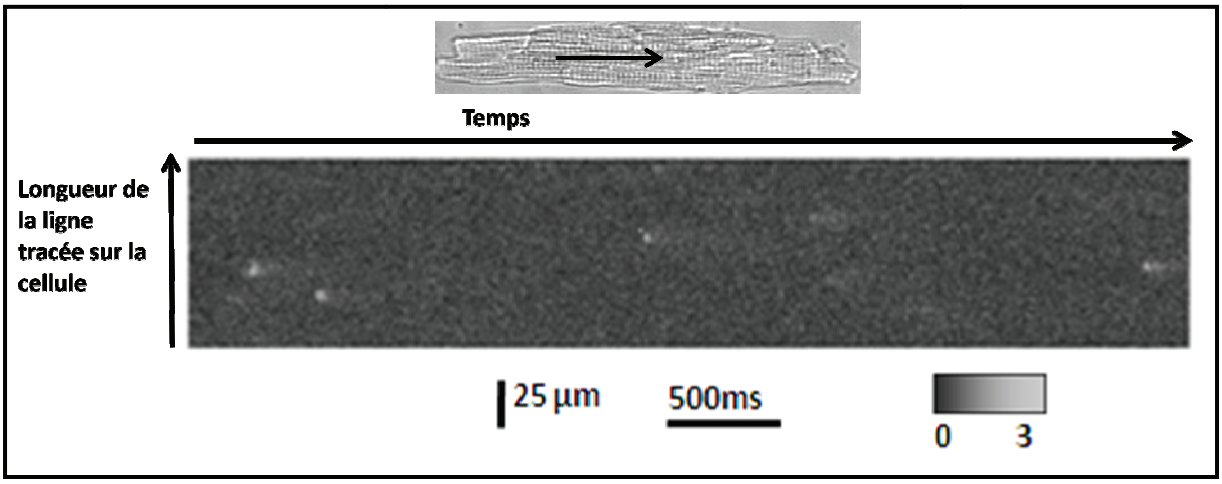


Figure 42 – Illustration de l'acquisition de *sparks* calciques sur un cardiomyocyte chargé au Fluo-4 AM. Les points clairs correspondent aux *sparks* détectés.

Les images cellulaires sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ, muni du programme d'analyse algorithmique automatique *SparkMaster*, suivant la méthode décrite par Picht et ses collaborateurs.(200)

IV- Etude biochimique

Afin d'apporter du rationnel moléculaire aux modifications des paramètres physiologiques observées dans les différentes études, des analyses biochimiques des protéines impliquées dans le CEC ont été réalisées. Les différentes techniques biochimiques présentées ont été faites sur tissu entier du VG congelé à l'azote liquide après rinçage.

a) *Western Blot*

La technique de *Western Blot* nous a permis d'étudier la modification de l'expression de différentes protéines du CEC (RyR2, SERCA2a, NCX1, PLB…) ainsi que des modifications post-traductionnelles de ces protéines, principalement la phosphorylation, au cours du remodelage cardiaque et suite au traitement au BNP.

✓ Extraction et dosage des protéines

Les protéines totales sont extraites de ≈50 mg d'échantillons congelés, par broyage avec un Polytron® et solubilisation dans 600 µL de tampon de lyse (contenant en mM : 20 HEPES ;

40 KCl ; 1 DTT ; 0,3% CHAPS et 1X SigmaFAST) 45 min à 4°C sous agitation. Le DTT permet la dénaturation des protéines en réduisant les ponts di-sulfures ; le CHAPS ou 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (SigmaAldrich) est un détergeant non dénaturant, qui permet de perméabiliser partiellement les cellules en solubilisant les protéines membranaires ; le SigmaFAST (SigmaAldrich) est composé d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases protégeant les protéines cellulaires de l'hydrolyse. Après extraction, les protéines sont quantifiées par un dosage colorimétrique de type *Reducing agent Compatible Detergent Compatible* (RC DC) avec un kit Bio-Rad et mesurées par spectrophotométrie.

✓ Dénaturation des protéines

Les anticorps primaires utilisés reconnaissent la structure primaire et secondaire des protéines. C'est pourquoi les protéines sont dénaturées au préalable en les incubant dans le Laemmli et en chauffant le mélange 5 min à 95°C. Deux types de Laemmli sont utilisés : le Laemmli – β-mercaptoéthanol 1X et le Laemmli – urée 1X. Les compositions de ces deux solutions figurent dans les tableaux 2 et 3.

	Utilité	**Concentration**
Tris base	Tampon	250 mM
SDS	Dénaturant	8 %
Glycérol	Augmente la densité	40 %
B-mercaptoéthanol	Casse les ponts S-S	400 mM
Bleu de bromophénol	Colorant	Quelques grains

Tableau 2 - Composition du Laemmli – β-mercaptoéthanol (4X)

	Utilité	**Concentration**
Tris base	Tampon	125 mM
SDS	Dénaturant	4 %
Glycérol	Augmente la densité	20 %
Urée	Dénaturant	4 M
Bleu de bromophénol	Colorant	Quelques grains

Tableau 3 - Composition du Laemmli – urée (2X)

Les protéines sont ensuite séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de concentration adaptée au poids de la protéine recherchée, et transférées selon un transfert liquide à froid (1h ; 100V) sur une membrane de nitrocellulose à 0,2 µm. Les membranes sont laissées se saturer avec un tampon de blocage (*Starting block T20 Blocking Buffer Pierce chemicals, Fisher scientific*) pendant 2h à température ambiante. La saturation permet de bloquer les sites d'interaction non spécifiques entre la membrane et les anticorps et réduire le bruit de fond. Les anticorps primaires sont dilués dans ce même tampon de blocage et mis à

incubés sur les membranes sur la nuit à 4°C sous agitation. Les dilutions et les références des anticorps seront marquées au fur et à mesure dans les différentes parties des résultats.

✓ Immuno-détection

L'immuno-détection est réalisée à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des fluorophores type Alexa 488 ou 594 excitables à la lumière infrarouge. L'intensité de la fluorescence est acquise par le système Odyssey (LI-COR Biosystems). Le taux d'expression des protéines est normalisé par rapport à la GAPDH (protéine cardiaque stable au cours du remodelage).

✓ Immuno-précipitation

Cette technique permet la précipitation d'une protéine d'intérêt en solution à l'aide de son anticorps spécifique. L'immuno-précipitation (IP) nous a permis d'isoler et de concentrer des protéines, voire des complexes protéiques (RyR et SERCA), dans les échantillons congelés. L'IP consiste à ajouter une étape supplémentaire précédant l'électrophorèse du *western blot* ordinaire. Il s'agit de l'incubation de l'anticorps primaire d'intérêt (anti-RyR2 ou anti-SERCA2a) avec les protéines extraites pendant 2h à 4°C sous agitation, pour assurer la fixation de l'antigène dessus. Ensuite, ces anticorps sont fixés à des billes magnétiques (Pierce A/G, ThermoScientific) et récupérés à l'aide d'un portoir magnétique. Les antigènes sont récupérés après décrochage des anticorps (par ajout de Glycine) et neutralisés (par ajout de Tris 1,5M pH8,8). Les protéines sont alors dénaturées dans le Laemmli et séparées par électrophorèse.

L'IP sert à :

- mesurer des modifications post-translationnelles des protéines d'intérêt, pas assez visibles sans concentrer des protéines (comme la S-nitrosylation et la phosphorylation).
- étudier les interactions protéines – protéines dans les complexes moléculaires, comme le couplage FKBP12,6 / RyR2 et les liaisons de la SERCA2a avec le PLB ou la S100A1, on parle dans ce cas de co-IP.

b) Dosage biochimique

Le taux circulant de BNP murin dans le plasma sanguin de souris Sham ou PMI, traitées ou non au BNP, est mesuré à l'aide d'un kit de dosage immuno-enzymatique (*Enzyme ImmunoAssay kit*, Phoenix Pharmaceuticals Inc.). Pour cela, ≈400 µL de sang sont prélevés de

l'extrémité coupée de la queue de chaque souris à 3 ; 7 et 14 jours suivant la chirurgie. Le sang est récolté dans des tubes héparinés et contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (CHAPS). Le plasma est obtenu après centrifugation à 1600 g à 4°C pendant 15 minutes, récupéré et conservé à -80°C jusqu'au dosage. Le principe de ce kit de dosage est schématisé dans la figure 43.

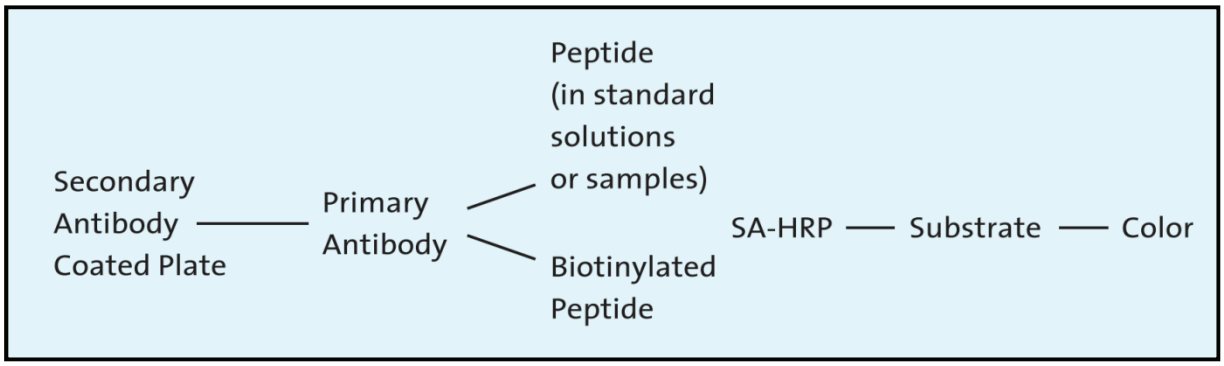


Figure 43 - Principe du dosage EIA du BNP plasmatique murin à l'aide du kit Phoenix Pharmaceuticals.

Le BNP des échantillons entre en compétition avec le peptide biotinylé fourni dans le kit. Ce dernier réagit avec la SA-HRP (*Streptavidin-Horseradish Peroxyase*) qui catalyse une solution substrat et émet une couleur jaunâtre. L'intensité de la couleur de la solution est alors inversement proportionnelle à la concentration en BNP dans l'échantillon.

A la fin du dosage, l'absorbance est quantifiée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Inifinite® 200 Pro, TECAN) et analysée sur le logiciel OriginPro.

Résultats

Partie 1 : Effets chroniques du peptide natriurétique de type B sur cœurs sains

Évidences fonctionnelles d'un rôle actif du BNP sur le remodelage cardiaque et sur les arythmies

1- Introduction

Le BNP est synthétisé et libéré par les cardiomyocytes ventriculaires en réponse à une surcharge pariétale et à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire.(161,201) Ces conditions caractérisent le remodelage cardiaque pathologique : le taux plasmatique de BNP augmente progressivement avec l'aggravation de la dysfonction ventriculaire chez les patients en IC congestive.(3,63) Ainsi, ce taux est utilisé comme un biomarqueur de diagnostic dans les urgences pour évaluer la dysfonction du VG.(5,154) Le BNP est connu pour ses effets hémodynamiques vasorelaxants : il inhibe le SRAA, augmente la natriurèse/diurèse, induit une vasodilalation et une diminution de la pression et du volume sanguins.(101,138) Administré sous une forme recombinante, le nésiritide ou Natrecor®, chez les patients en IC aigue décompensée, le BNP a montré des effets thérapeutiques controversés. A souligner que certaines méta-analyses ont accusé le nésiritide d'une augmentation de la mortalité à court et moyen termes ;(6,8) même si l'étude la plus récente et la plus effective, l'ASCEND, n'a trouvé aucun effet au nésiritide, ni bénéfique ni délétère, sur la fonction cardiaque, ni sur le risque de rehospitalisation, ni sur la survie des patients.(175) De plus, un taux élevé de BNP est associé à un intervalle QTc prolongé (202) et à un risque élevé de mort subite cardiaque ;(203) alors qu'une réaction à des traitements, comme le levosimendan, la dobutamine ou le carvedilol, par réduction du taux endogène de BNP, chez des patients en IC aigue décompensée ou chronique, est associée à un meilleur pronostic.(166,204) Au niveau cellulaire, des études ont montré que le BNP induit : i) une diminution de l'expression de la pompe SERCA2a, à l'origine de la diminution de l'efficacité du recaptage du Ca^{2+} diastolique dans le RS ;(79) ii) une augmentation de la libération synaptique de NE ;(180) et iii) une amplification de la voie de signalisation β-adr par inhibition de la PDE3,(128) cette voie, activée en chronique dans l'IC est connue pour

altérer la signalisation calcique en hyperphosphorylant les principales protéines du CEC (LTCC, RyR et PLB) et être à l'origine de fuites calciques spontanées et d'arythmies déclenchées.(205,206) Ainsi, l'augmentation de la libération de BNP peut ne pas être une simple conséquence de la pathologie, mais aussi, un acteur important du remodelage et des altérations pro-arythmogéniques du CEC.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons étudié les effets d'un traitement chronique en BNP sur des souris saines (Sham), dénuées d'atteinte cardiaque et d'activations hormonales compensatrices. Nous avons comparé ces souris traitées au BNP (BNP-Sham) à des Sham traitées au BNP et un β-bloquant (BB) : le métoprolol (BB-BNP-Sham) ; le but étant de caractériser les effets du BNP en absence d'activation de la voie de signalisation β-adr et les effets thérapeutiques de cette combinaison. Ces différents groupes de Sham ont également été comparées à des PMI et à des BB-PMI pour évaluer les phénotypes cardiaques des souris saines traitées par rapport à des souris en IC ischémique. Sur ces différents groupes, nous avons effectué des mesures cardiaques *in vivo*, cellulaires et moléculaires.

2- Méthodologie

Au cours de cette première partie, nous avons travaillé sur 5 groupes expérimentaux, comme cela est indiqué dans la figure 44 :

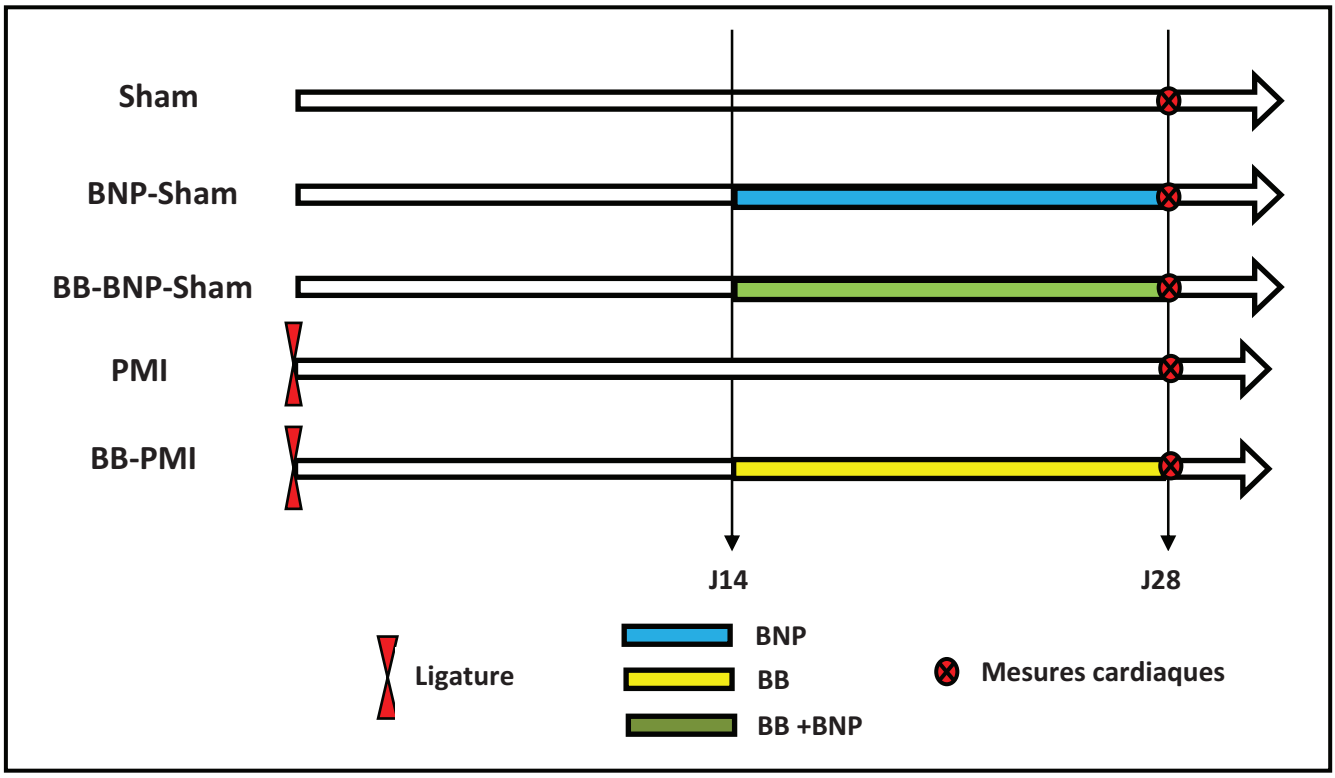


Figure 44 - Protocole expérimental suivi au cours de la première partie des résultats

Sur les 3 groupes de souris traitées (BNP-Sham, BB-BNP-Sham et BB-PMI), l'administration des traitements est faite pendant deux semaines, débutant à la troisième semaine suivant la chirurgie. A J28, des mesures cellulaires et moléculaires sont effectuées. *In vivo,* l'activité morpho-fonctionnelle du cœur est évaluée par échocardiographie ; l'activité électrique cardiaque, la variabilité du rythme sinusale (HRV) et les arythmies sont mesurées sur des ECG enregistrées sur souris vigiles par télémétrie. Au niveau cellulaire, nous avons mesuré par imagerie calcique les mouvements calciques systoliques, ainsi que les *sparks* (reflétant l'activité du canal RyR) et les vagues calciques spontanées diastoliques. Au niveau moléculaire, nous avons évalué l'expression et les modifications post-translationnelles des protéines du CEC.

3- Article

Ce travail a été réalisé principalement par le Docteur Jérôme Thireau dans notre laboratoire. J'y ai contribué en tant que deuxième auteur. L'article est déjà publié.

Cardiovascular Research (2012) **95**, 59–68
doi:10.1093/cvr/cvs167

Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity

Jérôme Thireau[1], Sarah Karam[1], Jérémy Fauconnier[1], Stéphanie Roberge[1], Cécile Cassan[1], Olivier Cazorla[1], Franck Aimond[1], Alain Lacampagne[1], Dominique Babuty[2], and Sylvain Richard[1]*

[1]INSERM U1046, Physiologie and Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles, Université Montpellier-1, Université Montpellier-2, CHU Arnaud de Villeneuve, 371, Rue du doyen G. Giraud, Montpellier 34295, France; and [2]Cardiologie B, Hôpital Trousseau, Tours, France

Received 14 February 2012; revised 9 May 2012; accepted 16 May 2012; online publish-ahead-of-print 22 May 2012

Time for primary review: 23 days

Aims During heart failure (HF), the left ventricle (LV) releases B-type natriuretic peptide (BNP), possibly contributing to adverse cardiovascular events including ventricular arrhythmias (VAs) and LV remodelling. We investigated the cardiac effects of chronic BNP elevation in healthy mice and compared the results with a model of HF after myocardial infarction (PMI mice).

Methods and results Healthy mice were exposed to circulating BNP levels (BNP-Sham) similar to those measured in PMI mice. Telemetric surface electrocardiograms showed that in contrast with fibrotic PMI mice, electrical conduction was not affected in BNP-Sham mice. VAs were observed in both BNP-Sham and PMI but not in Sham mice. Analysis of heart rate variability indicated that chronic BNP infusion increased cardiac sympathetic tone. At the cellular level, BNP reduced Ca^{2+} transients and impaired Ca^{2+} reuptake in the sarcoplasmic reticulum, in line with blunted SR Ca^{2+} ATPase 2a and S100A1 expression. BNP increased Ca^{2+} spark frequency, reflecting Ca^{2+} leak through ryanodine receptors, elevated diastolic Ca^{2+}, and promoted spontaneous Ca^{2+} waves. Similar effects were observed in PMI mice. Most of these effects were reduced in BNP-Sham and PMI mice by the selective β1-adrenergic blocker metoprolol.

Conclusion Elevated BNP levels, by inducing sympathetic overdrive and altering Ca^{2+} handling, promote adverse cardiac remodelling and VAs, which could account in part for the progression of HF after MI. The early use of β-blockers to prevent the deleterious effects of chronic BNP exposure may be beneficial in HF.

Keywords Natriuretic peptide • Heart failure • Arrhythmia • Calcium • Remodelling

1. Introduction

B-type natriuretic peptide (BNP) is synthesized in cardiac myocytes and released in excess into the blood circulation following left ventricular (LV) wall stretching.[1] During the onset of ventricular remodelling after myocardial infarction (PMI), BNP is chronically elevated and is a strong indicator of heart failure (HF) severity.[1] Despite favourable haemodynamic effects, high blood BNP is associated with the risk of ventricular arrhythmias (VAs) and sudden cardiac death (SCD).[2,3] Consequently, the effectiveness of therapies aimed at increasing BNP during HF is still questionable.[4] While short-term BNP infusion is of haemodynamic benefit, with natriuretic, diuretic, and vasorelaxant effects, chronic BNP treatment increases the risk of mortality.[3,5,6] Sympathetic activation related to a reflex response triggered by these haemodynamic effects could be implicated in this process.[7,8] Although the signalling pathways mediating the effects of BNP are poorly understood, a therapeutic strategy that could prevent the deleterious effects of BNP without affecting its benefits remains of interest.

Altered Ca^{2+} cycling, characterized by increased sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} leak, decreased SR Ca^{2+} uptake leading to diastolic Ca^{2+} elevation, and decreased systolic Ca^{2+} levels, is a common feature in chronic HF.[9–11] Such altered Ca^{2+}-handling and chronic sympathetic overdrive are established components of chronic HF

* Corresponding author. Tel: +33 4 67 41 52 40; fax: +33 4 67 41 52 42, Email: sylvain.richard@inserm.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

triggering VA.[12] BNP decreases the expression of SR Ca^{2+} ATPase 2a (SERCA2a)[13,14] and induces pro-adrenergic effects.[15] We thus hypothesized that BNP could influence two key players in the triggering of VA and, more globally, in cardiac remodelling during HF.

Our present study attempts to determine the effect of chronic BNP treatment on LV function both *in vivo* in healthy mice and at the cellular level. Here, we show, by heart rate variability (HRV) analysis and the use of the β-blocker metoprolol, that increased sympathetic tone associated with Ca^{2+}-handling alterations contributes to BNP-mediated LV remodelling and VA.

2. Methods

2.1 Animals and BNP

All procedures conformed to European Parliament Directive 2010/63/EU and the 22 September 2010 Council on the protection of animals and were approved by the local institutional animal research committee (Languedoc Roussillon, No. CE-LR-0714).

For cardiomyocyte experiments, the heart was explanted after euthanasia by cervical dislocation. Seven-week-old male C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were randomly assigned to the following groups: (i) Sham; (ii) Sham treated with BNP (BNP-Sham); (iii) mice subjected to HF by left coronary artery ligation (PMI); (iv) BNP-Sham mice treated with the β1-adrenergic blocker metoprolol (BB-BNP-Sham); and (v) PMI mice treated with metoprolol (BB-PMI). For PMI, a left thoracotomy was performed under anaesthesia and cardiac monitoring (2% isoflurane/O_2, Aerrane®, Baxter, France). The artery was ligated 1–2 mm beyond its point of emergence from the top of the left atrium, using an 8-0 suture. A subcutaneous injection of 0.01 mL buprenorphine solution (0.3 mg/mL) was administered for post-operative analgesia. Sham mice were subjected to the same surgical procedure but without coronary artery ligation. Two mice died during surgery, i.e. before their inclusion in the study, and were replaced. Metoprolol (Sigma-Aldrich, 100 mg/kg/day) was administered in the drinking water. The dose was determined based on the literature. In the range of 60–350 mg/kg/day, metoprolol has beneficial effects on cardiac and cellular function.[16–20] Here, the dose of 100 mg/kg/day reduced the heart rate and improved the HRV parameters in PMI mice without affecting the water intake. Mouse BNP(1–45) (Ref 14-5-30A, American Peptide, Sunnyvale, CA, USA) was administered to Shams at a rate of 0.03 μg/kg/min for 14 days, using a micro-osmotic pump (Alzet 1002, Charles River, France), to achieve plasma BNP levels similar to the steady-state level observed in PMI mice. Circulating BNP levels were measured in duplicate using a commercial kit (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA). The timeline of experiments is shown in the Supplementary material online, *Figure S1*.

2.2 Histology

Haematoxylin–eosin and Sirius red staining were performed as described.[21] Results indicate the area of Sirius red-stained tissue as a percentage of the total area of myocardial tissue.

2.3 *In vivo* analysis

Cardiac function was assessed by echocardiography (Vivid7Pro, GE Medical Systems, USA). LV mass, LV shortening fraction (SF), end-diastolic LV dimension (LVEDd), and end-systolic LV dimension (LVEDs) were measured.[10] Electrocardiograms (ECGs) were recorded by telemetry (DSI, St Paul, MN, USA, and EMKA Technologies, France).[10] HRV, the PR, QRS, and QTc intervals, and arrhythmias were analysed using 12 h nocturnal ECGs (ECG-auto, EMKA Technologies).[21]

2.4 Ca^{2+} handling

LV myocytes were enzymatically dissociated, loaded with a fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM (5 μmol/L, Molecular Probes, Paris, France), and field-stimulated at 1.0 Hz to assess intracellular Ca^{2+} transients and cell shortening.[10] Ca^{2+} sparks were recorded in quiescent cells (1.5 ms/line, LSM510 Zeiss confocal microscope; ×63 water-immersion objective; NA: 1.2) at 25°C.[10] Cell volume was estimated using Z-stack (*x*–*y* projection, front view) image acquisition. Data were analysed using ImageJ and 'SparkMaster'. Cellular arrhythmias and diastolic Ca^{2+} levels were measured with ratiometric Indo-1 AM (10 μM, Invitrogen, France; IonOptix System, Hilton, USA).[10] Ca^{2+} fluorescence was measured during a 30 s pacing period (1.0 Hz), followed by a 30 s rest period. Diastolic Ca^{2+} levels and the number of cells developing ectopic Ca^{2+} transients during the rest period were quantified.

2.5 Ca^{2+}-handling proteins

LV proteins were separated using 2–20% SDSi–PAGE, blotted onto PVDF membranes (Protean, Germany) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: RyR-2 (Covalab, France), Phospho Ser^{2809}-RyR-2 (A010-30, Badrilla, UK), SERCA2a (A010-20, Badrilla), phospholamban (PLB; A010-14, Badrilla), PhosphoSer16-PLB (A010-12, Badrilla), NCX1 (R3F1, Swant, Switzerland), and S100A1 (SP5355P, Acris Antibodies GmbH, Germany). Protein levels were expressed relative to calsequestrin (PA1-913, ABR, USA). Immunodetection was performed using the ECL Plus system (Amersham, UK).

2.6 Statistical analysis

All data are reported as means ± standard deviation. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism and Origin Softwares. One-way ANOVA for multiple comparisons was used, followed by a parametric *t*-test with Bonferroni's correction for all parameters. A *P*-value of 0.05 or less indicated a statistically significant difference.

3. Results

3.1 Plasma BNP levels in BNP-Sham and PMI mice

Sham mice had levels of circulating BNP lower than the detection limit (<0.34 ng/mL). In PMI mice, BNP increased to 5.4 ± 1.2 ng/mL ($n = 8$) 14 days after MI and remained stable over the next 2 weeks. At week 4, BNP-Sham mice presented BNP levels (6.8 ± 1.4 ng/mL, $n = 8$) similar to those measured in PMI animals (5.1 ± 0.9 ng/mL, $n = 7$).

3.2 Morphofunctional and electrocardiographic effects of BNP

Chronic BNP treatment increased the heart weight–body weight ratio (HWR) of BNP-Sham and PMI mice (*Table 1*). Unlike modifications in PMI mice, echocardiography revealed an unchanged LVEDd and SF in BNP-Sham mice (*Table 1*). ECG showed an unchanged heart rate in BNP-Sham mice, whereas it was increased in PMI mice as indicated by the decreased RR interval (*Figure 1A*). The PR interval, corresponding to the conduction time from the sinus node through the atrioventricular (AV) node to the ventricle, was unaltered in both BNP-Sham and PMI mice (*Figure 1A*), whereas the QRS duration, representing the time to ventricular depolarization and early repolarization, was lengthened in PMI mice (*Figure 1C*). In addition, multiple spikes within the complex (fragmented QRS),[22] probably caused by myocardial scarring, were observed in PMI but not in BNP-Sham mice. The QTc interval was increased in both BNP-Sham and PMI

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

Table 1 Echocardiography, histology, and cellular hypertrophy

	LVEDd (mm)	SF (%)	HWR	Collagen (%)	Cell volume (10^{-5} mm^3)
Sham	26.2 ± 0.4	61.7 ± 1.2	3.30 ± 0.23	0.1 ± 0.0	3.5 ± 0.1
BNP-Sham	27.1 ± 0.1	57.9 ± 1.2	3.72 ± 0.08*	0.2 ± 0.0	5.0 ± 0.3**
PMI	48.6 ± 0.2**	17.9 ± 1.4**	4.01 ± 0.32*	5.1 ± 1.8**	5.3 ± 0.5**

End-diastolic diameter of left ventricular cavity (LVEDd), shortening fraction (SF), and heart weight–body weight ratio (HWR) (10 mice/group). Collagen content, expressed as a percentage of the total area of myocardial tissue analysed (7 mice/group) and cell volume ($n = 30$ cells, 3 mice/group) were estimated *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, BNP-Sham/PMI vs. Sham animals.

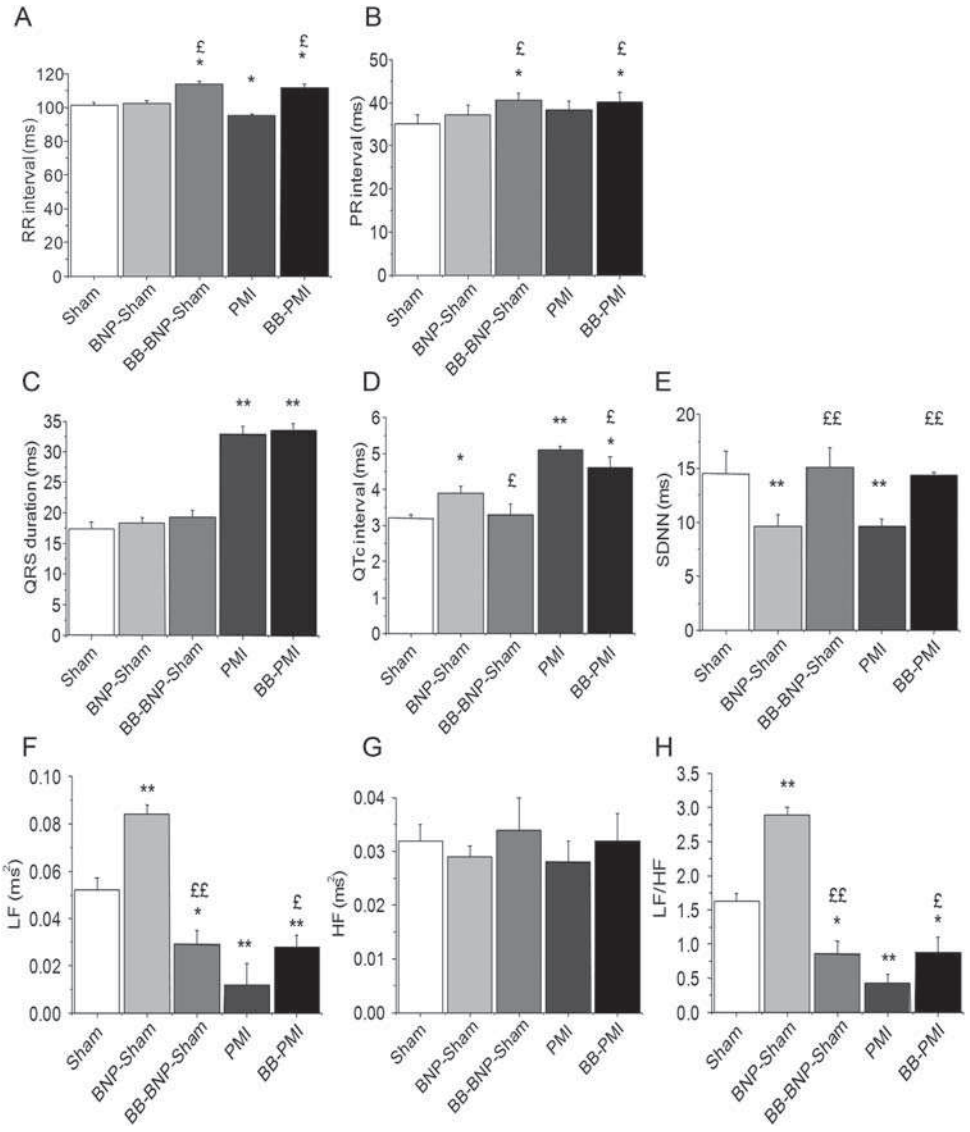


Figure 1 ECG analysis. Parameters estimated from 12 h nocturnal ECGs: heart rate (RR interval) (*A*), PR interval (*B*), QRS duration (*C*), and QTc interval (*D*). Heart rate variability analysed in the time-domain (SDNN) (*E*) and frequency-domain with low-frequency (LF; *F*) and high-frequency bands (HF; *G*) and LF/HF ratio (*H*). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, BNP-Sham/PMI vs. Sham animals; £$P < 0.05$, ££$P < 0.01$ for metoprolol-treated vs. untreated animals, $n = 12$ for each group.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

mice (*Figure 1D*). ECG analyses showed that chronic BNP treatment did not alter electrical conduction. In accordance with this finding, BNP had no effect on fibrosis as quantified by collagen content, whereas a large increase was observed in PMI mice (*Table 1*).

3.3 Effect of BNP on cardiac sympathovagal regulation

We examined the regulation of the cardiac rhythm by the autonomic nervous system (ANS) by examining the HRV.[10,21,23,24] The HRV, assessed by the standard deviation of the mean of all normal sinus intervals (SDNN), was comparably decreased in BNP-Sham and PMI mice (*Figure 1E*), suggesting an elevation of sympathetic tone.[23,24] Frequency-domain analysis showed that oscillations in 'low'-frequency bands (LF), reflecting parasympathetic and sympathetic components, were increased in BNP-Sham mice (*Figure 1F*), whereas 'high'-frequency oscillations (HF), reflecting exclusively vagal activity, were unchanged (*Figure 1G*). The increase in the LF bands in BNP-Sham mice is consistent with increased sympathetic activity without a detectable modification of the mean heart rate.[25] The typical profile of HRV parameters measured in PMI mice, with a blunted LF band and LF/HF ratio (*Figure 1F–H*), confirmed the loss of rhythmicity of ANS activity on the heart and the severity of cardiac pathology in PMI animals.[24,26,27] This blunting could result from the saturating influence of persistent high sympathetic tone on the sinus node[24] (as attested by the decreased RR interval), or from an impairment of β-adrenergic receptor signalling following chronic sympathetic activation.[26,27]

3.4 BNP promotes rhythm disorders

Mice, like humans, display spontaneous arrhythmias (*Figure 2A–C*). Sham, BNP-Sham, and PMI mice exhibited comparable incidences of sinus arrests (*Figure 2D*) and AV blocks (*Figure 2E*). In contrast, more VAs were observed in BNP-Sham and PMI than in Sham mice (*Figure 2F*). Ventricular tachycardia (VT, defined as more than five consecutive ectopic beats; *Figure 2G*) was observed in BNP-Sham (2/8 mice) and PMI (3/12) but not Sham mice (0/12).

3.5 Preventive effect of the β-blocker metoprolol

The influence of the BNP-induced neurohormonal imbalance on the ANS was further investigated using the β1-adrenergic blocker metoprolol. Metoprolol reduced the heart rate, as shown by the increased RR (*Figure 1A*) and PR intervals (*Figure 1B*) in BB-BNP-Sham and BB-PMI mice. It had no effect on QRS lengthening either in BB-BNP-Sham, or in BB-PMI mice, as would be expected from the

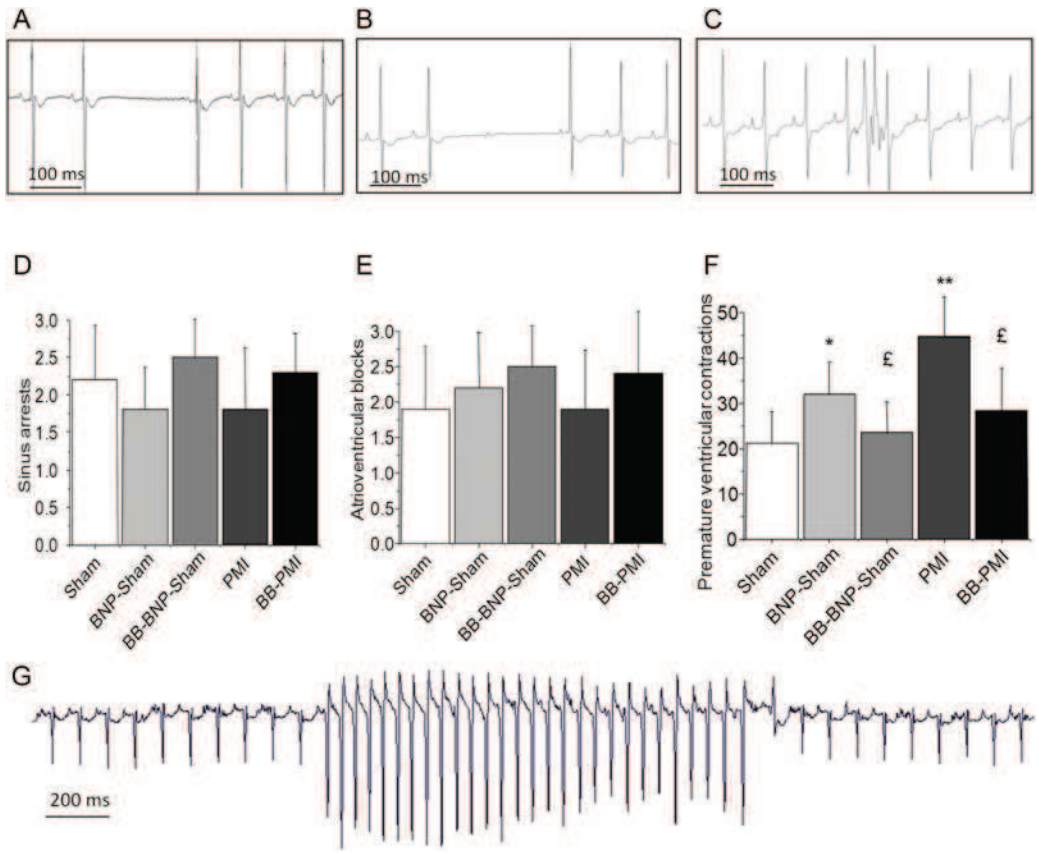


Figure 2 Arrhythmic events. Sinus arrests (*A*), atrioventricular blocks (*B*), and PVC (*C*) were counted and averaged (*D–F*). Typical spontaneous non-sustained VT recorded in a BNP-Sham mouse (*G*). $^{*}P < 0.05$, BNP-Sham/PMI vs. Sham animals; $^{**}P < 0.01$; $^{£}P < 0.05$ for metoprolol-treated vs. untreated animals.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

structural alterations (fibrosis) in PMI mice (*Figure 1B*). In addition, myocardial collagen deposits were unchanged in BB-BNP-Sham when compared with BNP-Sham mice (0.2 ± 0.0, $n = 7$ vs. $0.2 \pm 0.0\%$, $n = 4$) and in BB-PMI when compared with PMI mice (4.4 ± 1.9, $n = 7$ vs. $5.2 \pm 1.8\%$, $n = 4$), consistent with a previous study.[28] Metoprolol had a weak effect on morphofunctional parameters such as LVEDd (26.6 ± 0.4 and 39 ± 0.6 mm) and SF (60.1 ± 4.6 and $22 \pm 2.2\%$, respectively, in BB-BNP-Sham and BB-PMI mice, $n = 5$ each). However, metoprolol decreased the QTc in both BB-BNP-Sham and BB-PMI mice (*Figure 1D*).

Metoprolol also abolished the decrease in the SDNN in both BB-BNP-Sham and BB-PMI mice (*Figure 1E*). In the frequency domain, metoprolol decreased the LF in both BB-BNP-Sham and BB-PMI mice (*Figure 1F*), without modifying the HF (*Figure 1G*). Overall, metoprolol prevented the sympathovagal imbalance observed both after BNP treatment and in PMI mice (*Figure 1H*). Metoprolol also reduced premature ventricular contractions (PVC) both in BB-PMI and BB-BNP-Sham mice (*Figure 2F*). No VT was observed with metoprolol, but two of eight BB-BNP-Sham and one of eight BB-PMI mice presented a high incidence of sinus arrests and AV blocks (first degree), in line with the slowing of the AV conduction time by metoprolol.[29]

3.6 BNP promotes alterations in Ca^{2+} handling

The detection of VAs in the absence of conduction disorders or fibrosis led us to investigate the cellular mechanisms underlying the pro-arrhythmogenic effect of BNP in single LV cardiomyocytes. First, we found that both BNP and MI increased cell size. BNP increased the cell volume (*Table 1*) and cell length when compared with Shams, consistent with cell hypertrophy, which was prevented by metoprolol (data not shown). We next measured intracellular Ca^{2+} transients using Fluo-4 AM (*Figure 3A–F*) and Indo-1 AM (*Figure 4A–C*). In BNP-Sham and PMI mice, the amplitude of Ca^{2+} transients was smaller (*Figure. 3A–C*) and decay kinetics were slower (*Figure 3D*) than in Sham mice. Cell shortening was similarly decreased in BNP-Sham and PMI when compared with Sham mice (*Figure 3E*). Cardiomyocyte shortening depends on the amount of Ca^{2+} released from the SR by ryanodine receptors (RyRs) during systole. We assessed SR Ca^{2+} content by measuring the Ca^{2+} transient induced by rapid caffeine application, which instantly opens all RyRs. SR Ca^{2+} content was lower in Sham-BNP and PMI than in Sham mice (*Figure 3F*). Metoprolol prevented the effects of BNP and MI on Ca^{2+} transient amplitude, Ca^{2+} reuptake, and SR Ca^{2+}-store depletion, resulting in improved cell shortening in BB-BNP-Sham and BB-PMI mice (*Figure 3E*).

We next examined the arrhythmogenic propensity of cardiomyocytes. In BNP-Sham and PMI mice, diastolic Ca^{2+} was higher and spontaneous Ca^{2+} waves more frequent than in Shams (*Figure 4A–C*). Metoprolol prevented the diastolic Ca^{2+} increase similarly in BB-BNP-Sham and BB-PMI mice and decreased Ca^{2+} wave occurrence (*Figure 4C*). Since elevated diastolic Ca^{2+} and ectopic Ca^{2+} waves are suggestive of abnormal spontaneous RyR opening, we investigated RyR activity by directly visualizing Ca^{2+} sparks.[9,10] Representative linescan images are shown in *Figure 4D*. Both BNP-Sham and PMI cells exhibited more Ca^{2+} sparks, with lower amplitudes, than Sham cells, a change prevented by metoprolol (*Figure 4E* and *F*).

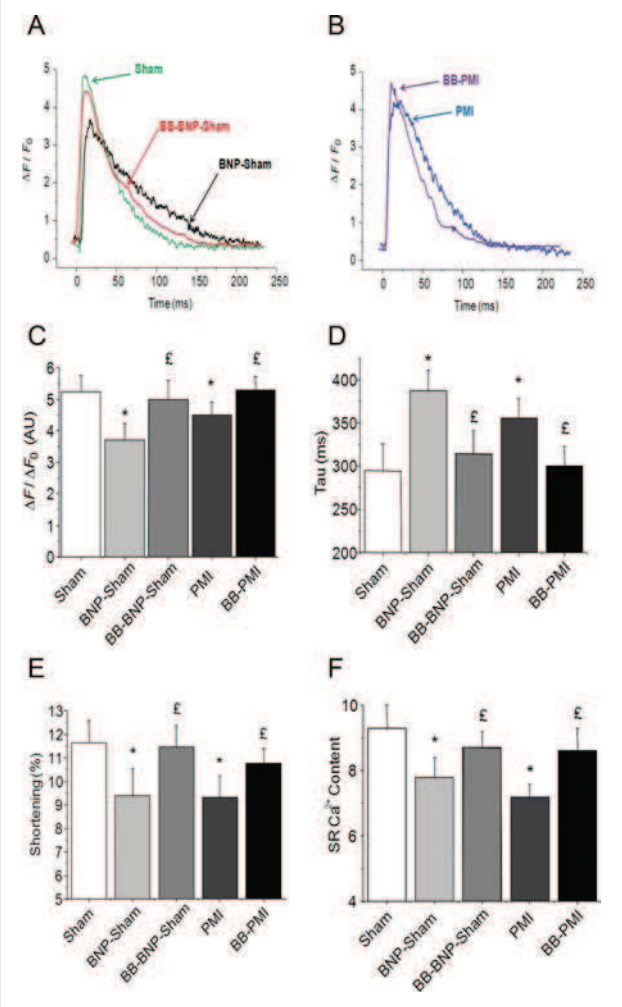


Figure 3 Ca^{2+} transients and cell shortening. Ca^{2+} transients in single LV cardiomyocytes field-stimulated at 1.0 Hz visualized (Fluo-4 AM), expressed as $\Delta F/F_0$ in Sham, BNP-Sham, and BB-BNP-Sham mice (*A*) and in PMI and BB-PMI mice (*B*); averaged Ca^{2+} transient amplitude (*C*); averaged decay time constant, Tau, of Ca^{2+} transients (*D*); cellular shortening (*E*); and averaged SR Ca^{2+} content, estimated from the caffeine-induced peak in Ca^{2+} transients (*F*). $^{*}P < 0.05$, BNP-Sham/PMI vs. Sham animals; $^{£}P < 0.05$ for metoprolol-treated vs. untreated animals. Sham, $n = 60$ cells, 6 mice; BNP-Sham, BB-BNP-Sham, PMI, and BB-PMI, $n = 40$ cells; 4 mice.

3.7 BNP decreases SERCA2a and S100A1 expression

Although SR Ca^{2+} leak reduces SR Ca^{2+} content and cell shortening, it does not explain the slowing of Ca^{2+} transient decay kinetics, known to result mainly from Ca^{2+} reuptake into the SR via SERCA2a, and Ca^{2+} extrusion by the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger (NCX1). SERCA2a activity is inhibited by PLB, and PLB phosphorylation (P-PLB) relieves this inhibition.[12] SERCA2a activity is also modulated by the small Ca^{2+}-binding protein S100A1.[30] Here, we found reduced SERCA2a and S100A1 protein expression in the LV of BNP-Sham mice (*Figure 5A* and *C*), with no modification of PLB or the P-PLB/PLB ratio (*Figure 5D–F*). RyR protein content was decreased (*Figure 5G*), whereas the $Pser^{2809}$RyR/RyR ratio remained

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

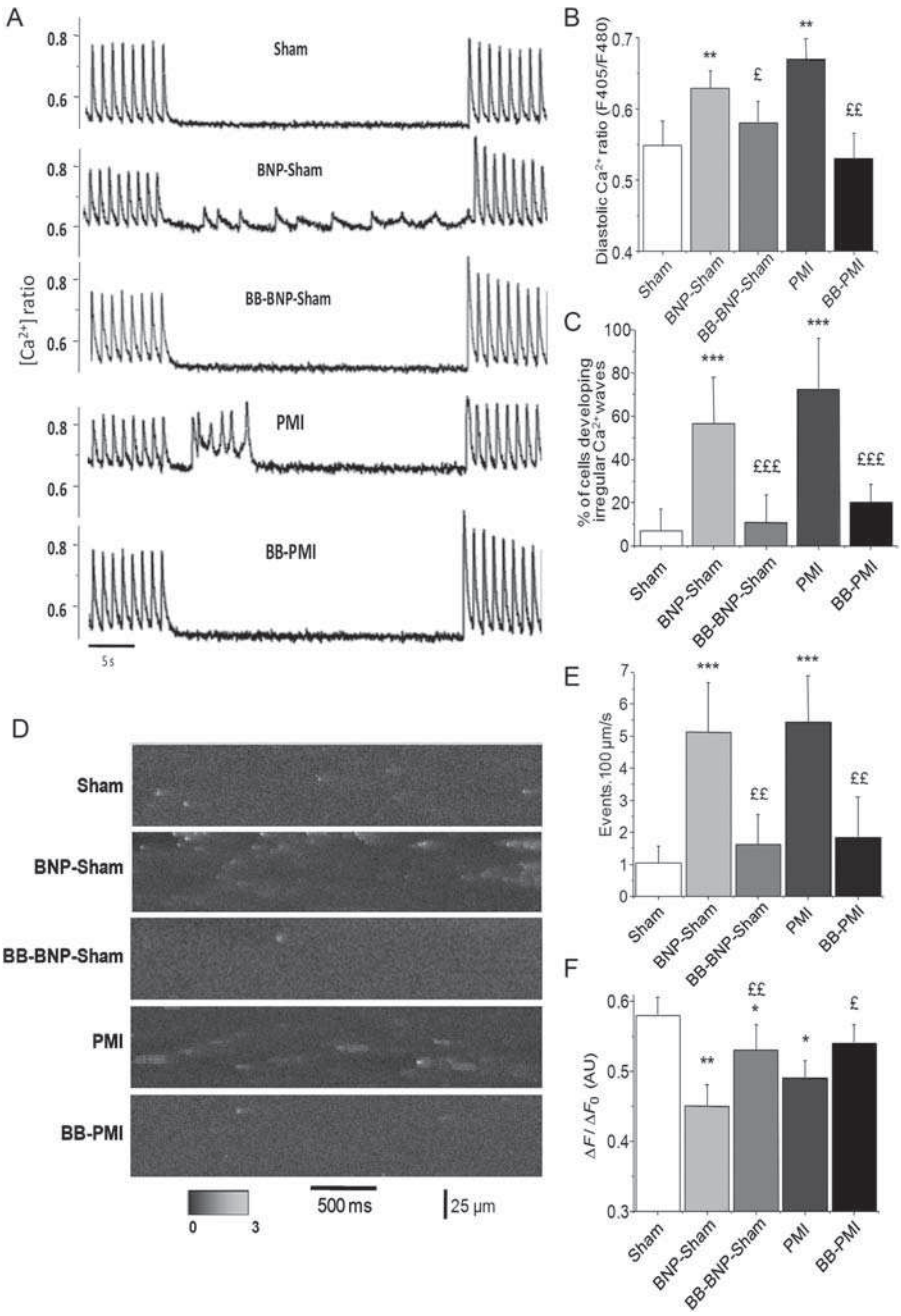


Figure 4 Diastolic Ca^{2+} levels, spontaneous Ca^{2+} waves, and Ca^{2+} sparks. Ca^{2+} transients evoked by field stimulation (1.0 Hz) and spontaneous Ca^{2+} waves in cardiomyocytes loaded with Indo-1 AM (*A*); averaged diastolic Ca^{2+} levels (*B*); percentage of cells exhibiting spontaneous Ca^{2+} waves (*C*); representative $\Delta F/F$ linescan images of Ca^{2+} sparks, recorded in intact Fluo-4 AM-loaded cardiomyocytes (*D*); averaged Ca^{2+} spark frequency (*E*); averaged Ca^{2+} spark amplitude (*F*). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, BNP-Sham/PMI vs. Sham animals; $^{£}P < 0.05$, $^{££}P < 0.01$, and $^{£££}P < 0.001$ for metoprolol-treated vs. untreated animals. Sham, $n = 60$ cells, 6 mice; BNP-Sham, BB-BNP-Sham, PMI, and BB-PMI, $n = 40$ cells; 4 mice.

constant (*Figure 5H* and *I*). NCX1 protein content was increased (*Figure 5B*). In PMI mice, the results were similar overall, notably regarding SERCA2a, NCX1, and S100A1. However, the P-PLB/PLB ratio was decreased (*Figure 5D–F*), and the $Pser^{2809}$RyR/RyR ratio was increased (*Figure 5G–I*). Metoprolol had substantial beneficial effects on both BB-BNP-Sham and BB-PMI mice by preventing the reduction in SERCA2a and S100A1 and the increase in NCX1, and by increasing the P-PLB/PLB ratio (*Figure 5A–F*). Metoprolol also decreased the $Pser^{2809}$RyR/RyR ratio in BB-PMI mice (*Figure 5G–I*).

4. Discussion

In the present study, we show that in healthy mice, circulating BNP, at levels consistent with those measured during HF following MI, severely alters cellular and molecular functions in cardiomyocytes. Chronically elevated BNP sets the stage for alterations in cellular contraction and Ca^{2+} handling and promotes the occurrence of spontaneous cellular Ca^{2+} waves and VAs *in vivo*. Most of these changes are prevented by the β-blocker metoprolol, suggesting a

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

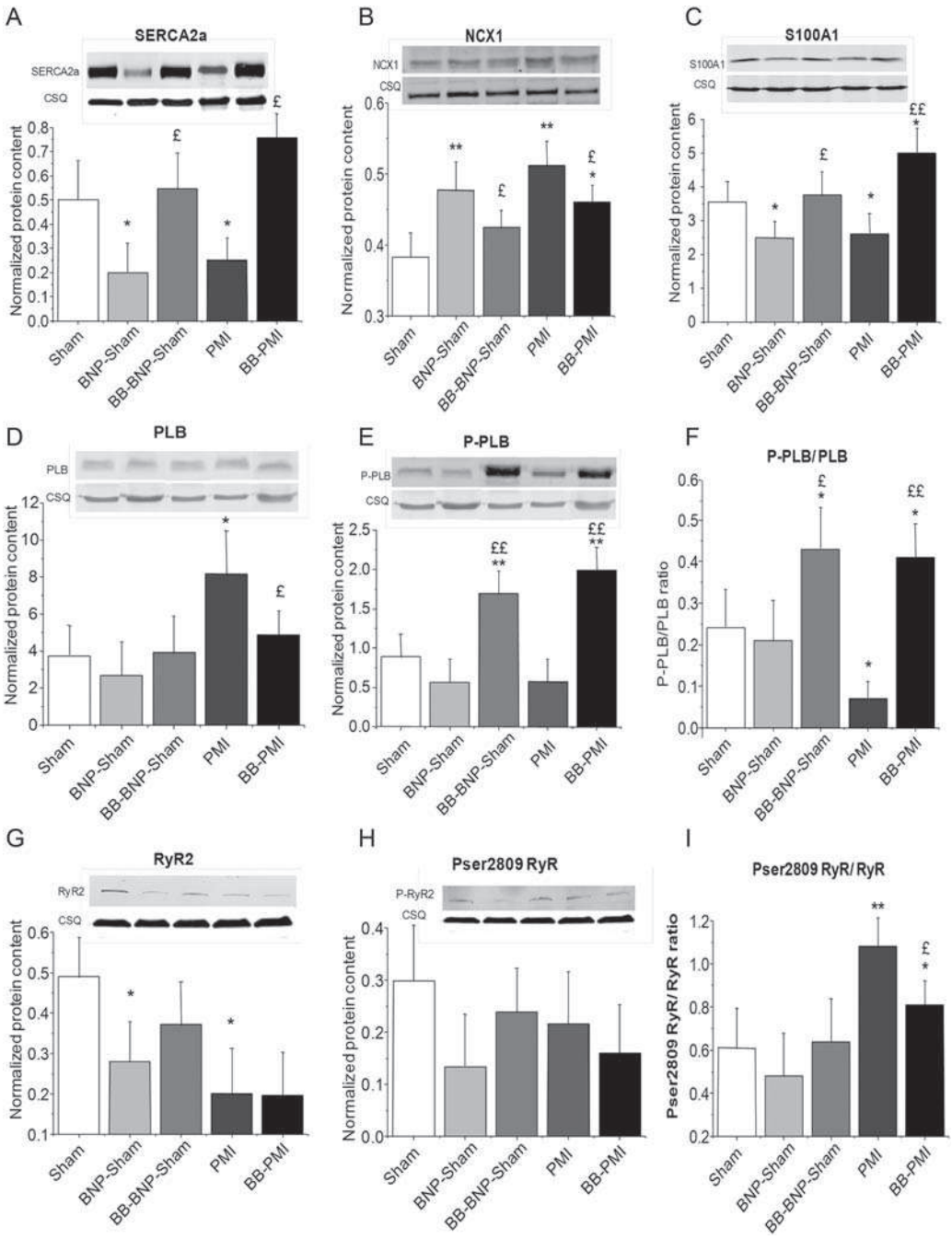


Figure 5 Ca^{2+}-handling proteins. Normalized protein content and ratios obtained by western blotting for SERCA2a (*A*), NCX1 (*B*), S100A1 (*C*), PLB (*D*), P-PLB (*E*), P-PLB/PLB (*F*) RyR2 (*G*), P-RyR (*H*), and P-RyR/RyR (*I*). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, BNP-Sham/PMI vs. Sham animals; $^{£}P < 0.05$ and $^{££}P < 0.01$ for metoprolol-treated vs. untreated animals; $n = 8$ animals per group.

role for the sympathetic nervous system in the cardiac effects of circulating BNP.

4.1 High blood BNP levels promote Ca^{2+} waves and VA in healthy mice

A striking finding was that chronic exposure of the heart to high BNP levels promoted PVC, consistent with the correlation between high BNP levels and VA and SCD in HF patients.[2] VA occurred in the absence of fibrosis, in line with the normal QRS duration, and was associated with mechanisms intrinsic to LV cardiomyocytes and consistent with the participation of spontaneous diastolic Ca^{2+} waves. The accumulation of aberrant RyR openings in diastole, observed functionally by the higher incidence of Ca^{2+} sparks, provided the substrate for VA/VT by generating Ca^{2+} waves.[9,10] Spontaneous Ca^{2+} waves are known to induce a transient inward depolarizing current (I_{ti}) via NCX activation.[31] The increase in NCX1 protein was also likely to favour cellular arrhythmias.[11]

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

4.2 High blood BNP blunts SERCA2a and S100A1

Chronic exposure to BNP increased the frequency of Ca^{2+} sparks and reduced SR Ca^{2+} content, normally regulated by the activity of SERCA2a and its regulatory proteins PLB and S100A1.[12,30] In a key finding, BNP blunted the expression of both SERCA2a and S100A1, explaining both the impairment of SR Ca^{2+} uptake and RyR-mediated SR Ca^{2+} leak. S100A1 is a Ca^{2+}-dependent molecular inotrope that regulates cardiac SR Ca^{2+}-handling and myofibrillar Ca^{2+} responsiveness.[32,33] S100A1 colocalizes and interacts with both the SERCA2a/PLB complex and RyR, thereby playing a key role in the coordinated enhancement of RyR2-mediated Ca^{2+} release during systole and SR-Ca^{2+} uptake during diastole.[34,35] S100A1 enhances SR Ca^{2+} load without changing the PLB/SERCA2a ratio or PLB phosphorylation.[36] S100A1 also inhibits spontaneous RyR activity and decreases SR Ca^{2+} leakage.[34,35]

The lack of change of $Pser^{2809}$RyR/RyR and P-PLB/PLB ratios in BNP-Sham mice and the fact that neither PKA nor CaMKII is involved in the regulation of RyR and PLB by S100A1[36] together suggest that phosphorylation is not a key player in the chronic effects of BNP. Our data are also consistent with the functional consequences of an S100A1 deficit.[36] Abnormal RyR openings in diastole occurred independently of increased PKA-dependent RyR phosphorylation, known to favour RyR opening.[37] An increase in spark frequency in the absence of increased PKA-dependent RyR phosphorylation is already known.[10] Therefore, the elevation in diastolic Ca^{2+} due to impaired SR Ca^{2+} uptake may contribute to SR Ca^{2+} leak, notably in relation with the biphasic Ca^{2+}-dependent effect of S100A1 on RyR activity, which depends on cytosolic Ca^{2+} levels.[30,36] Other mechanisms, such as S-nitrosylation, cannot be excluded.[10]

4.3 The role of ANS and the β1-adrenergic pathway

A recent report shows the beneficial effects of local BNP on SERCA2a following intramyocardial gene delivery.[38] This apparent inconsistency with our data, together with other reports,[13–15] may in fact reflect different aspects of BNP action: localized vs. systemic effects, and/or acute vs. chronic effects. A dose-dependent effect of circulating BNP has been described.[7,39] Our study points to the critical importance of systemic effects of chronically elevated BNP on cardiac function. Indeed, BNP induces a neurohormonal imbalance and affects the myocardium through sympathetic activation. Decreased HRV is a strong adverse prognostic marker for heart distress and cardiac mortality[40] in patients with decompensated HF[7] or sympathetic overdrive.[24] A decrease in SDNN is an established marker of sympathetic activation in HF, where its reduction parallels disease severity.[24] The increase in the LF and the LF/HF ratio, a sympathovagal index, in healthy mice treated with BNP further confirms enhanced sympathetic tone.[23,24] This is consistent with findings showing that high-dose BNP increases sympathetic activity in decompensated HF[7] or in patients with essential hypertension.[8] Overactivation of the sympathetic system is in part responsible for the cellular alterations observed in our model. These effects could result from a reflex response[7,8] or an enhancement of the adrenergic pathway,[15,41,42] which is known to promote ventricular hypertrophy and Ca^{2+}-cycling alterations.[43]

The use of metoprolol, which counteracts sympathetic overdrive, provides strong evidence for an active role of the β-adrenergic system in the adverse cardiac remodelling induced by chronic BNP. Indeed, metoprolol prevented several functional alterations, including Ca^{2+} mishandling and the triggering of cellular Ca^{2+} waves and VA in healthy BNP-treated animals. This is in line with results showing that high BNP sensitizes the β1-adrenergic response via NPR-B,[42] the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart.[41] At the protein level, metoprolol prevented SERCA2a and S100A1 blunting, thus maintaining normal SR Ca^{2+} re-uptake, correcting RyR-mediated Ca^{2+} leakage, and retaining low diastolic Ca^{2+} levels.[17,44] In short, metoprolol contributed to preserving SR Ca^{2+} content and Ca^{2+} transient amplitude, and consequently, cardiomyocyte contraction.[45]

4.4 Role of endogenous BNP during the progression of HF?

There were certain phenotypic differences between BNP-Sham and PMI mice: unlike PMI, BNP had no noticeable effect on myocardial function, heart rate, electrical conduction (QRS), or fibrosis in Shams. At the cardiomyocyte level, however, BNP-Sham mice exhibited established features of HF (reproduced in PMI mice) regarding Ca^{2+} handling. In addition, both BNP treatment and MI blunted the expression of S100A1, which contributes to Ca^{2+}-handling alterations and depressed contraction.[36,46] S100A1 is decreased in HF,[30] promotes SR Ca^{2+} leak by increasing the probability of RyR2 opening,[47] and hampers Ca^{2+} reuptake due to reduced SERCA2a activity.[30] Both altered SERCA2a expression and BNP production are considered early indicators of HF and are inversely correlated in human cardiac hypertrophy and HF.[14,48,49] Our finding regarding blunted S100A1 and SERCA2a expression in BNP-Sham mice further strengthens the concept that BNP contributes to adverse cardiac remodelling early in the progression of HF.[13,14] This could explain the ineffectiveness of nesiritide in treating HF, despite its beneficial haemodynamic effects.[15] Both HRV analysis and the prevention of the deleterious effects of BNP by metoprolol suggest that BNP acts in part through adrenergic overdrive. We observed similar effects of metoprolol in BB-PMI mice, confirming previous studies describing an increase in Ca^{2+} reuptake through increased SERCA2a expression, increased phosphorylation of PLB,[50] and decreased RyR2 phosphorylation. Our study also highlights the functional consequences of the previously unsuspected but recently described cardiac pro-adrenergic property of BNP,[15] which could potentially lead to a cellular HF-like profile with Ca^{2+}-cycling defects or aggravate existing HF.

4.4.1 Clinical implications

Our work shows that elevated blood BNP is not only a biomarker for guided therapy in HF but contributes *per se* to adverse cardiac remodelling and the triggering of VA, making the rapid lowering of BNP levels in HF patients a highly desirable end, in harmony with early in-hospital treatment aimed at decreasing BNP levels to improve survival.[51–53] Our study brings into question the treatment of HF patients with synthetic natriuretic peptide-like drugs, whose efficacy is uncertain[54,55] and whose link to increased mortality has been suspected.[5,6] Indeed, the ventricular remodelling induced by chronically elevated natriuretic peptides may limit their haemodynamic benefits. Overall, our work supports the general concept that the very early normalization of SERCA2a[56] or/and S100A1 expression[30] is critical in limiting adverse cardiac remodelling in HF. Last, but not least, β-blocker therapy should be considered as soon as BNP levels rise, even in patients without cardiac symptoms.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgments

We thank Dr S. Rasika of Gap Junction for English editing.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by funding from the Fondation de France (Project PepNaRhythm, no. 2068001722) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). SR, JF, OC and AL hold CNRS positions.

References

1. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T *et al*. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993;**88**:82–91.
2. Simon T, Becker R, Voss F, Bikou O, Hauck M, Licka M *et al*. Elevated B-type natriuretic peptide levels in patients with nonischemic cardiomyopathy predict occurrence of arrhythmic events. *Clin Res Cardiol* 2008;**97**:306–309.
3. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T *et al*. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004;**350**:655–663.
4. Cleland JG, Coletta AP, Buga L, Antony R, Pellicori P, Freemantle N *et al*. Clinical trials update from the American Heart Association meeting 2010: EMPHASIS-HF, RAFT, TIM-HF, Tele-HF, ASCEND-HF, ROCKET-AF, and PROTECT. *Eur J Heart Fail* 2011;**13**:460–465.
5. Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005;**293**:1900–1905.
6. Topol EJ. Nesiritide - not verified. *N Engl J Med* 2005;**353**:113–116.
7. Aronson D, Burger AJ. Effect of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) and dobutamine on heart rate variability in decompensated heart failure. *Am Heart J* 2004;**148**:e16.
8. La Villa G, Bisi G, Lazzeri C, Fronzaroli C, Stefani L, Barletta G *et al*. Cardiovascular effects of brain natriuretic peptide in essential hypertension. *Hypertension* 1995;**25**:1053–1057.
9. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev* 2008;**88**:1491–1545.
10. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, Cassan C, Richard S, Matecki S *et al*. Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:1559–1564.
11. Sipido KR, Volders PG, Vos MA, Verdonck F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res* 2002;**53**:782–805.
12. Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR. Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2008;**23**:6–16.
13. Toischer K, Kogler H, Tenderich G, Grebe C, Seidler T, Van PN *et al*. Elevated afterload, neuroendocrine stimulation, and human heart failure increase BNP levels and inhibit preload-dependent SERCA upregulation. *Circ Heart Fail* 2008;**1**:265–271.
14. Kogler H, Schott P, Toischer K, Milting H, Van PN, Kohlhaas M *et al*. Relevance of brain natriuretic peptide in preload-dependent regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase expression. *Circulation* 2006;**113**:2724–2732.
15. Chan NY, Seyedi N, Takano K, Levi R. An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase g-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition. *Circulation* 2012;**125**:298–307.
16. Maczewski M, Mackiewicz U. Effect of metoprolol and ivabradine on left ventricular remodelling and Ca^{2+} handling in the post-infarction rat heart. *Cardiovasc Res* 2008;**79**:42–51.
17. Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY. Effect of beta-blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. *Chest* 2005;**128**:1812–1821.
18. Ahmet I, Morrell C, Lakatta EG, Talan MI. Therapeutic efficacy of a combination of a beta1-adrenoreceptor (AR) blocker and beta2-AR agonist in a rat model of postmyocardial infarction dilated heart failure exceeds that of a beta1-AR blocker plus angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;**331**:178–185.
19. Xydas S, Kherani AR, Chang JS, Klotz S, Hay I, Mutrie CJ *et al*. beta(2)-Adrenergic stimulation attenuates left ventricular remodeling, decreases apoptosis, and improves calcium homeostasis in a rodent model of ischemic cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**317**:553–561.
20. Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:5809–5814.
21. Thireau J, Aimond F, Poisson D, Zhang B, Bruneval P, Eder V *et al*. New insights into sexual dimorphism during progression of heart failure and rhythm disorders. *Endocrinology* 2010;**151**:1837–1845.
22. Das MK, Maskoun W, Shen C, Michael MA, Suradi H, Desai M *et al*. Fragmented QRS on twelve-lead electrocardiogram predicts arrhythmic events in patients with ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 2010;**7**:74–80.
23. Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol* 2008;**93**:83–94.
24. Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996;**93**:1043–1065.
25. Thireau J, Poisson D, Zhang BL, Gillet L, Le Pecheur M, Andres C *et al*. Increased heart rate variability in mice overexpressing the Cu/Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2008;**45**:396–403.
26. Cooley RL, Montano N, Cogliati C, van de Borne P, Richenbacher W, Oren R *et al*. Evidence for a central origin of the low-frequency oscillation in RR-interval variability. *Circulation* 1998;**98**:556–561.
27. van de Borne P, Montano N, Pagani M, Oren R, Somers VK. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. *Circulation* 1997;**95**:1449–1454.
28. Wei S, Chow LT, Sanderson JE. Effect of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;**36**:276–281.
29. Metoprolol in acute myocardial infarction. Other clinical findings and tolerability. The MIAMI Trial Research Group. *Am J Cardiol* 1985;**56**:39G–46G.
30. Most P, Pleger ST, Volkers M, Heidt B, Boerries M, Weichenhan D *et al*. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest* 2004;**114**:1550–1563.
31. Shannon TR, Lew WY. Diastolic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum: a potential target for treating triggered arrhythmias and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2009;**53**:2006–2008.
32. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Borries M *et al*. S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:13889–13894.
33. Remppis A, Most P, Loffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Pleger S *et al*. The small EF-hand Ca^{2+} binding protein S100A1 increases contractility and Ca^{2+} cycling in rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 2002;**97**(Suppl. 1):I56–I62.
34. Kettlewell S, Most P, Currie S, Koch WJ, Smith GL. S100A1 increases the gain of excitation-contraction coupling in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**39**:900–910.
35. Most P, Remppis A, Pleger ST, Katus HA, Koch WJ. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**:R568–R577.
36. Rohde D, Ritterhoff J, Voelkers M, Katus HA, Parker TG, Most P. S100A1: a multifaceted therapeutic target in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;**3**:525–537.
37. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D *et al*. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 2003;**278**:444–453.
38. Moilanen AM, Rysa J, Mustonen E, Serpi R, Aro J, Tokola H *et al*. Intramyocardial BNP gene delivery improves cardiac function through distinct context-dependent mechanisms. *Circ Heart Fail* 2011;**4**:483–495.
39. Brunner-La Rocca HP, Kaye DM, Woods RL, Hastings J, Esler MD. Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. *J Am Coll Cardiol* 2001;**37**:1221–1227.
40. Fauchier L, Babuty D, Cosnay P, Autret ML, Fauchier JP. Heart rate variability in idiopathic dilated cardiomyopathy: characteristics and prognostic value. *J Am Coll Cardiol* 1997;**30**:1009–1014.
41. Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology* 2007;**148**:3518–3522.
42. Qvigstad E, Moltzau LR, Aronsen JM, Nguyen CH, Hougen K, Sjaastad I *et al*. Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:763–772.
43. Engelhardt S, Hein L, Dyachenkow V, Kranias EG, Isenberg G, Lohse MJ. Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 2004;**109**:1154–1160.
44. Kubo H, Margulies KB, Piacentino V 3rd, Gaughan JP, Houser SR. Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation* 2001;**104**:1012–1018.
45. Reiken S, Wehrens XH, Vest JA, Barbone A, Klotz S, Mancini D *et al*. Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* 2003;**107**:2459–2466.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

46. Pleger ST, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun JK, Pleger W et al. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* 2007;**115**:2506–2515.
47. Volkers M, Loughrey CM, Macquaide N, Remppis A, DeGeorge BR Jr, Wegner FV et al. S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium* 2007;**41**:135–143.
48. de Boer RA, Henning RH, Suurmeijer AJ, Pinto YM, Olthof E, Kirkels JH et al. Early expression of natriuretic peptides and SERCA in mild heart failure: association with severity of the disease. *Int J Cardiol* 2001;**78**:5–12.
49. Takahashi T, Allen PD, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res* 1992;**71**:9–17.
50. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:566–577.
51. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003;**107**:1278–1283.
52. Cohen-Solal A, Logeart D, Huang B, Cai D, Nieminen MS, Mebazaa A. Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2009;**53**:2343–2348.
53. Fujimura M, Akaike M, Iwase T, Yoshida S, Sumitomo Y, Yagi S et al. Decrease in plasma brain natriuretic peptide level in the early phase after the start of carvedilol therapy is a novel predictor of long-term outcome in patients with chronic heart failure. *Acta Cardiol* 2009;**64**:589–595.
54. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;**119**:e391–e479.
55. O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, Armstrong PW, Dickstein K, Hasselblad V et al. Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *N Engl J Med* 2011;**365**:32–43.
56. Byrne MJ, Power JM, Preovolos A, Mariani JA, Hajjar RJ, Kaye DM. Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther* 2008;**15**:1550–1557.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on August 12, 2013

4- Discussion et conclusion

L'administration chronique de BNP, à une dose de 0,03 µg/kg/min, chez des souris Sham, pendant 2 semaines, a induit un niveau plasmatique de BNP équivalent à celui mesuré chez les souris PMI à 14 jours post-chirurgicaux. Cette étude nous a permis alors de caractérriser les effets chroniques de cette dose de BNP, normalement trouvée chez les PMI, sur des cœurs sains de Sham.

✓ Le BNP induit une hypertrophie cardiaque et une désorganisation des mouvements calciques

La dose élevée de BNP a induit une hypertrophie cardiaque chez les souris BNP-Sham, associée à une augmentation du volume des cardiomyocytes du VG. Malgré l'absence d'altération dans l'activité contractile globale du cœur (conservation de la dilatation et de la FR cardiaques), cette hypertrophie cellulaire est associée à des altérations des mouvements calciques, caractérisées par : i) une augmentation des fuites calciques spontanées ; ii) une diminution du contenu du RS ; iii) une diminution de l'amplitude des transitoires calciques ; iv) une diminution de la vitesse de recaptage du Ca^{2+} dans le RS ; v) une augmentation du niveau basal de Ca^{2+} diastolique ; et vi) une augmentation de la survenue des vagues calciques spontanées pro-arythmogéniques. Ces différentes altérations sont observées chez les souris PMI, et ont déjà été décrites dans l'IC décompensée.(207,208) Ces altérations fonctionnelles peuvent être expliquées, au moins en partie, par la diminution de l'expression des protéines RyR2, SERCA2a et l'augmentation de celle de NCX1, mais surtout par la diminution de l'expression de la S100A1, induites par le BNP. Ces différentes modifications moléculaires sont observées chez les PMI et ont été décrites dans différents cas d'IC.(78,79,82,209,210)

✓ Le BNP en chronique crée un substrat pro-arythmogénique malgré l'absence de fibrose

Le BNP en chronique a induit une prolongation de la durée de l'intervalle QTc chez des souris saines de base. Cette prolongation est probablement due à la prolongation de la DPA, effet déjà reporté en aigu pour le BNP par deux équipes différentes.(151,152) Prolongation de la repolarisation ventriculaire, augmentation du Ca^{2+} diastolique et de l'expression de NCX, ces trois altérations associées caractérisent l'IC et induisent une augmentation des arythmies cellulaires et cardiaques, observées ici par augmentation des ESV (PVC dans l'article).

✓ Le BNP en chronique active la voie β-adr

La supplémentation en BNP pendant deux semaines crée un déséquilibre hormonal par une activation importante du SN sympathique et de la voie β-adr (FC élevée et variabilité du

rythme sinusale faible). Cette activation peut être, soit directe par activation des récepteurs NPR-A au niveau des synapses sympathiques ;(180,181) soit indirecte, par activation du baro-réflexe en réponse aux effets anti-hypertenseurs du BNP.(178,179) La suractivation chronique du SN sympathique caractérise l'IC et peut être à l'origine de différentes altérations cellulaires et cardiaques.

✓ L'inhibition de la voie β-adr prévient les effets délétères du BNP sur les altérations des mouvements calciques systoliques et diastoliques et les arythmies

Les effets délétères du BNP passeraient, au moins en partie, à travers la signalisation β-adr. Dans cette étude, le BB empêche : i) les altérations au niveau des transitoires calciques; ii) l'augmentation des fuites calciques spontanées; iii) la diminution de l'expression de la SERCA et de la S100A1 et l'augmentation de celle de NCX; iv) la prolongation de QTc; et v) le déclenchement des vagues calciques cellulaires et des ESV cardiaques chez les souris Sham traitées au BNP et chez les PMI. Ceci peut être dû à des déséquilibres de signalisation intracellulaire gouvernée par le *cross-talk* GMPc-AMPc dépendant. En effet, des études montrent que le BNP peut activer la signalisation β-adr en inhibant la PDE3 *via* la stimulation des récepteurs NPR-B pré-dominants dans l'IC ;(128) alors que d'autres études montrent que l'expression et l'activité de la PDE2, à effet AMPc-hydrolysant GMPc-dépendant, est augmentée dans l'IC et contribue à la désensibilisation des récepteurs β-adr.(211)

✓ Implications cliniques

Notre étude montre que l'augmentation importante et chronique du BNP au cours du remodelage cardiaque pathologique n'est pas une simple conséquence de la surcharge cardiaque, mais qu'elle peut également être fortement impliquée dans la progression de ce remodelage et la dysfonction du VG. Ceci va en parallèle avec les études qui montrent que la réduction du taux de BNP avec les traitements cardiaques améliore la performance cardiaque et réduit la morbidité et la mortalité des patients.(166,204) Notre étude confirme également l'efficacité du traitement par des BB chez des patients en IC, généralement présentant un taux élevé de BNP.(55,205) Le nésirtide n'est pas alors conseillé pour le traitement des patients, et s'il est donné pour ses effets anti-fibrotiques et hémodynamiques relaxants, il devrait être combiné à un traitement au BB pour réduire ses effets sur le déséquilibre de la balance hormonale, sur la signalisation de la voie β-adr et sur les altérations des mouvements calciques pro-arythmogéniques qui s'en suivent.

✓ Limites du modèle

Un taux élevé de BNP en chronique induit alors des altérations du CEC et de l'électrophysiologie cardiaque chez des souris saines. Mais notre étude ici reste limitée à un modèle sain dénué de pathologie cardiaque. Nous nous demandons alors quelles seraient les effets chroniques du BNP sur un cœur ischémique. Est-ce que les effets hémodynamiques relaxants et anti-fibrotiques du BNP pourraient contre-balancer la suractivation chronique des systèmes hormonaux vasoconstricteurs comme le SRAA et le SN sympathique? La libération cardiaque en urgence de cette hormone, dans les quelques heures suivant un infarctus (3) pourrait-elle prolonger la phase précoce compensatoire du remodelage cardiaque en prévenant les altérations du CEC et la survenue des arythmies cardiaques?

Partie 2 : Caractérisation de la phase précoce du remodelage cardiaque des souris PMI

Progression précoce du remodelage cardiaque post-ischémique aux niveaux morpho-fonctionnel, électrophysiologique et du CEC

1- Introduction

Malgré une meilleure prise en charge de l'IC, les patients atteints de ce syndrome ont un risque élevé de morbidité et de mortalité.(212) Il est donc très important de bien discerner les différentes phases de cette pathologie pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques préventives et réparatrices. Pour y arriver, il est indispensable de caractériser les différentes altérations cellulaires et moléculaires sous-jacentes et de tester de nouveaux concepts thérapeutiques sur des modèles expérimentaux adéquats. Ceci a été récemment mis en évidence dans une étude publiée par l'*American Heart Association (AHA)* où les auteurs insistent sur le manque d'études actuelles visant les stades précoces et la progression du remodelage cardiaque.(2)

L'ischémie et l'hypertension artérielle sont les causes majeures du développement de l'IC chez l'Homme. De plus, ≈5% des patients meurent toujours après un infarctus du myocarde en France.(213) De meilleures stratégies thérapeutiques sont importantes à mettre au point pour améliorer l'état de santé de ces patients et combattre la pathologie. Des études ont montré que l'administration de nésiritide, forme recombinante du BNP humain, à des patients en IC aigue décompensée risque d'augmenter la mortalité à court et moyen termes, malgré des effets anti-fibrotiques et hémodynamiques vasorelaxants.(6–8) Une meilleure caractérisation de ce stade pathologique cardiaque précoce qui suit la survenue de l'événement déclencheur et de son évolution présente alors un grand intérêt.

Généralement, après un infarctus, le cœur s'hypertrophie.(214) Cette hypertrophie a un rôle compensateur parce qu'elle permet d'améliorer le DC et de limiter la consommation d'oxygène par le cœur. Cependant, la phase tardive de ce remodelage s'accompagne d'altérations de l'activité des canaux ioniques et de l'homéostasie calcique, bien connues, qui prédisposent à la dysfonction du VG et au déclenchement d'arythmies ventriculaires malignes. En effet, il est

bien décrit que la phase décompensée de l'IC se caractérise par : i) une prolongation de la DPA ; ii) une diminution de l'expression de la pompe calcique SERCA2a, une hyperphosphorylation de PLB et de RyR2 induisant une diminution du recaptage de Ca^{2+} par le RS et une augmentation des fuites calciques spontanées de ce compartiment ; et iii) une diminution de l'expression et de l'activité de la protéine S100A1. Ces différentes altérations peuvent être à l'origine de la dégradation de la performance cardiaque et de la survenue d'arythmies fatales. (pour revues:(48,63,214))

L'objectif de notre étude ici est alors de caractériser la phase précoce du remodelage cardiaque post-ischémique sur un modèle de souris PMI : de bien comprendre les modifications précoces survenant au niveau de la fonction électrophysiologique et contractile cardiaque *in vivo* et des mouvements calciques cellulaires et du CEC ; de suivre la progression des altérations avec le remodelage au cours du temps et de mieux comprendre le passage de la phase de compensation à la décompensation dans l'IC.

2- Méthodologie

Au cours de cette deuxième partie, nous avons travaillé sur 2 groupes expérimentaux : les Sham et les PMI, à différents stades post-chirurgicaux, comme cela est indiqué dans la figure 45 :

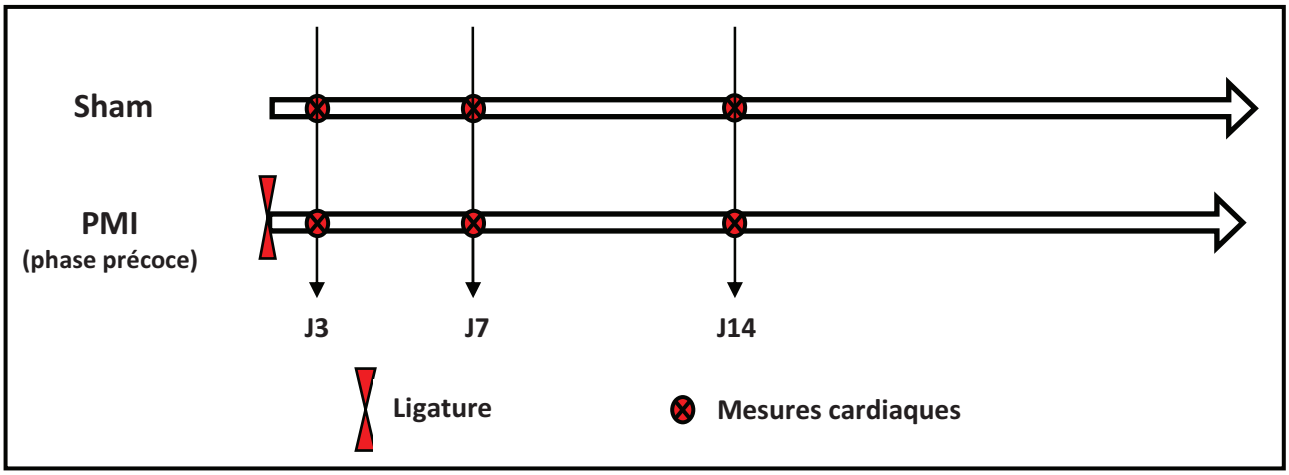


Figure 45 - Protocole expérimental suivi au cours de la deuxième partie des résultats

Nous avons suivi, au cours du temps (J3, J7 et J14), les modifications aux niveaux morpho-fonctionnels cardiaques par échocardiographie et au niveau électrophysiologique par télémétrie sur des souris vigiles ; les altérations des mouvements calciques intracellulaires et de la contraction cellulaire ont été suivis par imagerie calcique en microscopie photonique sur cardiomyocytes du VG chargées par l'Indo1-AM ; et la survenue des *sparks* calciques spontanés a été étudiée en microscopie confocale sur cellules chargées au Fluo4-AM.

3- Résultats

✓ Dès J3, le cœur des PMI est hypertrophié, dilaté, avec une diminution de la contractilité

Les analyses échocardiographiques ont montré que dès 3 jours après la chirurgie, des paramètres morphologiques du cœur sont déjà altérés chez les PMI par rapport aux Sham (fig.1A-E). En effet, la cavité du VG est dilatée chez les PMI (diamètre du VG: 4,14 ±0,09 et 2,68 ±0,06 mm chez les PMI et les Sham, respectivement, $p<0,001$). De plus, le rapport poids du cœur (HW: *Heart Weight*) / poids du corps (BW: *Body Weight*), paramètre utilisé pour l'évaluation de l'hypertrophie cardiaque, est augmenté chez les PMI dès J3 (HW/BW: 10,2 ±0,7 et 7,0 ±0,4 mg/g chez les PMI et les Sham à J3, respectivement, $p<0,001$) (fig.1F). Le poids de l'animal étant le même chez les PMI et les Sham (22,2 ±0,7 et 22,0 ±0,7 g, respectivement), le cœur est alors hypertrophié très tôt après la ligature coronaire chez les PMI. Cette hypertrophie de la paroi survivante du VG est également observée au niveau de la surface des cardiomyocytes de cette région (longueur x largeur cellulaires : 3114 ±147 et 2203 ±112 μm^2 chez les PMI et les Sham à J3, respectivement, $p<0,001$) (fig.1G).

Au niveau fonctionnel, le VG perd très tôt sa contractilité (FR: 23 ±1 et 60 ±1 % chez les PMI et les Sham à J3 respectivement, $p<0,001$), mais la FC et le DC restent inchangés chez les PMI par rapport aux Sham à J3. La diminution de la contractilité est probablement due à la sévérité de la ligature et à la mort cellulaire importante qui en résulte.

A J7, la FC augmente chez les Sham par rapport à J3 et reste stable à J14 (FC: 702 ±13 et 649 ±13 bpm chez les Sham à J7 et J3, respectivement, $p<0.01$). Le DC est également augmenté à J7 et J14 chez les Sham (DC: 14,5 ±0,3 et 11,7 ±0,3 cm^3/min chez les Sham à J7 et J3, respectivement, $p<0,001$). L'effet sur la FC et le DC chez les Sham suit exactement la même évolution. Cependant, ces deux paramètres vitaux restent faibles chez les PMI à J7 et à J14, même si le DC augmente légèrement chez les PMI à J14 mais avec une variabilité importante entre les animaux (10,0 ±0,4; 10,1 ±0,7 et 11,5 ±1,3 cm^3/min chez les PMI à J3, J7 et J14, respectivement).

Ces résultats suggèrent que des effets post-opératoires chez les Sham et les PMI existent à J3 et maintiennent la FC et le DC à des niveaux faibles. Une semaine après la chirurgie, les Sham arrivent à restaurer des niveaux homéostatiques, mais les PMI, malgré la dilatation de la cavité du VG et l'hypertrophie de sa paroi, la diminution importante de sa contractilité réduit le rendement du cœur. Les cellules survivantes sont hypertrophiées très précocément.

✓ La durée de l'intervalle QT est prolongée chez les PMI dès J3, la variabilité du rythme sinusale est réduite à J14

Nous avons mesuré l'activité électrophysiologique du cœur *in vivo* par télémétrie. Pour cela, des capteurs ont été implantés en sous-cutanés, une à deux semaines avant la chirurgie Sham ou de ligature. Ce protocole nous permet de commencer les enregistrements à 3 jours après l'opération sans effet considérable de la chirurgie d'implantation.(196) L'analyse des intervalles PR, QRS et QT des ECG ainsi que celle de la variabilité du rythme sinusal (HRV pour *heart rate variability*) a été effectuée sur les 12h d'obscurité (de 19h à 7h du matin), période active des rongeurs. La figure 2A montre des exemples d'enregistrements obtenus à J3 chez les Sham et les PMI. Très tôt après la ligature, l'aspect des ECG est modifié par rapport aux Sham en raison de l'ischémie massive engendrée au niveau du VG.

Dès J3, la durée de l'intervalle PR est réduite chez les PMI par rapport aux Sham (30,1 ±1,4 et 33,0 ±0,9 ms chez les PMI et les Sham respectivement). La durée de l'intervalle QRS n'est pas modifiée chez les PMI (fig.2C). Par contre, l'intervalle QT est inversé chez les PMI et prolongé par rapport aux Sham (QTc : QT corrigé en fonction de la FC, par la formule de Bazzett : $QTc=QT/\sqrt{RR}$: 6,0 ±0,1 et 4,2 ±0,2 ms chez les PMI et les Sham respectivement, $p<0,001$) (fig. 2B,D). Ces modifications des durées des intervalles persistent à J7 et à J14.

Au cours du temps, nous avons aussi observé une modification de la durée de l'intervalle QT chez les Sham. En effet, l'intervalle QTc est plus court à J14 par rapport à J3 (3,6 ±0,1 ms à J14, $p<0,05$ par rapport à J3). De plus, bien que la durée de l'intervalle RR (intervalle entre 2 battements cardiaques) soit constante entre J3 et J14 chez les Sham, les paramètres marquant la variabilité de cet intervalle au cours du temps (SDNN: déviation standard de l'intervalle RR, et pNN6: pourcentage des intervalles RR consécutifs dont la différence est > 6 ms) sont modifiés. Le SDNN et le pNN6 sont augmentés à J14 par rapport à J3 et à J7 chez les Sham (fig.2F,G). Ces deux paramètres reflètent l'activité du SN autonome sur le cœur. Le SDNN est généralement inversement proportionnel à l'activité du SN sympathique et le pNN6 directement proportionnel à celle du SN parasympathique.(196,215) Les modifications longitudinales observées montrent donc que le SN sympathique a été fortement activé dans les stades précoces post-opératoires (J3 et J7), alors que le SN vagale était déprimé à ces stades.

Cependant, chez les PMI, le SDNN et le pNN6 ne sont pas modifiés à J14 par rapport à J3 et J7 ; ce qui rend ces paramètres plus faibles par rapport aux Sham à J14. L'augmentation persistante du SN sympathique chez les PMI s'accompagne d'une réduction de l'intervalle RR à J14 par rapport aux Sham (102,1 ±2,6 et 113,6 ±2,6 ms chez les PMI et les Sham respectivement, $p<0,01$) (fig.2E). Des effets post-opératoires précoces, à J3 et à J7, peuvent alors mas-

quer des différences majeures existant entre les 2 groupes Sham et PMI, surtout au niveau *in vivo*. Les résultats à ces stades sont alors à considérer avec précaution.

✓ Dès J3, le CEC est « renforcé » chez les PMI mais les altérations de la recapture du Ca^{2+} par le RS apparaissent dès J14

Sur des cardiomyocytes du VG fraichement isolés, nous avons mesuré le raccourcissement des sarcomères et les transitoires calciques cytosoliques en réponse à des stimulations électriques de champ délivrées à une fréquence de 1 Hz.

Nous avons observé des réponses modifiées des cellules Sham en fonction du stade post-opératoire (fig.3A-B). En effet, l'amplitude des transitoires calciques et, en parallèle, celle de la contraction, sont plus importantes à J7 par rapport à J3 (amplitude des transitoires calciques: 0,162 ±0,140 et 0,119 ±0,005 à J7 et J3, respectivement, $p<0,01$), mais elles diminuent par la suite à J14 (amplitude des transitoires calciques: 0,129 ±0,007 à J14, $p<0,05$ par rapport à J7). Le temps de recapture du Ca^{2+} du cytosol (tau) principalement dans le RS est évalué en moyennant la constante de temps de déclin des transitoires calciques. Le tau diminue au fur et à mesure de J3 à J14 chez les Sham (231 ±8 et 202 ±6 ms à J3 et J14, respectivement, $p<0,01$) (fig.3E). Le niveau basal diastolique en Ca^{2+} change dans le même sens (fig.3F). Ceci suggère que l'activité de la pompe SERCA est augmentée progressivement pendant les deux premières semaines suite au stress occasionné par l'opération.

Chez les PMI, dès J3, il y a une augmentation importante de l'amplitude des transitoires calciques et de celle de la contraction cellulaire (amplitude des transitoires calciques: 0,209 ±0,008 chez les PMI à J3, $p<0,001$ par rapport aux Sham au même stade). Cependant, les modifications post-opératoires dépendantes du temps sont effacées chez les PMI. Le niveau basal de Ca^{2+} n'est pas non plus modifié au cours du temps, ceci le rend significativement élevé par rapport à celui des Sham à J7 et J14 (fig.3D). Enfin, le tau de recapture du Ca^{2+} est significativement augmenté chez les PMI à J14 par rapport à J3 (258 ±8 et 219 ±7 ms chez les PMI à J14 et J3, respectivement, $p<0,01$) et par rapport aux Sham J14 (fig.3E). Ceci suggère que l'activité de la pompe SERCA est altérée à partir de J14 chez les PMI.

✓ Dès J3, le contenu du RS est augmenté chez les PMI et l'activité des RyR est altérée à J14

Nous avons mesuré les *sparks* calciques spontanés pour évaluer l'activité des RyR. Chez les Sham, la fréquence des *sparks* calciques est augmentée à J7 et J14 par rapport à J3 (1,21 ±0,06; 1,89 ±0,08 et 1,80 ±0,06 chez les Sham à J3, J7 et J14, respectivement, $p<0,001$ par rapport à J3) (fig.4C). Ceci suggère que des effets post-opératoires précoces inhibent l'activité

des RyR à J3. Cependant, chez les PMI, cet effet n'est pas observé en apparence car il est difficile de discriminer la part liée au stress post-opératoire de l'effet de la ligature en lui-même au cours de la première semaine suivant la ligature. Mais à J14, la fréquence et l'amplitude des *sparks* calciques sont augmentées par rapport aux stades plus précoces et par rapport aux Sham (fig.4B-D). Ceci montre que l'activité des RyR est altérée au bout de deux semaines après la ligature.

Le contenu du RS en Ca^{2+} dépend de l'activité de SERCA et de RyR et il influence l'amplitude du transitoire calcique. Il est évalué en appliquant une forte concentration de caféine (10 nM) sur des cellules quiescentes pour activer les canaux RyR et vider le RS. Chez les Sham, ce contenu est augmenté à J7 par rapport à J3 (fig.4A). Chez les PMI, le contenu du RS est plus important par rapport à celui des Sham dans les 3 stades étudiés. A J14, malgré l'atération de la fonction des RyR et de la SERCA, le contenu du RS reste élevé et permet d'assurer une amplitude élevée de transitoire calcique. Le remodelage reste alors compensateur à ce stade au niveau du CEC malgré des altérations de la fonction moléculaire.

4- Discussion

Notre étude préliminaire du modèle expérimental utilisé pour étudier les effets du BNP aux stades précoces après l'infarctus du myocarde chez la souris montre que **des effets post-opératoires surviennent pendant la première semaine après la procédure chirurgicale**. Ces effets sont, bien sûr, plus facilement observés chez les Sham : *in vivo* par la diminution précoce (J3) de la FC, du DC et la prolongation de la durée de l'intervalle QT, au niveau des modifications précoces des mouvements calciques et de la contraction cellulaire. Chez les PMI, des modifications morpho-fonctionnelles *in vivo*, comme la dilatation et l'hypertrophie cardiaque, des adaptations électrophysiologiques comme la prolongation de la durée de l'intervalle QTc, ainsi que des modifications compensatrices du CEC, comme l'augmentation du contenu du RS, de l'amplitude des transitoires calciques et de la contraction des cellules survivantes du VG surviennent très tôt après l'infarctus, soit dès 3 jours post-opératoires. De plus, des altérations dans l'activité des protéines du RS : le RyR et la SERCA, ont été identifiées à partir de 14 jours post-infarctus.

✓ Modifications post-opératoires

Différents types de modifications post-opératoires ont été décrits précédemment. Tout d'abord, il a été montré que l'inhalation d'agents anesthésiques, notamment l'isoflurane, utilisé au cours de nos procédures chirurgicales, réduit la performance cardiaque. Au niveau de

l'électrophysiologie cardiaque, l'isoflurane réduit les variations du rythme cardiaque en réduisant l'efficacité totale du SN autonome.(216,217) Au niveau cellulaire, des effets inotropes négatifs sur le CEC ont été attribués à l'isoflurane. En effet, cet anesthésique réduit la DPA en inhibant la fonction des canaux LTCC,(218) réduit le contenu du RS,(219) la libération calcique du RS (220) et également la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+}.(221,222) De plus, des études ont montré qu'une période pouvant aller jusqu'à 10 jours est nécessaire pour éliminer les interférences chirurgicales et les effets des anesthésiques inhalés, et ainsi, stabiliser la fonction cardiaque chez les rongeurs.(196,223) Ceci peut alors expliquer l'augmentation progressive au cours du temps de la FC et du DC chez les Sham, observés en échocardiographie ; l'augmentation du SDNN et du pNN6 à J14 observée en télémétrie ; et, au niveau cellulaire, l'augmentation progressive de la fréquence des *sparks* calciques, de l'amplitude des transitoires calciques et de la contraction, ainsi que celle de la vitesse de recaptage de Ca^{2+} dans le RS, du contenu du RS, et la diminution du niveau cytosolique de Ca^{2+} diastolique dans la première semaine suivant la chirurgie chez les Sham. Le raccourcissement progressif de la durée de l'intervalle QTc au cours du temps peut être dû à un effet de l'anesthésie ou du stress post-opératoire sur des courants de la repolarisation cellulaire dès le stade précoce.

Chez les PMI, les effets post-opératoires dépendant de l'anesthésique semblent être plutôt masqués par d'autres effets liés à la ligature expérimentale de l'artère coronaire. En effet, le stade précoce post-ischémique est caractérisé par : i) une mort cellulaire élevée ; ii) un stress oxydatif et des réactions inflammatoires dans le myocarde endommagé ; iii) une production exagérée d'espèces réactives oxygénées (ROS) et de cytokines inflammatoires (TNFα, IL6, TGFβ, etc) ; iv) des modifications dans la matrice extracellulaire résultant de l'activation des matrices métalloprotéinases, notamment MMP9 et MMP2 ; v) la synthèse de collagènes et la fibrose myocardique.(224,225) Des hyperactivations de systèmes neurohormonaux, notamment le SN sympathique et le SRAA, accentuent ces mécanismes de remodelage post-ischémiques.(48,226) Ces différentes modifications peuvent être à l'origine de l'hypertrophie cardiaque, de l'augmentation des mouvements calciques et de l'efficacité du CEC dans les cardiomyocytes survivants du VG au cours des phases précoces suivant le dommage cardiaque.(95) De plus, une augmentation de l'expression de la protéine S100A1 est un biomarqueur de la phase aigue après infarctus chez l'Homme (210) et pourrait être impliquée dans notre modèle expérimental. Le renforcement du CEC semble plutôt bénéfique dans les stades précoces du remodelage cardiaque, parce qu'il permet d'augmenter, même si ce n'est que légèrement, le DC, sachant que plus de 70% du VG est mort chez ces souris.

✓ L'hypertrophie cardiaque précède l'altération de la fonction des protéines du CEC chez les PMI

La fonctio, de certaines protéines du CEC semble être altérée chez les souris PMI à partir du stade J14. En effet, nos résultats montrent à ce stade chez les PMI une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des *sparks* calciques et une diminution de la vitesse de recapture du Ca^{2+} dans le RS (diminution du tau). Ces effets sont connus pour avoir comme origine une altération de la fonction des canaux RyR et de la pompe SERCA, respectivement. Cependant, l'hypertrophie au niveau du cœur entier et des cardiomyocytes ventriculaires apparait dès J3. Le lien entre l'hypertrophie cellulaire et la dérégulation des mouvements calciques reste un sujet de débat non résolu. En effet, des études ont montré que la dérégulation des mouvements calciques est à l'origine de l'hypertrophie cellulaire : une augmentation chronique de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire peut activer la voie calcineurine/NFAT, à l'origine de l'activation de médiateurs de l'hypertrophie, comme GATA4 et MEF2.(227–229) Cependant, d'autres études ont montré que c'est l'hypertrophie qui est à l'origine du découplage de CEC suite à l'altération de la structure des dyades entre le RS et le sarcolemme.(73,74) Notre étude montre que, dans le modèle de souris PMI, l'hypertrophie cellulaire précoce n'est probablement pas associée à une altération précoce des dyades parce que la stimulation électrique membranaire arrive à générer un transitoire calcique d'amplitude plus importante par rapport à celle observée chez les Sham. Elle n'est pas non plus associée à une augmentation du niveau du Ca^{2+} diastolique parce qu'à J3 chez les PMI, la cellule est déjà hypertrophiée alors que le niveau basal en Ca^{2+} diastolique est globalement équivalent à celui mesuré chez les Sham.

✓ Dès J3, les PMI présentent des altérations électrophysiologiques ventriculaires

La durée de l'intervalle QT est prolongée dès J3 chez les PMI par rapport aux Sham. Ceci peut être dû à une prolongation de la DPA dans les cardiomyocytes ventriculaires et/ou à un ralentissement dans la propagation de l'influx électrique dans les venticules. L'hypertrophie pourrait jouer un rôle. Dans notre modèle, la durée de l'intervalle QRS étant équivalente chez les PMI par rapport aux Sham, donc à ce stade de la pathologie, la propagation de l'influx électrique au niveau ventriculaire ne semble pas altérée. La prolongation de QTc est donc probablement due à une prolongation de la DPA ventriculaire, observée dans l'hypertrophie compensée.(67,230,231) La prolongation de QTc a été rapportée dans des pahologies cardiaques comme étant associée à des aythmies ventriculaires et un risque élevé de mort subite cardiaque.(232,233) Globalement, ces données suggèrent des modifications très précoces de l'ac-

tivité électrique cellulaire comme cela a été montré chez le rat où un allongement de la DPA et des modifications du courant calcique entrant et des courants potassiques sortants précèdent l'hypertrophie cellulaire dans ce modèle ;(67,234) ce qui est aussi en accord avec les travaux de Muth et ses collaborateurs effectués sur un modèle transgénique d'hypertrophie cardiaque.(234)

✓ Passage de la compensation à la décompensation cardiaque

Nos résultats obtenus pendant les deux études présentées jusque-là valident notre hypothèse que le remodelage cardiaque chez la souris PMI est, comme chez l'Homme et d'autres modèles expérimentaux, progressif, au moins au niveau du CEC cellulaire. Des altérations précoces dues à la perte d'une partie majeure du VG, notamment la diminution de la contractilité cardiaque et la dilatation de la cavité du VG, surviennent très tôt chez les PMI, dès J3. D'une manière intéressante, nous avons noté dès J3 une hypertrophie qui se manifeste au niveau du cœur entier et au niveau des cardiomyocytes survivants du VG. A ce même stade l'intervalle QTc est prolongé, probablement à cause d'une prolongation de la DPA cellulaire. Le tableau 1 récapitule les modifications de différents paramètres cardiaques observés à J7, J14 et J28 chez les PMI par rapport aux Sham. A 7 et 14 jours après la ligature, la contractilité cellulaire est augmentée, en association avec une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques et du contenu en Ca^{2+} du RS. Cependant, à J28, ces augmentations compensatrices disparaissent : ces trois paramètres du CEC sont réduits par rapport aux Sham, on peut alors suggérer que les souris PMI passent à un stade décompensé du CEC à ce stade. Mais les altérations des fonctions de certaines protéines du CEC apparaissent dès J14 comme celle de RyR (par augmentation des *spaks* calciques spontanées) et de SERCA (par augmentation du temps de recapture de Ca^{2+} après le transitoire). Le SDNN est réduit d'une façon équivalente à J14 et J28. Ce qui reflète une activation du SN sympathique identique à ces deux stades. Cependant, les effets de cette activation sympathique ne sont pas équivalents sur l'inotropisme cellulaire à ces deux stades. Ceci peut être dû à la désensibilisation des récepteurs β-adr avec le temps.(235) A noter qu'une réduction du SDNN est généralement associée à un mauvais pronostic.(236)

✓ La dérégulation des protéines du CEC semble corrélée avec l'augmentation du niveau plasmique de BNP et de l'activité du SN sympathique

Comme nous l'avons précédemment montré dans notre première étude,(237) le niveau de BNP circulant augmente progressivement les deux premières semaines suivant la ligature

chez les souris PMI. Il atteint son niveau maximal à 14 jours post-ischémie. C'est le stade auquel nous observons une diminution de la variabilité du rythme sinusal et des altérations de certaines protéines du CEC. De plus, dans notre précédente étude, nous avons montré que l'augmentation du taux de BNP chez les Sham induit une augmentation de l'activité du SN sympathique, ce qui va dans le même sens avec d'autres études récemment publiées qui montrent que le BNP peut augmenter la libération de NE par les synapses sympathiques.(181) Au niveau cellulaire, nous avons montré que le traitement au BNP chez les Sham induit une diminution du contenu du RS, une augmentation du tau de diminution du transitoire calcique, de la fréquence des *sparks* calciques spontanées et du niveau calcique diastolique du cytosol. Ceci peut être dû à la diminution observée de l'expression de la S100A1 et de la pompe SERCA. De plus, Hasenfuss et ses collaborateurs ont déjà établi un lien entre le taux de BNP et la diminution de l'expression de la pompe SERCA.(79) A noter que ces dérégulations du CEC ainsi que le taux élevé de BNP et l'hyperactivation du SN sympathique sont caractéristiques de la phase décompensée de l'IC.

5- Conclusion

Au cours de cette étude qui avait pour objectif de définir notre modèle expérimental (avantages et limites), nous avons suivi les altérations de la fonction cardiaque et des mouvements calciques des cellules du VG dans les stades précoces post-ischémiques sur un modèle de souris PMI. Nous avons montré que **très tôt après l'infarctus, le cœur est hypertrophié, le QT est prolongé et les mouvements calciques sont modifiés dans le sens d'un renforcement de la fonction contractile**. A partir de 14 jours post-ischémiques, les altérations au niveau des mouvements calciques commencent à se manifester par augmentation de la survenue des *sparks* calciques spontanées et par réduction de l'efficacité du recaptage du Ca^{2+} dans le RS. A ce même stade, nous avons précédemment observé une augmentation de la libération de BNP dans le sang et nous observons ici une augmentation de l'activité du SN sympathique chez les souris PMI par rapport aux Sham. Les altérations notées au niveau de la fonction de RyR et de SERCA, ainsi que la réduction du SDNN sont caractéristiques de la phase décompensée du remodelage cardiaque et sont associées à une augmentation de la survenue des arythmies cellulaires et cardiaques. Les altérations observées à 14 jours post-ischémie seraient-elles la conséquence des effets du BNP? Le BNP serait-il responsable de la réduction de la performance cardiaque et de la décompensation du VG dans l'IC? Ceci pourrait-il expliquer l'augmentation de la mortalité observée chez des patients en IC aigue décompensée traités au nésiritide?

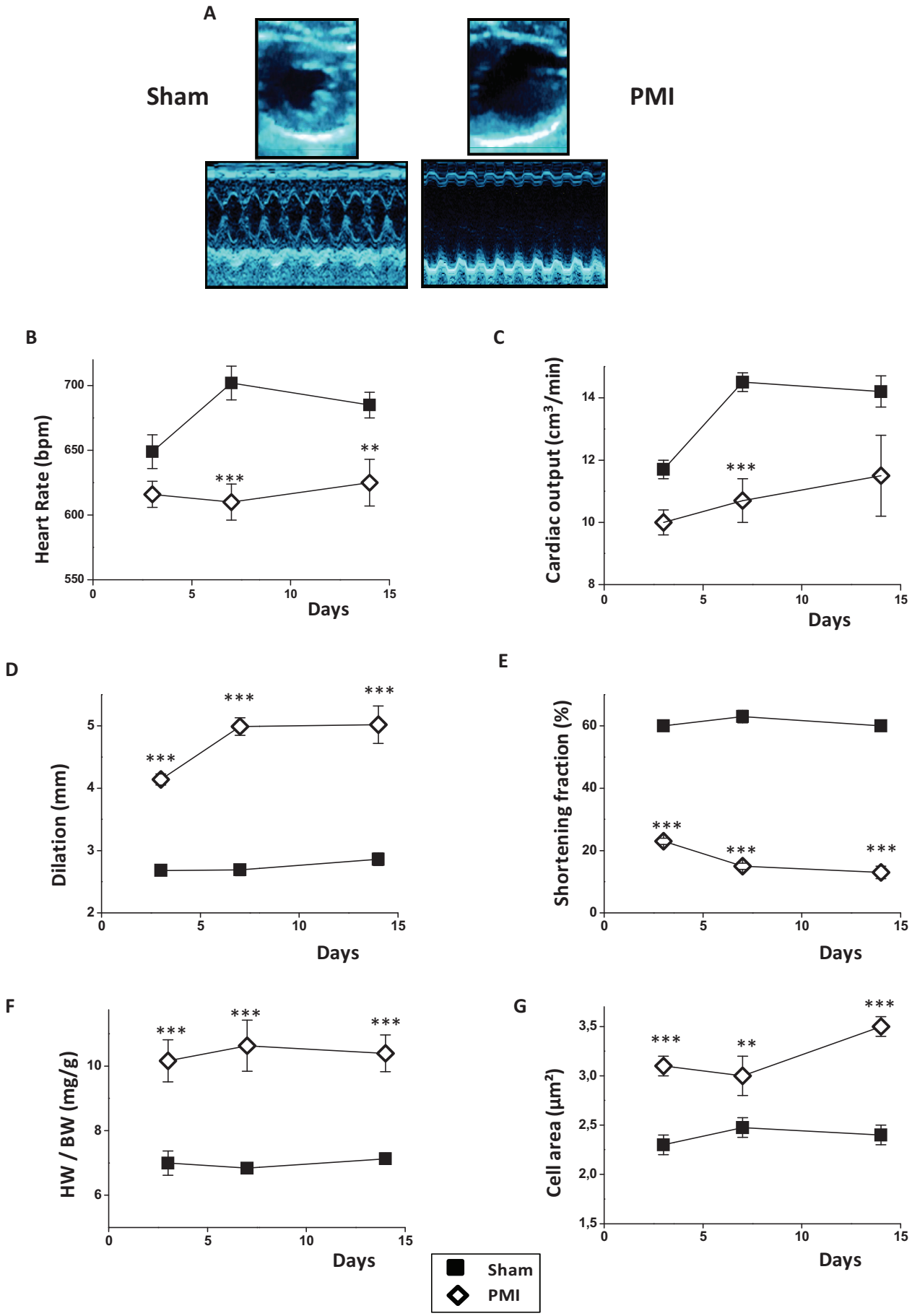


Figure 1 - Time course of cardiac morpho-functional parameters progression in Sham and PMI mice at 3, 7 and 14 days post-surgery: A) a representative echocardiography image of the Sham and PMI LV in a parasternal short axis view and a movement/time section registration during 1s; B-E) echocardiography analysis parameters; F) heart (HW) over body weight (BW) ratio and G) LV cardiomyocyte area measurements. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001in PMI *vs.*Sham

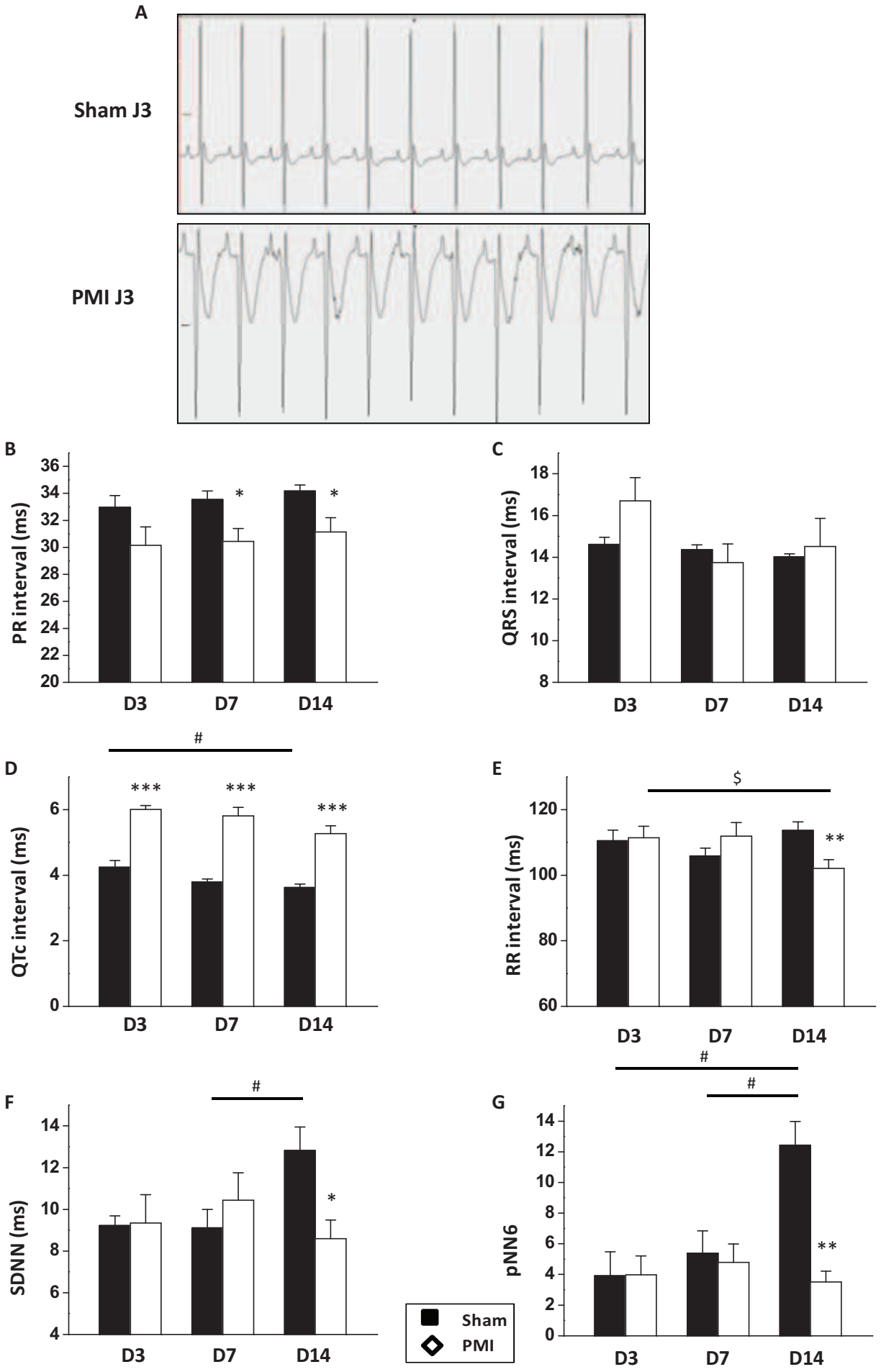


Figure 2 - Time course of *in vivo* cardiac electrical parameters progression in Sham and PMI mice at 3, 7 and 14 days post-surgery: A) representative ECG images of D3 Sham and PMI taken during 1s; B-G) ECG analysis parameters and HRV analysis (SDNN and pNN6). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001in PMI *vs*.Sham; #p<0.05 between D3, D7 and D14 Sham; $p<0.05 between D3, D7 and D14 PMI.

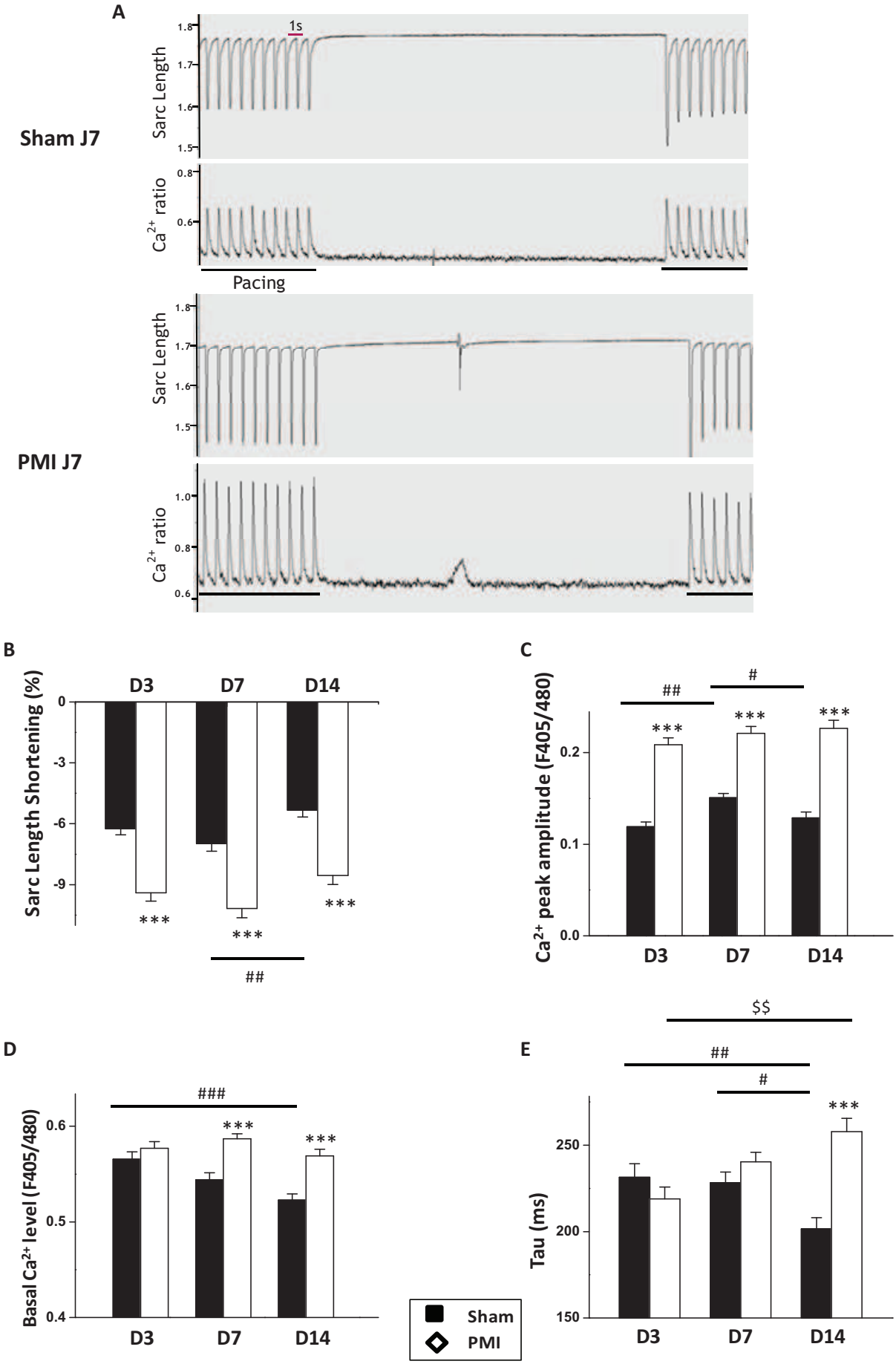


Figure 3 - Time course of CEC functional parameters modifications registered on a photometric system on field stimulated indo-1AM LV loaded cardiomyocytes of Sham and PMI mice at 1 Hz : A) representative measurements of sarcomere (sarc) length and Ca^{2+} ratio taken on paced and quiescent cells; B-E) analytic parameters obtained on 3, 7 and 14 days paced cells. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001in PMI *vs.*Sham; #p<0.05 between D3, D7 and D14 Sham; $p<0.05 between D3, D7 and D14 PMI.

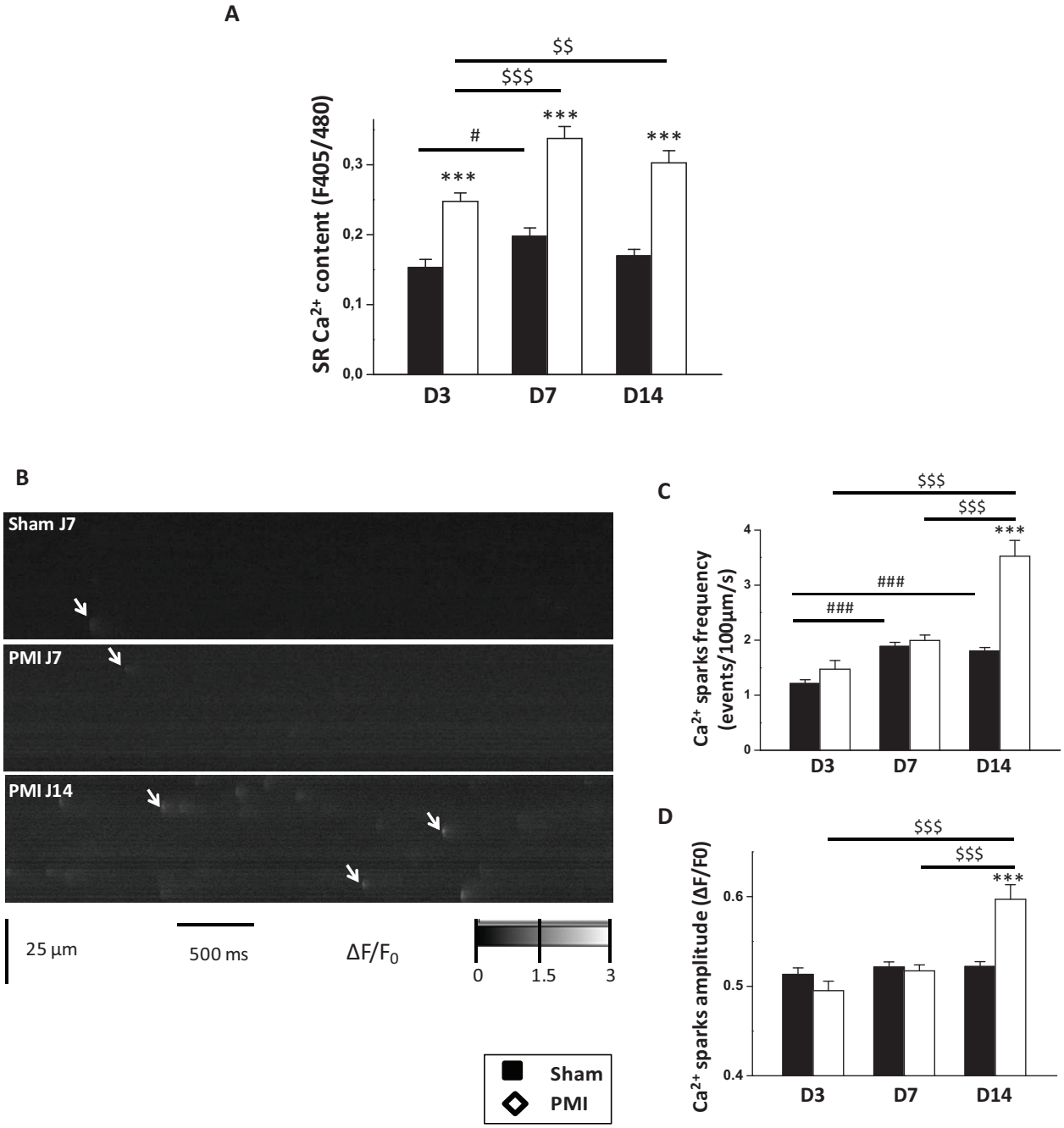


Figure 4 - Time course of RS functional parameters modifications: A) RS Ca^{2+} content obtained on quiescent indo1-AM loaded LV cardiomyocytes after a 10nM caffeine application; B) representative measurements of spontaneous Ca^{2+} sparks taken on quiescent fluo-AM loaded cells; C-D) analytic parameters of Ca^{2+} sparks analyzed on 3, 7 and 14 days paced cells. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001in PMI *vs.*Sham; #p<0.05 between D3, D7 and D14 Sham; $p<0.05 between D3, D7 and D14 PMI.

	J7	J14	J28
Cell hypertrophy	**+22% *****	**+50% *****	**+51% *****
Contraction cell	**+38% *****	**+61% *****	**- 19% ***
Ca^{2+} transients amplitude	**+46% *****	**+76% *****	**-10% ***
Tau	**-1%**	**+27% *****	**+25% ***
Ca^{2+} sparks frequency	**+6%**	**+94% *****	**+42% *****
SR Ca^{2+} content	**+71% *****	**+78% *****	**-22% ***
QTc interval	**+55% *****	**+47% *****	**+62% *****
SDNN	**+14%**	**-32% ***	**-33% ****

Table 1 - Time course of modifications altering different cardiac parameters in PMI relative to Sham at 7, 14 and 28 days post-ligation. * p<0.05, **p<0.1 and *** p<0.001

Partie 3 : Caractérisation des effets chroniques du BNP sur les stades précoces du remodelage cardiaque des souris PMI

Effets chroniques du BNP sur le remodelage cardiaque post-ischémique: mouvements calciques, CEC et arythmies

1- Introduction

Le BNP est une hormone cardiaque à effets contradictoires, qui intrigue les scientifiques et les médecins quant à son mode d'action et son efficacité clinique. D'une part, le BNP a été montré comme diminuant la surcharge cardiaque en réduisant la pression et le volume sanguins;(3,138) cette hormone agit également sur le remodelage cardiaque par ses effets antifibrotiques.(140,141) D'autre part, le taux de BNP circulant augmente dans l'IC en corrélation avec la dysfonction du VG et la défaillance cardiaque et peut prédire un risque élevé de survenue d'arythmies fatales et de mort subite.(5,163) Ce taux est alors utilisé dans la pratique clinique comme un biomarqueur de diagnostic et de pronostic de l'IC. Nous nous sommes alors demandé si cette augmentation de la libération de BNP peut être interprétée comme une simple conséquence ou plutôt un acteur important de la dysfonction cardiaque. De plus, le nésiritide, une forme recombinante du BNP humain administrée à des patients en IC aiguë décompensée, a montré des effets controversés selon les études ; on peut mentionner notamment une augmentation du risque de mortalité dans certaines études.(6–8) Nous avons précédemmant montré que le BNP, administré en chronique pendant deux semaines à des souris contrôles dénuées de pathologie cardiaque, induit une dysfonction du VG, caractérisée par des altérations des mouvements calciques cellulaires et du CEC, et aboutissant à une augmentation de la survenue des arythmies cellulaires et ventriculaires.(237) Dans l'étude présentée ici, nous cherchons à étudier les effets du BNP sur le remodelage cardiaque post-ischémique précoce chez des souris PMI, sachant qu'à ce stade, nous avons déjà mis en évidence une augmentation compensatoire de la performance contractile des cellules basales du VG pendant les deux premières semaines post-ligatures, les altérations des protéines du CEC commençant à se manifester à partir de J14. Pour cela, nous avons administré du BNP à des souris PMI à partir de la ligature et nous avons suivi les effets au cours des deux premières semaines sur l'activité cardiaque, les mouvements calciques, le CEC et les arythmies des cellules du VG. Comme expliqué dans le chapitre précédent, nous n'avons pas intégré les expériences réali-

sées 3 jours après la ligature, en raison d'un effet post-chirurgical confondant évident chez les animaux.

2- Méthodologie

Au cours de cette partie, nous avons travaillé sur 3 groupes expérimentaux : les Sham, les PMI et les PMI-BNP, à différents stades post-chirurgicaux, comme cela est indiqué dans la figure 46 :

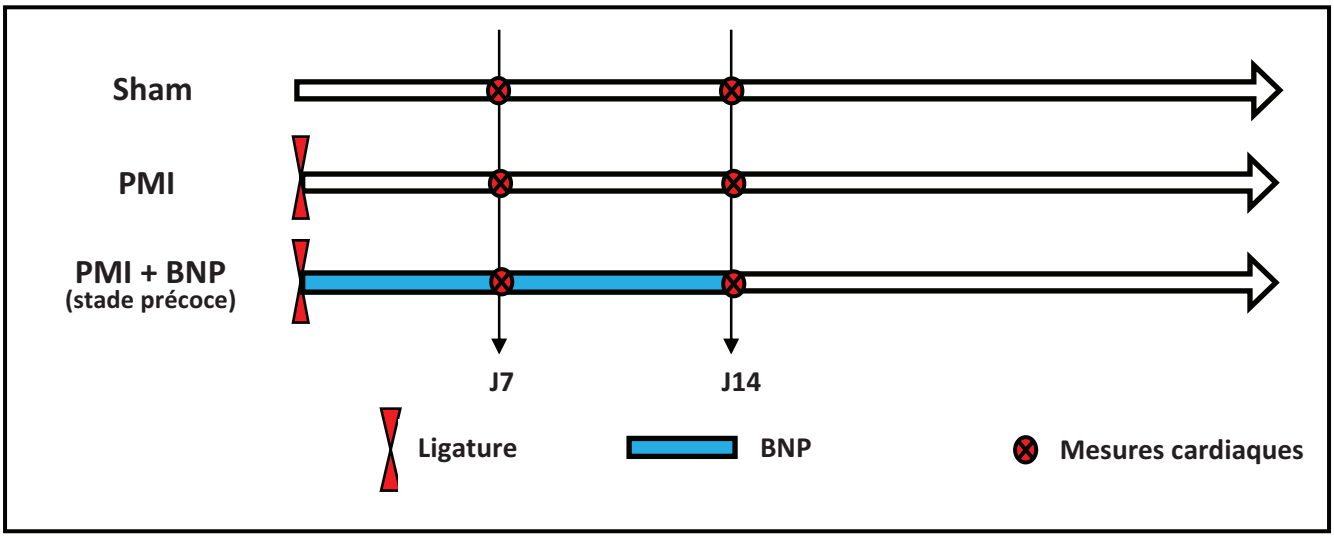


Figure 46 - Protocole expérimental suivi au cours de la troisième partie des résultats

L'administration du BNP est effectuée par pompe osmotique pendant une ou deux semaines, le traitement débutant avec la chirurgie. A J7 et J14, des mesures cellulaires et moléculaires sont effectuées. *In vivo,* l'activité morpho-fonctionnelle du cœur est évaluée par échocardiographie. Au niveau cellulaire, nous avons mesuré par imagerie calcique les mouvements calciques systoliques, ainsi que les *sparks* (reflétant l'activité du canal RyR2) et les vagues calciques spontanées diastoliques. Au niveau moléculaire, nous avons évalué par *Western Blot* l'expression et les modifications post-translationnelles des protéines du CEC.

3- Article

Les résultats de cette partie constituent la majeure partie de mon travail de thèse. Je les présente sous forme d'un article en phase finale de préparation pour la soumission.

Deleterious effects of B-type natriuretic peptide on post-ischemic cardiac remodeling and arrhythmias

Sarah Karam, Pierre Meschin, Patrice Bideaux, Cécile Cassan, Valérie Scheuermann, Olivier Cazorla, Jérôme Thireau and Sylvain Richard

INSERM U1046, *Physiologie & Médecine Expérimentale, Coeur et Muscles*, Université Montpellier-1 & Université Montpellier-2, Montpellier, France.

CHU Arnaud de Villeneuve, 371 avenue doyen G. Giraud, 34295 Montpellier

Corresponding Author: Dr. Sylvain Richard

Phone: (+33)04.67.41.52.40

Fax: (+33)04.67.41.52.42

E-mail: sylvain.richard@inserm.fr

Abstract:

Background: B-type natriuretic peptide (BNP) is a peptide released in excess in the systemic circulation during heart failure (HF) to reduce blood volume and pressure. A recombinant form of human BNP, nesiritide, is used for patients with acute decompensated HF but deleterious cardiac effects have been reported. We aimed to investigate the effects of BNP supplementation given immediately after myocardial infarction (MI) in a model of HF. **Methods and results:** Seven week old c57bl/6 male mice were randomly assigned to the following: i) Sham, ii) MI induced by coronary artery ligation (PMI) and iii) PMI treated chronically with BNP (0.03µg/kg/min; PMI-BNP) for 7 (D7) and 14 (D14) days. Echocardiography showed that MI severely altered heart morphology and function similarly in all experimental group (*vs.* sham) with no benefit. Sarcomere length and Ca^{2+} handling were measured on single left ventricular (LV) myocytes in response to field stimulation (1 Hz). Cell fractional shortening and Ca^{2+} transients amplitude were increased concomitantly at D7 and D14 in PMI, but this response was attenuated in PMI-BNP. In line, caffeine (10 mM) applied on quiescent myocytes showed that the SR Ca^{2+} content was increased at D7 and D14 in PMI, with an attenuation in PMI-BNP where a dramatic increase in Ca^{2+} sparks occurred as early as D7 (no change in PMI). The eNOS expression, RyR2 S-nitrosylation, and FKBP12.6/RyR2 dissociation were altered in same direction both in PMI and PMI-BNP animals at D14 but BNP accelerated these changes seen at D7. Other Ca^{2+} handling proteins were also impacted with decreased SERCA2a expression and increased NCX1 expression. As a result ectopic Ca^{2+} waves were more frequent in PMI than in Shams at D14, with a dramatic enhancement of their occurrence at D7 in PMI-BNP mice showing that BNP accelerated cell propensity to trigger arrhythmias. **Conclusion:** BNP infusion accelerated early remodeling after MI, which resulted in attenuated compensatory "inotropism" intrinsic to the LV cardiomyocytes. Increased RyR2 mediated SR-Ca^{2+} leak, induced by enhanced eNOS

expression and RyR2 S-nitrosylation, was involved and, together with negative changes in other major Ca^{2+} handling proteins, promoted arrhythmias.

Keywords: b-type natriuretic peptide, myocardial infarction, ischemic heart failure, Ca^{2+} handling, excitation-contraction coupling, remodeling.

Introduction:

Coronary diseases remain the most common cause leading to ischemic heart failure (HF), a syndrome with a high prevalence and a high risk of morbidity and mortality that increases with aging.[1,2] After myocardial infarction (MI), several hormonal mechanisms are enhanced to compensate the loss of cardiac function resulting from cardiomyocytes death. The main compensatory system results from direct activation of adrenergic pathway through the sympathetic nervous system.[3] Recently, it was suggested that b-type natriuretic peptide (BNP), a neurohormone released in excess by suffering cardiomyocytes, can also initiate adrenergic response during decompensated HF.[4–7] Such adrenergic overdrive in the first days after installation of infarction zone is mainly responsible for fatal arrhythmic storm.[8] In addition, the sustained activation of the compensatory mechanisms can induce cardiac remodeling, leading to secondary heart damages overtime, that could markedly increase morbidity and mortality.[9] Clinically, patients thus undergo a transition from asymptomatic (or compensated) to symptomatic HF.[10–12] Besides progressive deterioration of cardiac output (CO), sustained cardiac sympathetic activation is associated with the genesis of ventricular arrhythmias (VAs) which correlates with fibrosis, prolongation of action potential duration and altered intracellular Ca^{2+} handling.[13–18] The American Heart Association recently stressed the importance of developing animal models to address the unmet need of early compensated phase HF models to understand the underlying cellular biology on one hand, and to establish novel treatments to prevent HF progression on the other hand.[19]

BNP is released within a few hours after cardiac injury, as an emergency hormone,[20] and is used by clinicians as an indicator of LV dysfunction during cardiac remodeling.[21] The main purpose of BNP is to reduce blood volume and pressure by inducing vasodilation, enhancing natriuresis/diuresis an inhibiting the rennin-angiotensin-aldosterone system.[22,23] A recombinant form of human BNP, nesiritide, was approved in 2001 in North America for

patients with acute decompensated HF (ADHF) in emergency for its vasoactive properties.[20,21] Although the Acute Study of Clinical Effectiveness of Nesiritide in Decompensated Heart Failure (ASCEND-HF) reported no worsening effects on survival and cardiac function of treated patients,[24,25] many other meta-analysis have shown that nesiritide increases the 30-day mortality risk of patients with ADHF.[26–28] In addition, lowered plasma BNP level in response to treatments has been shown to be associated with improved survival in patients with acute decompensated HF or chronic HF.[29,30] Recently, using an experimental mouse model, we showed that long term administration of BNP promotes VAs *in vivo*, in a mechanism that implicates cellular Ca^{2+} handling alterations and modifications in several excitation-contraction (E-C) coupling proteins. Chronic BNP administration thus promotes a cellular HF-like phenotype, which was partially prevented by the β-adrenergic receptor blocker metoprolol.[4]

However, several works showed that early rising of circulating BNP in rats improves cardiac function following acute infarction,[31,32] and appeared cardioprotective during ischemia/reperfusion.[33,34] Thus, the effects of BNP are not clear and seem to depend on the state of the pathology and of the therapeutic window used.

We wondered whether chronic administration of BNP levels in early stages of cardiac ischemia could contribute to adverse cardiovascular events including LV remodeling, the E-C coupling alterations and VAs. The aim of our present work was therefore to investigate effects of early administration of BNP following MI (post-MI: PMI) on an experimental mouse model. We focused on the contraction, the Ca^{2+} handling and arrhythmias of LV myocytes. Our principal results showed that chronic BNP enhanced the E-C coupling alterations of cardiomyocytes, with major alterations of Ca^{2+} handling leading to increased risk of VAs.

Methods:

Animals:

All experimental protocols conformed to European Parliament Directive 2010/63/EU and the 22 September 2010 Council on the protection of animals. They were approved by the local institutional animal research committee (Languedoc Roussillon, No. CE-LR-0714).

Male seven week old c57bl/6 mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were randomly subjected to the following surgical procedures: i) Sham, ii) myocardial infarction (PMI) and iii) PMI treated chronically with BNP for 7 and 14 days (PMI-BNP). As previously described, PMI was induced by left coronary artery ligation.[35] The artery was ligated 1-2 mm beyond the point of emergence from the top of the left atrium, using an 8-0 Sofsilk suture (Syneture, USA). Sham-operated animals were subjected to the same surgical procedure without performing ligation. Chronic BNP treatment (1-45, mouse, ref. 14-5-30, American Peptide Company, Sunnyvale, CA, USA) was administered with micro-osmotic pumps (Alzet, ref. 1002, Charles River, France) implanted the day before PMI surgery and released at a constant rate of 0.03 µg/kg/min, for 7 or 14 days.

In vivo analysis:

Morphological and functional cardiac evaluation was assessed at 7 and 14 days after surgery on non-anesthetized mice by echocardiography (Vivid7Pro, GE Medical System, USA) equipped with an i13L 14MHz linear array transducer designed for small rodents examination. LV end diastolic (LVEDd) and systolic (LVESd) diameters were measured in a parasternal short axis view at the papillary muscles level. LVEDd was used as an indicator of LV cavity dilation. Shortening fraction (SF) was calculated by the formula: SF = (LVEDd-

LVESd)/LVEDd*100. Cardiac output (CO) was calculated via the following formula: CO = $\pi.d^2$.VTI.HR/4, d: aorta diameter measured in a parasternal long axis view, VTI: time-velocity integral and HR: heart rate. Only mice with a large infarct size and a SF≤25% and LVEDd ≥3.5mm 7 days after ligation were used in the study.

Cell contractility and Ca^{2+} imaging:

LV myocytes were enzymatically dissociated as previously described.[36] Real time Ca^{2+} imaging was performed on freshly isolated cells incubated in a physiological solution (117 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 4.4 mM $NaHCO_3$, 1.5 mM KH_2PO_4, 1.7 mM $MgCl_2$, 21 mM HEPES, 1.8 mM $CaCl_2$ and 11 mM glucose).

Cell shortening and Ca^{2+} transients were measured on freshly isolated cells loaded with ratiometric indo-1 AM (2 µM, Invitrogen Inc., France), using field stimulation (1 Hz) under basal conditions. Sarcomere length (SL) and fluorescences emitted at 405 and 480 nm were simultaneously recorded, using an IonOptix system (Hilton, USA and Zeiss 40x oil, 0.36 µm/pixel).[37] Contraction and relaxation velocities were calculated by the first derivative of cell shortening and returning to basal level, respectively (Δ SL / Δ time). SR Ca^{2+} content was evaluated by measuring the peak amplitude of the cytosolic Ca^{2+} transient induced by the rapid perfusion of caffeine (10 mM) on resting cells.[4] In addition, using the same system, the number of spontaneous Ca^{2+} waves triggered in quiescent LV cardiomyocytes was counted after isoproterenol application (10 nM). Cell area was estimated by multiplying the length and width of the cells visualized on the system. Data were analyzed using Ionwizard Software.

Spontaneous SR Ca^{2+}-release events (Ca^{2+} sparks) were measured on quiescent cells loaded with the Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM (4 µM, Molecular Probes, Paris, France). Recordings were performed using a confocal microscope in the line-scan mode (1.5 ms/line, 512 pixels × 3000

lines, LSM510 Zeiss confocal microscope 63x oil, N.A.: 1.2). Ca^{2+} sparks frequency and amplitude were analyzed on 10 line-scan/cell using ImageJ and Sparkmaster.[36]

Protein analysis:

Proteins were extracted from LV frozen tissue (50 mg) homogenized with a manual polytron® instrument. The tissues were then lysed in 600 µL extraction buffer (20 mM HEPES, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 0.3% CHAPS, 1X SigmaFAST) for 45 min under rotated agitation. Membrane and cytosolic proteins were collected from the supernatant after 5 min centrifugation at 10000g.

For the ryanodine receptor (RyR2) immunoprecipitation protocol, LV tissues were lysed in 1 ml of a buffer containing Tris maleate 10 mM (pH6.8), NaF 35 mM, triton 1% and protease inhibitors (Roche 11873580001). An anti-RyR antibody was used to immunoprecipitate RyR2 from 500 µg of LV homogenate. The samples were incubated with anti-RyR antibody in 0.5 ml of a modified RIPA buffer (Tris HCl 10 mM (pH7.4), NaCl 150 mM, Triton 1%, NaF 5 mM and protease inhibitor cocktail) for 2 hours at 4°C. The immune complexes were incubated with protein A/G magnetic beads (Pierce 88802) at 4°C for 2 hours, after which the beads were washed three times with RIPA buffer. The RyR2 immunoprecipitation protocol was used to evaluate the association of the channel with FKBP12.6 (or calstabin2) and the S-nitrosylation (SNO) of the channel.

Proteins were separated using SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes (0.2 µm, GE Healthcare, France) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase SERCA2a (1/5000 dilution, A010-20, Badrilla, UK), the Na^{+}-Ca^{2+} exchanger NCX1 (1/1000 dilution, R3F1, Swant, Switzerland), the RyR2 (1/1000, Pierce France), its phosphorylated forms, PhosphoSer2808-RyR2 (1/1000, Pierce France), PhosphoSer2814-RyR2 (1/500, Pierce France), phospholamban PLB (1/20000

dilution, A010-14) and phosphorylated PLB at Ser16 (1/5000 dilution, Badrilla, A010-12) and Thr 17 (1/5000 dilution, Badrilla, A010-13), SNO (1/1000 dilution, ABCAM, 58591), nNOS (1/1000, BD transduction lab., 610309), eNOS (1/60000 dilution, BD transduction lab., 610029). Protein levels were expressed relative to GAPDH (1/60000 dilution, AB8245, ABCAM, France). All immunoblots were developed and quantified using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosystems) using infrared-labeled anti-mouse and anti-rabbit IgG (1/30000 dilution) secondary antibodies.

Statistical analysis:

All statistics in the text and figures are presented as frequency or mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Origin Software. One-way ANOVA for multiple comparisons was used, followed by a parametric t-test with Bonferroni's correction for all parameters. A P-value of 0.05 or less indicated a statistically significant difference.

Results:

BNP administration does not alter in vivo morpho-functional parameters in PMI mice

Echocardiography showed that MI after coronary artery ligation severely altered heart morphology and function similarly in the PMI and PMI-BNP groups at both D7 and D14. Mice from the two groups were indistinguishable regarding the studied parameters at D7 and D14. Rapidly after coronary artery ligation, a significant LV cavity dilation progressed at D7 and was associated to a decrease in LV contractility as attested by reduced shortening fraction (SF), ejection fraction (EF) and cardiac output (CO) (Table 1). Cardiac hypertrophy, determined by the heart weight over body weight ratio (HW / BW), was already observed in

PMI mice at D7 (+55% when compared to Shams). This hypertrophy was confirmed at the cellular level by a significant LV cardiomyocytes area expansion in PMI *vs*. Sham. BNP early supplementation in PMI-BNP mice did not further worsen nor better improve contractility, dilation and hypertrophy (Table 1).

Chronic BNP supplementation modified E-C coupling after MI

Sarcomere length and Ca^{2+} handling were measured on freshly isolated LV myocytes in response to field stimulation (1 Hz). In comparison to Sham, cell fractional shortening (reflecting contraction) was increased in PMI by 47% and 60% at respectively D7 and D14 (Fig. 1A,B). This increase was accompanied with a reduction in diastolic sarcomere length (Fig. 1C) and an increase in the maximal velocity of cell contraction and relaxation (Fig. 1D,E). In association with increased contractility, cardiomyocytes from PMI animals also exhibited a significant increase in Ca^{2+} transients amplitude (by 46% and 75% at 7 and 14 days respectively in PMI compared to Sham) (Fig. 1F,G). The decay constant of Ca^{2+} transient decrease (Tau), an indicator of Ca^{2+} re-uptake velocity from the cytosol principally into the SR was unchanged in PMI (*vs*. Sham) at D7 but was increased at D14 (Fig. 1I), which suggested that SR Ca^{2+} re-uptake proteins function was maintained intact at 7 days post-ligature, despite an increase in diastolic basal Ca^{2+} level observed at 7 and 14 days (Fig. 1H). Altogether these effects showed early remodeling of the E-C coupling at the cellular level in response to MI.

Cell fractional shortening was less increased in LV myocytes of the PMI-BNP group of mice (at D7: 9.0 ±0.4 *vs.* 10.2 ±0.4 µm; at D14: 7.5 ±0.3 *vs.* 8.54 ±0.5 µm in PMI-BNP and PMI respectively; $p<0.05$) and both contraction and relaxation velocities were also less increased when compared to PMI at D7 and D14 (Fig. 1A-E). In parallel, BNP induced similar effect on the Ca^{2+} transient amplitude which was less augmented than in non-treated animals (PMI

group) at D7 (0.202 ±0.007 *vs.* 0.221 ±0.008 in PMI-BNP and PMI respectively, $p<0.05$) and D14 (0.167 ±0.007 *vs.* 0.227 ±0.009 in PMI-BNP and PMI respectively; $p<0.001$) (Fig. 1F,G). These effects on the Ca^{2+} transient amplitude were accompanied by a precocious increase in the decay constant at D7 (Tau: 282 ±9 *vs.* 240 ±5 ms in PMI-BNP and PMI respectively, $p<0.001$) which was not seen at D14 (Fig. 1I). Altogether, our data suggested that BNP supplementation attenuated the early compensatory remodeling of cell Ca^{2+} transient and related contraction presumably by hampering SR Ca^{2+} release as well as Ca^{2+} re-uptake in the SR compartment.

BNP supplementation decreased SR Ca^{2+} and promoted leaky RyR2 at D7

Ca^{2+} transient amplitude depends, at least in part, on the SR Ca^{2+} content.[38,39] We estimated the SR Ca^{2+} content by triggering massive RyR2 channels opening by applying caffeine on quiescent cardiomyocytes and measuring the Ca^{2+} released into the cytosol. The SR Ca^{2+} content was increased by 70% and 78% at D7 and D14 days in PMI animals when compared to Sham (Fig. 2A). As expected, chronic BNP supplementation attenuated this increase by 10% and 37% at D7 and D14, respectively in the PMI-BNP group (Fig. 2A).

We also measured spontaneous Ca^{2+} release from the SR to the cytosol (Ca^{2+} sparks), resulting from leaky RyR2 in resting cells, by confocal microscopy. At D7, the Ca^{2+} sparks frequency was similar in PMI and in Sham (2.0 ±0.1 and 1.9 ±0.1 sparks/100µm/s, respectively) but it increased substantially (nearly 2 fold) at D14 (3.5 ±0.3 *vs*. 1.8 ±0.1 sparks/100µm/s in PMI and Sham respectively, $p<0.001$)(Fig. 2B). Strikingly, chronic BNP supplementation increased Ca^{2+} sparks frequency at D7 (3.3 ±0.3 sparks/100µm/s, $p<0.001$ *vs.* Sham), which increased further at D14 (3.9 ±0.5 sparks/100µm/s). Therefore, we concluded that BNP accelerates the appearance of RyR2 leakage which was consistent with

the decrease in the SR Ca^{2+} content and was expected to generate deleterious effects on Ca^{2+} handling with more susceptibility to trigger pro-arrhythmogenic Ca^{2+} waves.[40]

BNP supplementation induced post-translational modifications of RyR2

RyR2 has two different phosphorylation sites: Ser2808 and Ser2814, activated by PKA and CamKII kinases respectively.[41,42] We found that, at D7, RyR2 phosphorylation was similar at Ser2808 in all groups of animals whereas it was increased at the Ser2814 site for both PMI and PMI-BNP (1.4 ±0.1 and 1.4 ±0.4 and in PMI and PMI-BNP, respectively, *vs.* 1.0 ±0.1 in Sham, $p<0.05$).

We also measured RyR2 S-nitrosylation levels. We found an increase of RyR2 S-nitrosylation in PMI at D14 (2.39 ±0.10 *vs.*1.03 ±0.04 in PMI and Sham, respectively, $p<0.001$). No effect was seen at D7 in PMI but it was striking that BNP supplementation induced a major increase which remained at D14 (1.78 ±0.07 *vs.* 2.36 ±0.06 in PMI-BNP at D7 and D14, respectively) (Fig. 3A).

The FK506 binding protein (FKBP12.6) stabilizes the RyR2, preventing aberrant spontaneous activation of the channel during the resting phase of the cardiac cycle.[43] We measured the RyR2/FKBP12.6 association and found a drastic decrease at D14 in the PMI group (0.19 ±0.01 *vs.* 1.06 ±0.02 in PMI and Sham, respectively, $p<0.001$) but not at D7. Chronic BNP supplementation accelerated the FKBP12.6 dissociation since a substantial decrease could be measured at D7 (Fig. 3B).

To better understand the origin of the increase in RyR2 S-nitrosylation, we measured endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) NO synthases expressions. Both of these NOS are constitutively expressed in cardiac myocytes, synthesize NO in a Ca^{2+} dependant manner and

are implicated in proteins S-nitrosylation in cardiac hypertrophy and HF.[44–46] There was no modification in PMI in comparison to Sham at D7. However, eNOS, but not nNOS, expression was increased at D14 (1.7 ±0.2 *vs.* 1.0 ±0.1 in PMI and PMI-BNP respectively, $p<0.01$) (Fig. 3C,D). Chronic BNP supplementation decreased nNOS expression at D7 when compared to PMI, but at D14, nNOS expression was similar in PMI-BNP and PMI groups. Interestingly, BNP induced an increase in eNOS expression at D7 (1.5 ±0.1 *vs.* 1.1 ±0.04 in PMI-BNP and PMI respectively, $p<0.01$), which remained at D14 (Fig. 4C).

Altogether, our results showed that RyR2 S-nitrosylation, FKBP12.6/RyR2 dissociation and eNOS expression were altered both in PMI and PMI-BNP animals at D14 but chronic BNP treatment accelerated these changes seen as early as D7.

BNP altered SERCA2a and NCX1 expression

To better understand the modifications observed in the time decay constant (Tau) of the Ca^{2+} transient in PMI and PMI-BNP cells, we measured the expression of the major proteins implicated in the removal of Ca^{2+} from the cytosol during diastole: the SERCA2a pump and the NCX1 exchanger. The expression of SERCA2a was diminished both in PMI and PMI-BNP at D7 and but increased at D14 in PMI when compared to Sham (Fig. 4A). The expression of NCX1 was unchanged at D7 and increased at D14 in PMI (1.04 ±0.11 and 1.66 ±0.17 in PMI at D7 and D14, respectively, normalized to Sham expression) (Fig. 4B). BNP supplementation increased NCX1 expression at D7 (1.94 ±0.34, $p<0.05$ in comparison to Sham). Taken together, these results showed that, in addition to the promotion of Ca^{2+} sparks due to RYR2 post-translational alterations; chronic BNP treatment also modified other major Ca^{2+} handling proteins such as SERCA2a and NCX1. We anticipated that these changes may be pro-arrhythmogenic.

Chronic BNP supplementation promoted Ca^{2+} waves and cellular arrhythmias enhancement

We next examined whether the alterations of the Ca^{2+} proteins and Ca^{2+} handling induced by chronic BNP infusion were associated with occurrence of ectopic Ca^{2+} waves known to induce a transient inward depolarizing current (I_{ti}) mediated by NCX activation and ectopic cell contractions during diastole.[47,48] We measured the occurrence of Ca^{2+} waves and ectopic contractions in quiescent cells challenged with 10 nM isoproterenol. The results showed that spontaneous ectopic Ca^{2+} waves and arrhythmias were more frequent in PMI animals than in Sham at D14, whereas no effect was seen at D7. In contrast, there was a dramatic enhancement of the ectopic Ca^{2+} waves at D7 in the PMI-BNP animals (Fig. 5). Therefore, we concluded that chronic BNP treatment accelerated cell propensity to trigger pro-arrhythmogenic Ca^{2+} waves.

Discussion:

We have previously shown that chronic BNP supplementation to healthy mice induces intracellular Ca^{2+} handling alterations and Ca^{2+} waves responsible for ectopic contractions in LV cardiomyocytes and VAs *in vivo*.[4] In the present study, we show that BNP supplementation accelerates early ischemic cardiac remodeling following MI in mice, at least at the cellular level. In fact, early after MI, at 7 days, Ca^{2+} handling mechanisms were enhanced to increase the contraction performance of basal LV cells in order to rescue the failing heart. Chronic BNP supplementation impacted Ca^{2+} handling compensatory mechanisms, particularly by increasing dramatically the occurrence of Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves at 7 days post-infarction. These alterations were seen only at day 14 in untreated PMI animals. This highly deleterious effect was related to increased RyR2 mediated SR Ca^{2+} leak,

resulting from enhanced eNOS expression as a source for RyR2 S-nitrosylation. BNP exposure also increased NCX1 expression which was likely to favor cellular ectopic depolarization and triggered VAs.

Early remodeling after MI promotes compensatory mechanisms via Ca^{2+} handling

It has been amply demonstrated that, at late stages post-MI, LV cardiomyocytes of failing hearts exhibit major alterations of Ca^{2+} handling leading to a reduction of Ca^{2+} transients and cell contraction amplitudes.[38,49] Modifications of Ca^{2+} handling proteins include a decrease of the L-type Ca^{2+} channel current and a slowing of its inactivation, a decrease of the SR Ca^{2+} content and Ca^{2+} signaling refractoriness shortening.[18,35,50,51] Spontaneous Ca^{2+} waves are associated to Ca^{2+} leakage through RyR2, and triggered arrhythmias.[36,52]

In our current study, we show precocious modifications occurring rapidly after the infarction. These changes are consistent with compensatory mechanisms of Ca^{2+} handling both at day 7 and day 14, although clear deleterious changes appeared at this latter stage. Hypertrophy and dilation were detected as early as at 3 days post-MI (data not shown), with a concomitant increase in LV cardiomyocytes size. However, we excluded this stage from the present study to minimize post-surgical stress and anesthetic effects.[53–55] At 7 days, cardiac hypertrophy was associated with major changes at the cardiomyocytes level including increased SR Ca^{2+} load, increased Ca^{2+} transients amplitude and, as a result, increased cell contraction, in line with different studies in animal and in human.[11,12,56]

Several mechanisms intrinsic to the myocytes contribute to precocious increase of the Ca^{2+} transients and cellular contraction thereby providing cellular compensatory mechanisms to maintain global myocardial contraction. Increased L-type Ca^{2+} channel activity, together with

early electrophysiological remodeling promoting Ca^{2+} influx prolongation during lengthened AP and increased SR Ca^{2+} content may supply the additional Ca^{2+} required to increase cardiomyocytes contraction and, thereby, systolic function.[14,18,57] These cellular signs of compensation were still observed at day 14, although additional modifications appeared such as SR Ca^{2+} leak through RyR2, reduced SR Ca^{2+} re-uptake defects and augmented expression of NCX1. These combined alterations promoted pro-arrhythmogenicity through the abnormal occurrence of spontaneous Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves leading to subsequent activation of the NCX mediated depolarizing current, I_{ti}, responsible for triggered diastolic arrhythmias.[50]

Chronic BNP supplementation accelerates cardiomyocytes remodeling toward HF phenotype

A major result in our study was that chronic BNP supplementation in PMI animals worsened the progression of the cardiomyocytes toward the HF phenotype. Dramatic signs of more severe alteration were evidenced including weaker contraction and smaller Ca^{2+} transient amplitude with slower decay kinetics, reduced SR content and dramatic increase in Ca^{2+} sparks occurrence due to compromised closure of RyR2 during diastole in BNP-treated animals. The general picture was relatively similar for most parameters examined to that seen LV myocytes cells 14 days after MI. RyR2 leakage, one of the most striking effect induced by BNP at day 7, resulted from both increased frequency of occurrence and event amplitude (more likely to generate Ca^{2+} waves) consistently with increased SR Ca^{2+} content, and was associated to a partial depletion of FKBP12.6, induced by RyR2 nitrosylation and augmented eNOS, which has been associated to fatal cardiac arrhythmias.[58,59]

Endothelial NOS production can be increased in cardiac endothelial cells and / or in cardiomyocytes. The cardiac PI(3)K–Akt–eNOS axis serves as a physiological sensor of cardiac stretch, a role subserved by the localization of eNOS in plasmalemmal caveolae close

to the SR–T-tubule junction.[60] More specifically, eNOS was shown to co-localize with RyR2 channels.[36] The exact role of the NO pathway in the regulation of cardiac E-C coupling remains controversial.[61] NO production by eNOS exerts its action independently of cGMP, most probably through S-nitrosylation of the RyR2 or one of its regulatory components. Stretch-dependent eNOS increase could be supported by the effect of BNP on β-AR signaling and the resulting cardiac stress enhancement. This is supported by recent studies where BNP was suggested to promote norepinephrine release from cardiac sympathetic nerves.[4–6] Natriuretic peptides, notably C-type (CNP) and high concentrations of BNP, could also increase β-AR signaling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition via the B-type natriuretic peptides receptors (NPR-B) activation,[7] an effect that may be exacerbated by the enhancement of NPR-B activity in HF where NPR-B accounts for the majority of the natriuretic peptide-dependent activity.[62,63] This hypothesis is also supported by our previous work where the use of β-AR blockers in Sham-operated mice prevented deleterious effects on Ca^{2+} signaling and VAs occurrence following chronic BNP exposure.[4]

Clinical implications

Early subcutaneous application of BNP during acute decompensated HF accelerates the progression of cardiomyocytes from a compensated phenotype to a failing phenotype, which impacts cell contraction and favours a proarrhythmogenicity related to Ca^{2+}-dependent VAs. Rapid lowering of blood BNP in HF patients may therefore be achieved to slow the progression of the disease and improve survival.[29,30] Our results may also help explaining some of the controversial effects of nesiritide on morbidity and mortality.[24,26,28,64] While BNP has beneficial effects on the hemodynamic circulation through a reduction in blood volume and pressure and decreasing cardiac fibrosis, chronic high BNP levels induce Ca^{2+} signaling

alterations mainly by an increase in RyR leakiness, enhancing arrhythmias and reducing contractility, and accelerating the transition to a failing heart.

References:

1. Mosterd, A. & Hoes, A. W. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* **93,** 1137–1146 (2007).
2. Redfield MM, J. S. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: Appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* **289,** 194–202 (2003).
3. Sutton, M. G. & Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* **101,** 2981–2988 (2000).
4. Thireau, J. *et al.* Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. *Cardiovasc. Res.* **95,** 59–68 (2012).
5. Chan, N. Y.-K., Seyedi, N., Takano, K. & Levi, R. An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition. *Circulation* **125,** 298–307 (2012).
6. Chan, N. Y.-K., Robador, P. A. & Levi, R. Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H3 and H4 receptor activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343,** 568–577 (2012).
7. Qvigstad, E. *et al.* Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. *Cardiovasc. Res.* **85,** 763–772 (2010).
8. Lombardi, F., Verrier, R. L. & Lown, B. Relationship between sympathetic neural activity, coronary dynamics, and vulnerability to ventricular fibrillation during myocardial ischemia and reperfusion. *Am. Heart J.* **105,** 958–965 (1983).
9. Lymperopoulos, A., Rengo, G. & Koch, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ. Res.* **113,** 739–753 (2013).
10. Sigurdsson, A. & Swedberg, K. The role of neurohormonal activation in chronic heart failure and postmyocardial infarction. *Am. Heart J.* **132,** 229–234 (1996).
11. McKee, P. A., Castelli, W. P., McNamara, P. M. & Kannel, W. B. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N. Engl. J. Med.* **285,** 1441–1446 (1971).
12. Latronico, M. V. G., Elia, L., Condorelli, G. & Catalucci, D. Heart failure: targeting transcriptional and post-transcriptional control mechanisms of hypertrophy for treatment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40,** 1643–1648 (2008).
13. Meredith, I. T., Broughton, A., Jennings, G. L. & Esler, M. D. Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. *N. Engl. J. Med.* **325,** 618–624 (1991).
14. Richard, S., Leclercq, F., Lemaire, S., Piot, C. & Nargeot, J. Ca2+ currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **37,** 300–311 (1998).
15. Crossman, D. J., Ruygrok, P. N., Ruygrok, P. R., Soeller, C. & Cannell, M. B. Changes in the organization of excitation-contraction coupling structures in failing human heart. *PloS One* **6,** e17901 (2011).
16. Michael, G., Xiao, L., Qi, X.-Y., Dobrev, D. & Nattel, S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc. Res.* **81,** 491–499 (2009).
17. Bailly, P., Bénitah, J. P., Mouchonière, M., Vassort, G. & Lorente, P. Regional alteration of the transient outward current in human left ventricular septum during compensated hypertrophy. *Circulation* **96,** 1266–1274 (1997).

18. Perrier, E. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* **110,** 776–783 (2004).
19. Houser, S. R. *et al.* Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ. Res.* **111,** 131–150 (2012).
20. Colucci, W. S. *et al.* Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N. Engl. J. Med.* **343,** 246–253 (2000).
21. Aronson, D. & Burger, A. J. Effect of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) and dobutamine on heart rate variability in decompensated heart failure. *Am. Heart J.* **148,** e16 (2004).
22. Matsukawa, N. *et al.* The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 7403–7408 (1999).
23. Nishikimi, T., Kuwahara, K. & Nakao, K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J. Cardiol.* **57,** 131–140 (2011).
24. O'Connor, C. M. *et al.* Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *N. Engl. J. Med.* **365,** 32–43 (2011).
25. Reed, S. D. *et al.* Medical resource use, costs, and quality of life in patients with acute decompensated heart failure: findings from ASCEND-HF. *J. Card. Fail.* **19,** 611–620 (2013).
26. Sackner-Bernstein, J. D., Kowalski, M., Fox, M. & Aaronson, K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **293,** 1900–1905 (2005).
27. Sackner-Bernstein, J. D., Skopicki, H. A. & Aaronson, K. D. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* **111,** 1487–1491 (2005).
28. Topol, E. J. Nesiritide - not verified. *N. Engl. J. Med.* **353,** 113–116 (2005).
29. Cohen-Solal, A. *et al.* Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53,** 2343–2348 (2009).
30. Fujimura, M. *et al.* Decrease in plasma brain natriuretic peptide level in the early phase after the start of carvedilol therapy is a novel predictor of long-term outcome in patients with chronic heart failure. *Acta Cardiol.* **64,** 589–595 (2009).
31. Pan, Y. *et al.* Therapeutic effects of continuous infusion of brain natriuretic peptides on postmyocardial infarction ventricular remodelling in rats. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **104,** 17–28 (2011).
32. George, I. *et al.* Long-term effects of B-type natriuretic peptide infusion after acute myocardial infarction in a rat model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **55,** 14–20 (2010).
33. Sun, Y., Zhang, Y., Yan, M., Wu, Y. & Zheng, X. B-type natriuretic peptide-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition. *Biol. Pharm. Bull.* **32,** 1545–1551 (2009).
34. Sun, Y., Deng, T., Lu, N., Yan, M. & Zheng, X. B-type natriuretic peptide protects cardiomyocytes at reperfusion via mitochondrial calcium uniporter. *Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacothérapie* **64,** 170–176 (2010).
35. Zalvidea, S. *et al.* ACE inhibition prevents diastolic Ca2+ overload and loss of myofilament Ca2+ sensitivity after myocardial infarction. *Curr. Mol. Med.* **12,** 206–217 (2012).
36. Fauconnier, J. *et al.* Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 1559–1564 (2010).
37. Andre, L. *et al.* Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181,** 587–595 (2010).
38. Bers, D. M. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ. Res.* **87,** 275–281 (2000).
39. Bassani, J. W., Yuan, W. & Bers, D. M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **268,** C1313–1319 (1995).

40. Gómez, A. M. *et al.* Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. *Circulation* **119,** 2179–2187 (2009).
41. Fauconnier, J., Roberge, S., Saint, N. & Lacampagne, A. Type 2 ryanodine receptor: A novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacol. Ther.* (2013). doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.015
42. Wu, Y. *et al.* CaMKII effects on inotropic but not lusitropic force frequency responses require phospholamban. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53,** 429–436 (2012).
43. Wehrens, X. H. T. *et al.* FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* **113,** 829–840 (2003).
44. Umar, S. & van der Laarse, A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol. Cell. Biochem.* **333,** 191–201 (2010).
45. Takimoto, E. *et al.* Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J. Clin. Invest.* **115,** 1221–1231 (2005).
46. Buys, E. S. *et al.* Cardiomyocyte-restricted restoration of nitric oxide synthase 3 attenuates left ventricular remodeling after chronic pressure overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293,** H620–627 (2007).
47. Voigt, N. *et al.* Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak and increased Na+-Ca2+ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* **125,** 2059–2070 (2012).
48. Bers, D. M., Despa, S. & Bossuyt, J. Regulation of Ca2+ and Na+ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080,** 165–177 (2006).
49. Gómez, A. M., Guatimosim, S., Dilly, K. W., Vassort, G. & Lederer, W. J. Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation* **104,** 688–693 (2001).
50. Armoundas, A. A. *et al.* Cellular and molecular determinants of altered Ca2+ handling in the failing rabbit heart: primary defects in SR Ca2+ uptake and release mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292,** H1607–1618 (2007).
51. Belevych, A. E. *et al.* Shortened Ca2+ signaling refractoriness underlies cellular arrhythmogenesis in a postinfarction model of sudden cardiac death. *Circ. Res.* **110,** 569–577 (2012).
52. Belevych, A. E. *et al.* The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovasc. Res.* **90,** 493–502 (2011).
53. Jiang, Y. & Julian, F. J. Effects of isoflurane on [Ca2+]i, SR Ca2+ content, and twitch force in intact trabeculae. *Am. J. Physiol.* **275,** H1360–1369 (1998).
54. Hori, M. & Nishida, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **81,** 457–464 (2009).
55. Thireau, J., Zhang, B. L., Poisson, D. & Babuty, D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp. Physiol.* **93,** 83–94 (2008).
56. Berni, R. *et al.* Modulation of actin isoform expression before the transition from experimental compensated pressure-overload cardiac hypertrophy to decompensation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296,** H1625–1632 (2009).
57. Mørk, H. K. *et al.* Increased cardiomyocyte function and Ca2+ transients in mice during early congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **43,** 177–186 (2007).
58. Wehrens, X. H. T. *et al.* Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* **304,** 292–296 (2004).
59. Lehnart, S. E. *et al.* Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 7906–7910 (2006).
60. Petroff, M. G. *et al.* Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca2+ release in cardiomyocytes. *Nat. Cell Biol.* **3,** 867–873 (2001).
61. Massion, P. B., Pelat, M., Belge, C. & Balligand, J.-L. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **142,** 144–150 (2005).

62. Dickey, D. M. *et al.* Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology* **148,** 3518–3522 (2007).
63. Dickey, D. M., Dries, D. L., Margulies, K. B. & Potter, L. R. Guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B activities in ventricles and cardiomyocytes from failed and non-failed human hearts: GC-A is inactive in the failed cardiomyocyte. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52,** 727–732 (2012).
64. Mentzer, R. M., Jr *et al.* Effects of perioperative nesiritide in patients with left ventricular dysfunction undergoing cardiac surgery:the NAPA Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49,** 716–726 (2007).

		Day	Sham	PMI	PMI-BNP
Echocardiographic data					
LVEDd	mm	7	2.7 ±0.9	5.0 ±1.4***	4.8 ±1.2
		14	2.9 ±1.0	5.0 ±3.0***	5.0 ±2.9
SF	%	7	63 ±2	15 ±1***	18 ±1§
		14	60 ±1	13 ±2***	19 ±2§
CO	mL/min	7	14.5 ±0.3	10.1 ±0.7***	10.4 ±0.5
		14	14.2 ±0.5	11.5 ±1.3	12.6 ±0.9
HR	bpm	7	702 ±13	610 ±14***	634 ±12
		14	685 ±10	625 ±18*	646 ±29
Pathological data					
BW	g	7	25 ±0.5	24 ±1	24 ±0.5
		14	26 ±0.4	26 ±0.7	26 ±0.4
HW/BW	mg/g	7	6.8 ±0.2	10.6 ±0.8***	10.9 ±0.6
		14	7.1 ±0.2	10.4 ±0.6***	10.5 ±0.7
LV cell area	$x10^3$ µm²	7	2.48 ±0.07	3.03 ±0.15***	3.33 ±0.19
		14	2.33 ±0.09	3.52 ±0.015***	3.37 ±0.14

Table 1 - *In vivo* LV function assessed by echocardiography analysis (LVEDd: left ventricle end diastolic diameter; SF: shortening fraction; CO: cardiac output; HR: heart rate) and pathological data (BW: body weight; HW: heart weight) were assessed in Sham, PMI and PMI-BNP mice at 7 and 14 days after surgery. *p<0.05 and ***p<0.001 in PMI *vs.* Sham; §p<0.05 in PMI-BNP *vs.* PMI. (N=7 mice/group)

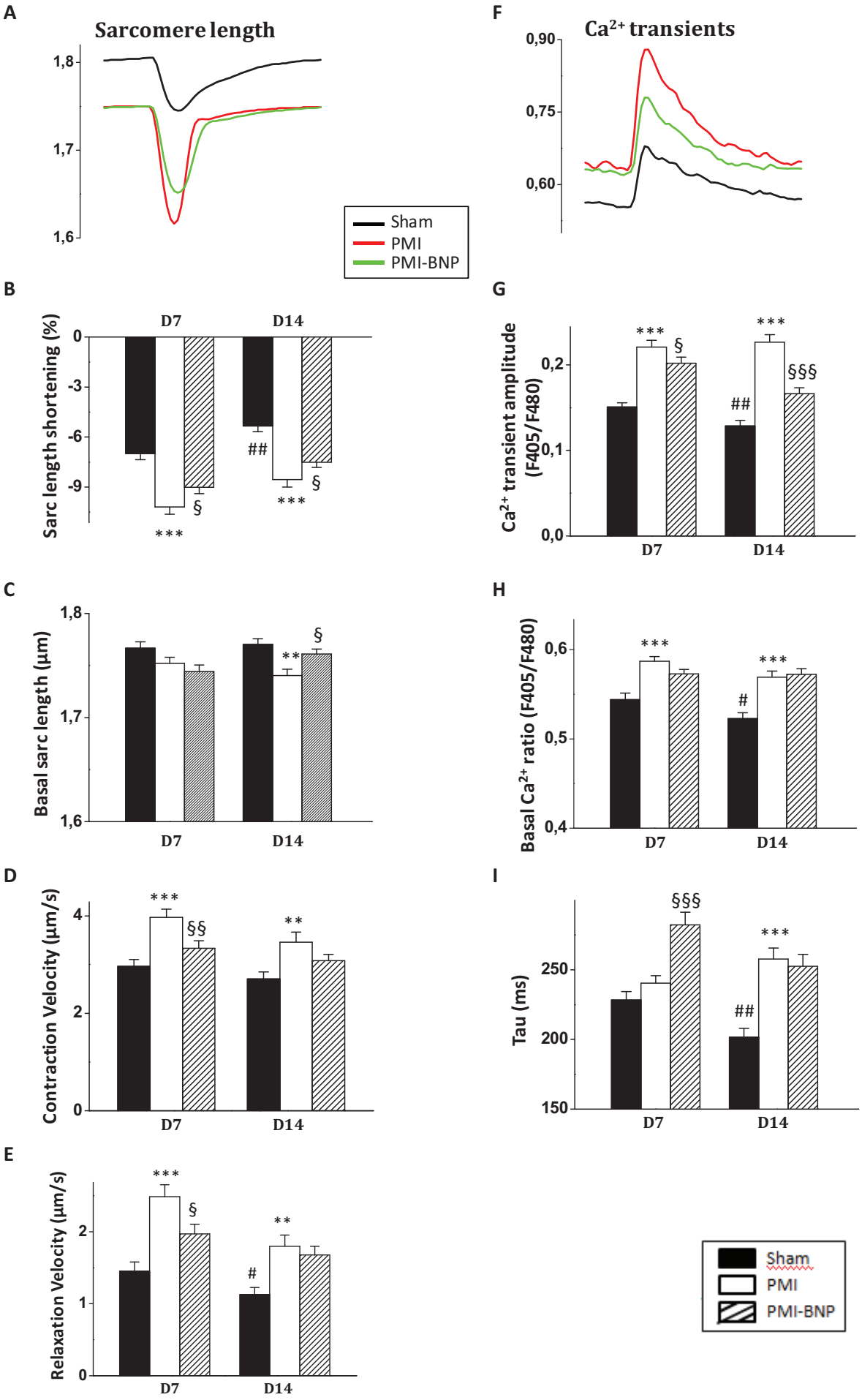


Figure 1 - E-C coupling parameters observed on single field stimulated LV cardiomyocytes at D7 and D14. A and F show, respectively, sarcomere length shortening and Ca^{2+} transient records obtained at D7 in Sham, PMI and PMI-BNP cells stimulated at 1Hz; B-E) cell shortening characteristics; and F-I) Ca^{2+} transients characteriscs. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 in PMI *vs.* Sham and §p<0.05; §§p<0.01; §§§p<0.001 in PMI-BNP *vs.* PMI; #p<0.05;##p<0.01 in D14 Sham *vs.* D7 Sham.

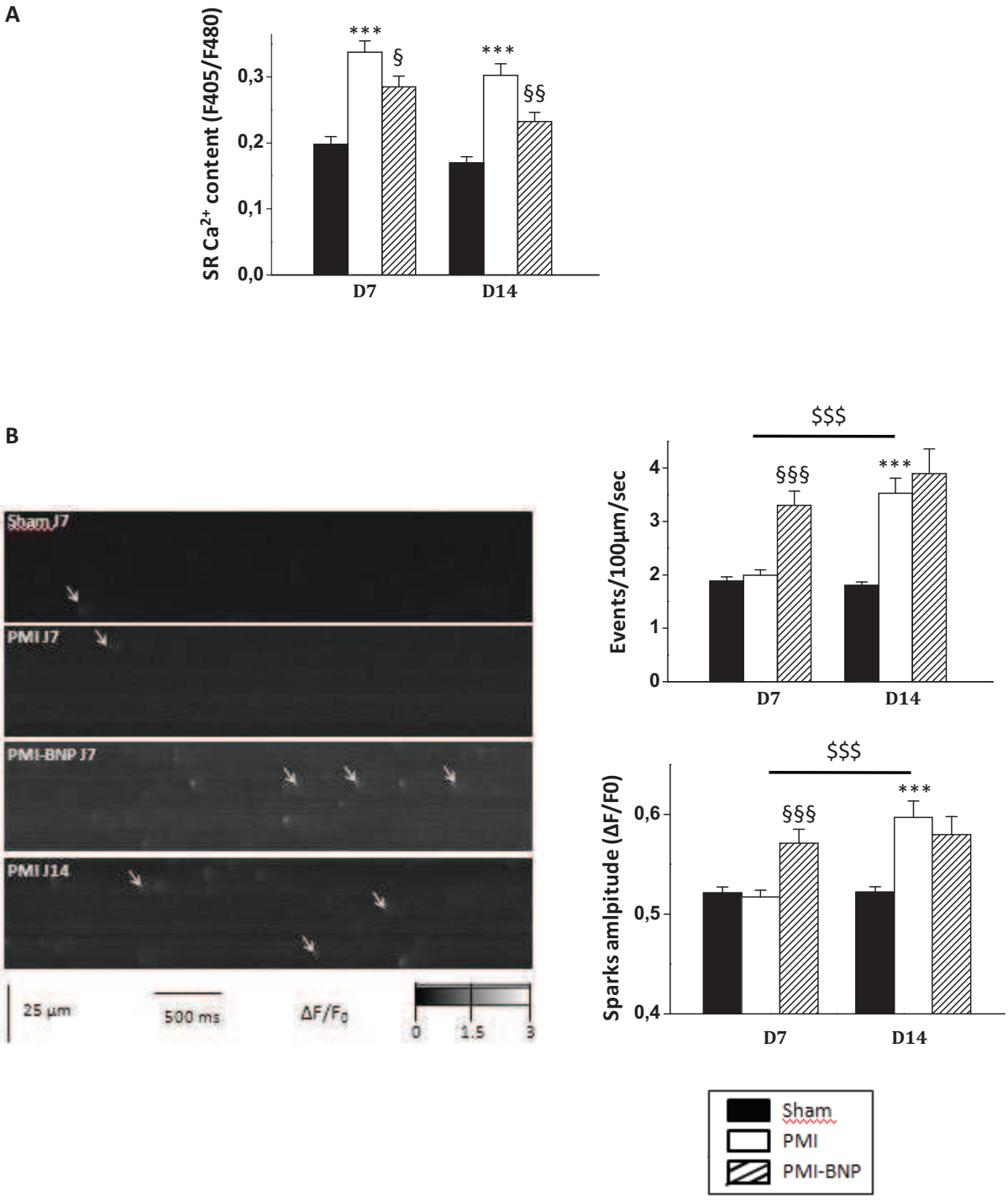


Figure 2 - SR Ca^{2+} characteristics: A) averaged SR Ca^{2+} content estimated from the caffeine-induced peak in Ca^{2+} transients and B) spontaneous Ca^{2+} sparks frequency and amplitude occurrence. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 in PMI *vs.* Sham and §p<0.05; §§p<0.01; §§§p<0.001 in PMI-BNP *vs.* PMI and $$$p<0.001 in D7 *vs.* D14 PMI.

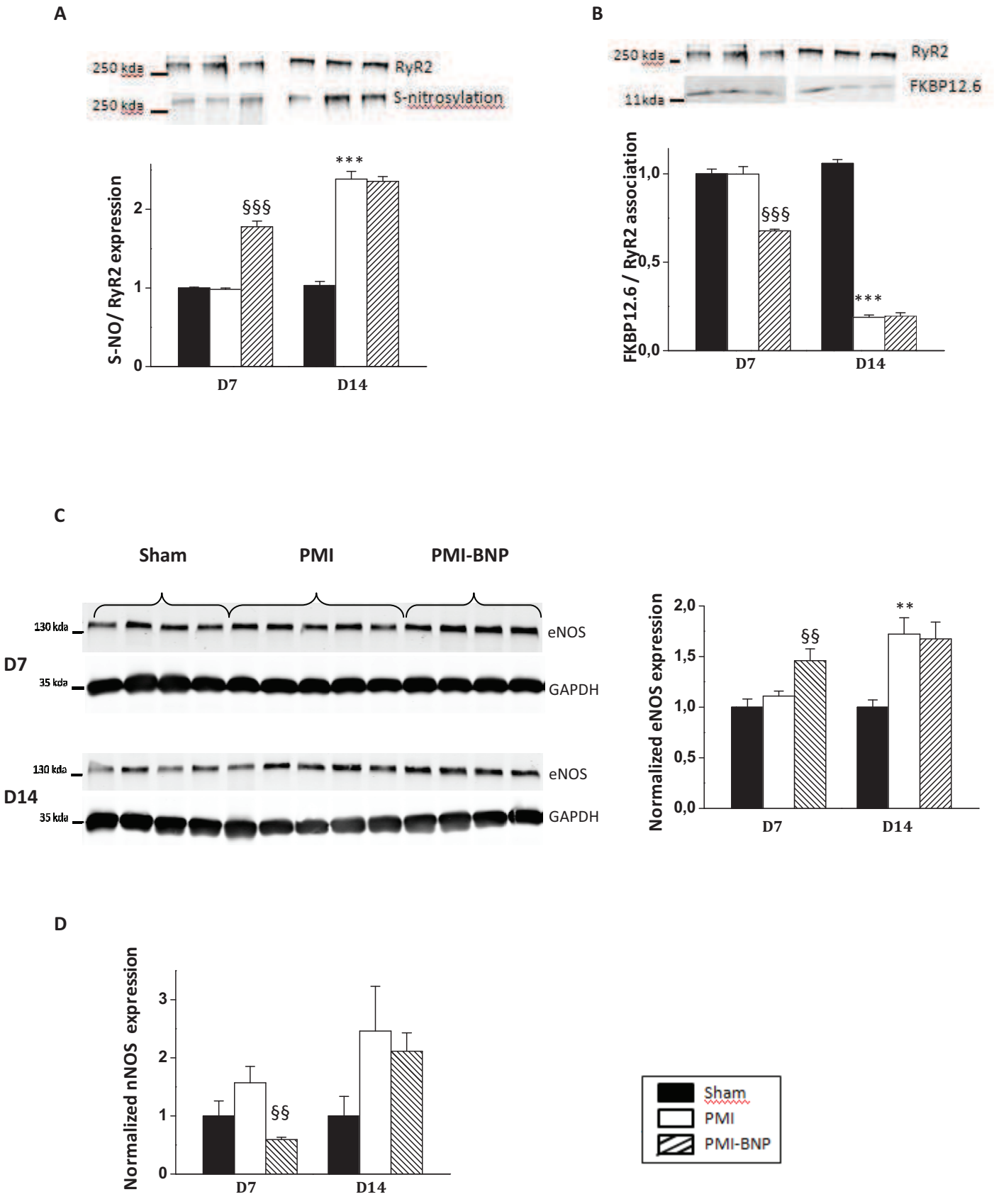


Figure 3 - Macromolecular RyR2 complex alterations in Sham, PMI and PMI-BNP LV tissue at 7 and 14 days post-surgery: A) RyR2 S-nitrosylation and B) association to FKBP12.6 (calstabin2) observed on RyR2 complex immunoprecipitation from hearts homogenates; C) eNOS and D) nNOS expression normalized to GAPDH. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 in PMI *vs.* Sham and §p<0.05; §§p<0.01; §§§p<0.001 in PMI-BNP *vs.* PMI.

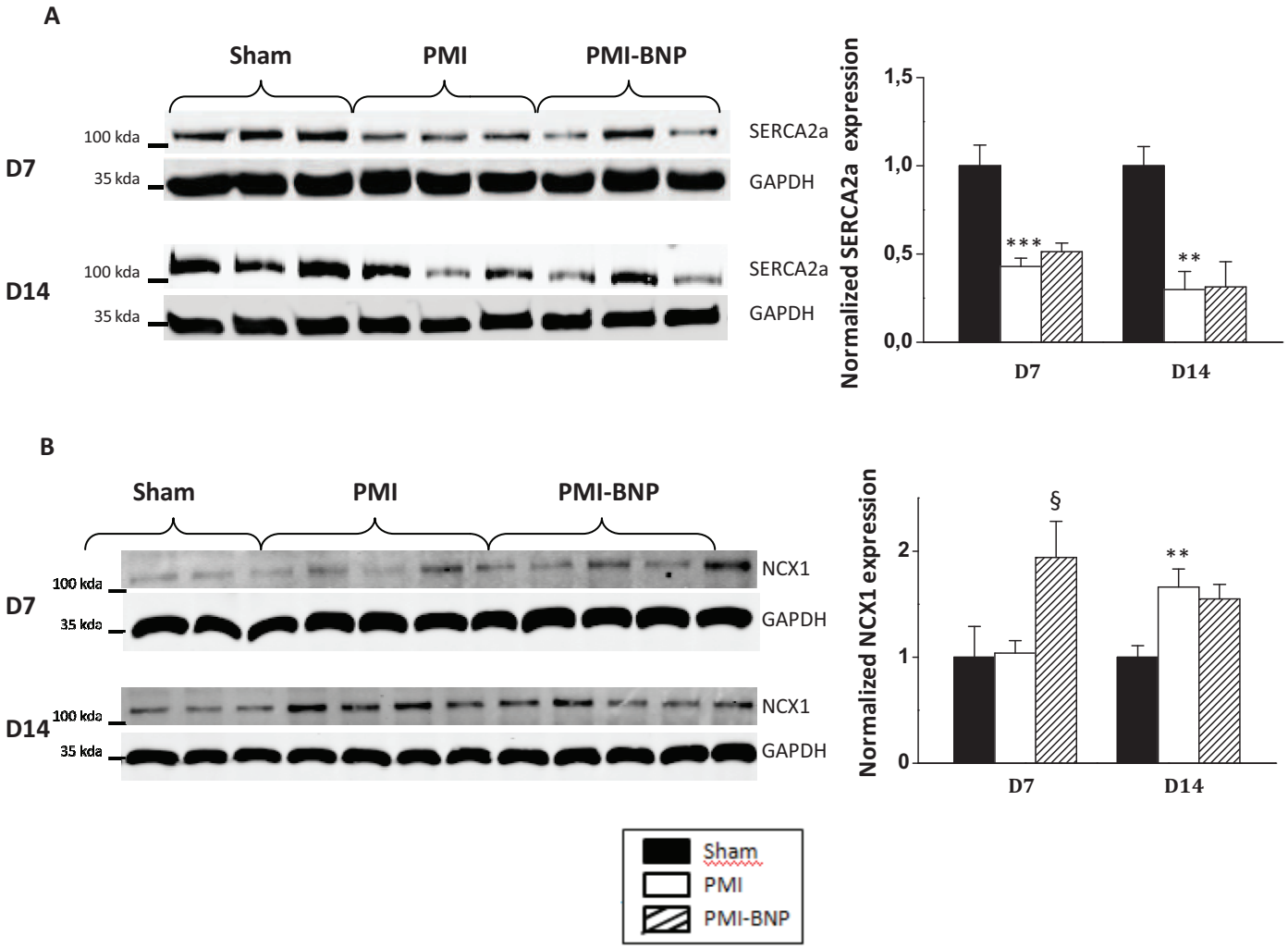
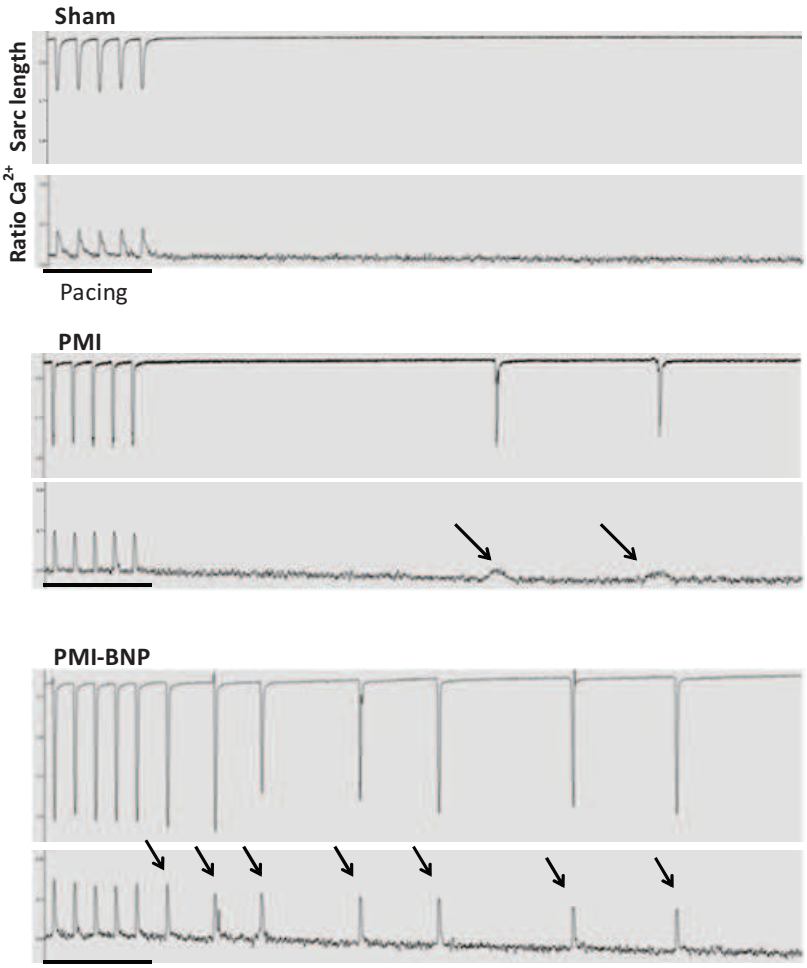


Figure 4 - Expression of proteins implicated in the removal of Ca^{2+} from the cytosol during diastole at D7 and D14 days: A) SERCA2a and B) NCX1 expression was normalized to GAPDH. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 in PMI *vs.* Sham and §p<0.05; §§p<0.01; §§§p<0.001 in PMI-BNP *vs.* PMI.



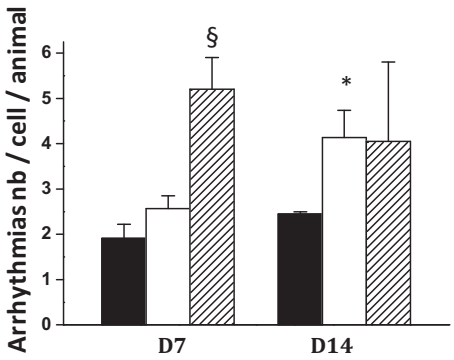


Figure 5 - Spontaneous Ca^{2+} waves and ectopic cell event occurrence in quiescent cells challenged to 10nM isoproterenol at D7 and D14. Representative records obtained on D7 Sham, PMI and PMI-BNP cells are reported. The narrows show spontaneous Ca^{2+} waves. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 in PMI *vs.* Sham and §p<0.05; §§p<0.01; §§§p<0.001 in PMI-BNP *vs.* PMI.

4- Discussion

Le BNP a été administré aux souris PMI à une dose équivalente à la dose de nésiritide donnée à des patients en IC aigue décompensée. Bien que le BNP n'ait pas montré pas d'effet (ni bénéfique ni aggravant) sur les perturbations morpho-fonctionnelles cardiaques chez les souris PMI traitées, cette dose a induit des effets délétères précoces sur la fonction de protéines essentielles aux mouvements calciques intracellulaires impliquées dans le CEC. Nous montrons que ces modifications sont à l'origine d'une perturbation des mouvements calciques intracellulaires et de l'augmentation des arythmies qui lui est inhérente. Le BNP semble donc affecter le remodelage cardiaque post-ischémique précoce, au moins au niveau cellulaire, en accélérant sa décompensation.

✓ Le BNP réduit la performance contractile des cellules du VG

Nos résultats montrent que le BNP réduit la contractilité et la relaxation des cardiomyocytes survivants du VG au cours des stades compensatoires (à J7 et à J14) chez les PMI traitées par rapport aux animaux non-traités. Cette réduction de la contractilité est associée à une diminution de l'amplitude des transitoires calciques et au contenu du RS en Ca^{2+}. Ces effets inotropes négatifs du BNP ont été déjà décrits dans plusieurs études. Ils ont été expliqués par une diminution de l'amplitude du courant déclencheur du mécanisme de CICR : I_{CaL}, ainsi que par une diminution du contenu du RS, lorsque le BNP est appliqué en aigu sur des cardiomyocytes de VG sains de rat.(151,152) Suite à un traitement en chronique sur des souris saines, les effets inotropes négatifs du BNP sont plutôt dus à une diminution de l'expression de la pompe SERCA et de la protéine régulatrice S100A1, par les fuites calciques des RyR et par la diminution du contenu du RS.(237) Une diminution de la performance cardiaque, au niveau de l'inotropisme et du lusitropisme, par l'ANP a également été observée sur différents modèles expérimentaux.(238–240) Ces effets peuvent passer par la voie GMPc/PKG activée par les récepteurs NPR-A spécifique de l'ANP et du BNP. En effet, le PKG, en phosphorylant les canaux LTCC et les protéines contractiles (*e.g.* troponine I et titine), inhibe le courant I_{CaL} et réduit la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+}.(124,125) Les effets observés du GMPc peuvent également passer par un *crosstalk* négatif avec l'AMPc *via* l'activation de PDE, notamment la PDE2. Des études récentes ont montré que l'expression et l'activité de la PDE2 sont augmentées dans les cardiomyocytes ventriculaires cardiaques chez des patients et des modèles expérimentaux en IC. La PDE2 est activée par le GMPc et permet de cataboliser l'AMPc en une forme linéaire inactive. Ceci peut expliquer, au moins en partie, la désensibilisation des récepteurs β-adr et la diminution des effets du SN sympathique (211,241) Ainsi, le

BNP, en activant ses récepteurs, peut augmenter l'efficacité de la PDE2 et réduire celle de voie β-adr. Mais le BNP en chronique induit des effets délétères au niveau des canaux RyR et de la recapture du Ca^{2+}.

✓ Le BNP accélère l'altération de la fonction des canaux RyR au cours du remodelage post-ischémique

Nous avons observé une augmentation de la fréquence des *sparks* calciques spontanées chez les souris PMI-BNP à J7 par rapport aux souris contrôles et même des souris PMI au même stade. Ces *sparks* calciques sont dus à des ouvertures spontanées des canaux RyR en absence de stimulation cellulaire. Ils peuvent être associés à une dissociation de la protéine régulatrice FKBP12,6 de ces canaux, notamment *via* différents mécanismes pathologiques comme la nitrosylation. L'augmentation des fuites par les RyR suite à la nitrosylation du canal a déjà été observée dans la dystrophie myopathique de Duchenne.(93) Nous avons également observé une augmentation de l'expression de eNOS (mais pas de celle de nNOS) chez les souris PMI-BNP à J7 par rapport aux Sham et PMI à ce stade. La eNOS catalyse la synthèse du NO qui agit soit en activant la voie GCs/GMPc, soit directement en nitrosylant les protéines cellulaires. La S-nitrosylation protéique a été rapportée comme étant cardioprotective dans l'ischémie-reperfusion parce qu'elle protège les protéines cellulaires de la peroxynitration (par le peroxynitrite : $ONOO^-$) induite par les ROS,(242,243) et pouvant être à l'origine d'arythmies fatales.(244) Cependant, une augmentation ou même une diminution de la S-nitosylation de RyR semble déréguler leur fonction en augmentant leur Po et en augmentant la survenue des *sparks* calciques spontanées.(93,245) L'augmentation de la eNOS en liaison avec une augmentation du taux de BNP a déjà été montrée dans d'autres études.(246) Des études supplémentaires doivent être faites pour explorer la voie de signalisation qui activerait la synthèse de la eNOS par le BNP ; mais il semblerait que l'activation de la voie GMPc/PKG intracellulaire induit une phosphorylation de ERK1/2 (membres de la famille des MAP kinases), à l'origine de l'augmentation de la synthèse de eNOS et iNOS.(247,248) De manière très intéressante, ces mêmes effets sur l'expression de eNOS et l'augmentation des *sparks* calciques sont observés chez les PMI non traités à J14, chez qui le taux de BNP endogène a déjà atteint son maximum.(237)

✓ Le BNP altère le recaptage diastolique du Ca^{2+} et augmente les arythmies

Chez les souris PMI-BNP à J7, nous avons observé une augmentation du temps de retour de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire à son niveau diastolique après la stimulation, par rapport aux PMI non traitées et aux Sham à ce stade. Ceci montre principalement une diminution de l'efficacité du recaptage du Ca^{2+} par la pompe SERCA, acteur majeur de cette phase chez les rongeurs. Ceci est alors en rapport direct avec les résultats obtenus au niveau moléculaire montrant une diminution de l'expression de la SERCA et une augmentation de celle de NCX chez ces souris. Les mêmes modifications d'expressions et de fonctions ont été observées chez les souris Sham traitées au BNP ainsi que chez les PMI non traités à J14. Cependant, la diminution de l'expression de la SERCA a été observée chez les PMI non traitées à J7, sans modification du Tau par rapport aux Sham. Ceci peut être dû à l'augmentation de l'activité de SERCA par augmentation de la phosphorylation de PLB et une diminution de son inhibition pour la SERCA, et/ou par une augmentation de l'expression de la S100A1 ; ces paramètres sont en cours d'étude. Un lien direct a été déjà établi entre le BNP et la diminution de l'expression de SERCA *via* l'activation de la voie calcineurine/NFAT.(77) L'augmentation de l'expression de NCX a déjà été rapportée dans différents modèles d'hypertrophie et d'IC. La diminution du contenu du RS chez les souris PMI-BNP à J7 peut alors être due à : i) l'augmentation des fuites calciques par les RyR ; ii) la diminution de l'activité de la pompe SERCA ; et iii) l'augmentation de celle de NCX. Ces trois types d'altérations sont déjà connus dans l'IC et ont été induits chez les Sham traitées au BNP.(40,237) De plus, l'activité diastolique des RyR peut induire une activation de NCX en mode *forward* pour extruder le Ca^{2+} surnuméraire. L'activité de NCX étant électrogénique (échange 3 ions Na^+ contre la sortie d'un cation Ca^{2+}), un courant I_{ti} s'active *via* l'entrée de Na^+ et peut ainsi déclencher des arythmies de type DAD. La susceptibilité de déclencher des arythmies est effectivement augmentée chez les PMI-BNP à J7 par rapport aux PMI non traitées, et même chez les Sham-BNP. Il serait très intéressant de compléter nos résultats en étudiant les effets du BNP sur l'électrophysiologie cardiaque et les arythmies ventriculaires *in vivo*.

✓ Implications cliniques

Une augmentation du taux circulant de BNP aux stades précoces post-ischémiques après la ligature de l'artère coronaire aggrave le remodelage cardiaque, accélère la décompensation au niveau de l'activité cellulaire et augmente le risque d'arythmies. Nos résultats vont dans le même sens que certaines études qui montrent qu'un taux élevé de BNP dans les phases tar-

dives de l'IC est associé à des arythmies fatales de type fibrillation atriale et tachycardie ventriculaire,(249–251) et qu'une diminution du taux de BNP améliore le pronostic des patients.(166,204) Malgré les effets hémodynamiques bénéfiques du BNP, le nésiritide semble être un traitement à ne pas conseiller aux patients en IC aiguë décompensée vu les effets délétères qu'il risque d'induire sur l'homéostasie calcique et ses effets pro-arythmogéniques.

5- Conclusion

Le BNP, utilisé dans la pratique en clinique comme un biomarqueur de diagnostic et de pronostic de l'IC, n'est pas qu'un simple marqueur de la pathologie. Notre présente étude montre qu'un taux élevé de BNP peut être à l'origine de perturbations de mouvements calciques connues dans l'IC, par altération de la fonction de certaines protéines du CEC, notamment RyR, SERCA et NCX. Ces altérations peuvent être à l'origine d'arythmies ventriculaires fatales chez les patients. Le nésiritide ne devrait donc pas être administré aux patients en IC aiguë décompensée parce qu'il risque d'accélérer le remodelage cardiaque pathologique et d'induire la défaillance cardiaque.

Conclusion générale

Après ce long travail bibliographique et expérimental, nous arrivons à la conclusion que le BNP n'est pas un simple marqueur de l'IC. Son taux, utilisé dans la pratique clinique comme un biomarqueur de diagnostic et de pronostic de l'IC, ne coïncide pas par hasard avec l'augmentation des altérations de la fonction du VG, avec l'augmentation de la survenue des arythmies et avec un mauvais pronostic de morbidité et de mortalité. Au contraire, **nos travaux montrent qu'un taux chronique élevé de BNP dans le sang induit des altérations au niveau de l'électrophysiologie cardiaque et des mouvements calciques** dans les cardiomyocytes du VG, qui sont **à l'origine d'activités ectopiques cellulaires et cardiaques**.

Les effets délétères du BNP ont été observés, dans la première partie des résultats, sur des souris saines, dénuées de pathologie cardiaque ; et dans la troisième partie, sur le remodelage cardiaque post-ischémique. Dans un premier temps, nous avons traité des souris Sham pendant deux semaines à une dose de 0,03 µg/kg/min au BNP murin. Cette dose a été choisie pour deux raisons : i) elle correspond à la dose de BNP administrée sous une forme recombinante, le nésiritide, à des patients en IC aiguë décompensée ; et ii) au bout de deux semaines de traitement chez les souris Sham, elle induit un taux de BNP circulant équivalent à celui mesuré chez les PMI à un stade avancé du remodelage post-ischémique. Le traitement chronique des souris saines au BNP a induit une hypertrophie cellulaire et des altérations dans la fonction de certaines protéines fortement impliquées dans les mouvements calciques intracellulaires : il a induit une augmentation des fuites calciques par les RyR, une réduction de l'efficacité de la recapture de Ca^{2+} par le RS, une redistribution du Ca^{2+} entre le RS et le cytosol, une augmentation de l'expression de NCX et une diminution de celle de la S100A1 et de la SERCA. Au niveau électrophysiologique, le BNP a induit une prolongation de la durée de l'intervalle QT (QTc). Ces différentes altérations calciques et électrophysiologiques sont à l'origine d'une augmentation de la survenue d'arythmies cellulaires, notamment en phase de quiescence, et d'ESV au niveau intégré. Ces différentes altérations électrophysiologiques et des mouvements calciques sont caractéristiques de l'IC. Notons que ces effets redoutables du BNP ont été prévenus chez les BNP-Sham par un traitement combiné avec un β-bloqueur : le métoprolol. Ceci laisse penser que les effets du BNP ne sont pas forcément directs, à travers leur action sur leurs récepteurs cardiaques, mais qu'ils passeraient plutôt *via* une suractivation de la libération de catécholamines. Sur le cœur sain, le BNP induit alors un phénotype cardiaque proche de celui de l'IC.

Une autre étude intéressante a également été menée dans notre laboratoire par le Dr. Jérôme Thireau et à laquelle j'ai pu participer : étude d'un traitement combinant BNP et métoprolol sur le remodelage cardiaque post-ischémique. Cet article est actuellement en soumission. Je le présente en annexe. La supplémentation de BNP à des souris PMI en stade décompensé de l'IC aggrave le remodelage cardiaque en augmentant l'activité du SN sympathique, le prolongement de l'intervalle QT et la survenue des arythmies ; ceci est associé à une aggravation des altérations des mouvements calciques intracellulaires, sachant qu'à ce stade tardif de la pathologie, les différents paramètres du CEC sont déjà effondrés. Mais, comme chez les Sham, les effets délétères du BNP sont effacés par une bi-thérapie combinant BNP et métoprolol. Cette bi-thérapie permet, non seulement de protéger le cœur de la suractivation du SN sympathique et de l'amplification du BNP à ce système (régulation de la balance hormonale), mais aussi de manifester des effets bénéfiques du BNP comme les effets anti-fibrotiques et anti-hypertenseurs, recherchés dans l'IC. Cette bi-thérapie est plus efficace que le traitement au métoprolol seul, bien que chez ces souris PMI, comme chez l'Homme en IC, le taux endogène de BNP est considérablement élevé. Mais le BNP endogène semble ne pas agir efficacement, probablement parce qu'il s'agit d'une forme tronquée peu active retrouvée chez l'Homme et d'autres modèles animaux d'IC.(252–254)

Au cours de ces travaux, nous avons voulu nous rapprocher de ce qui se passe chez l'Homme, en travaillant à un stade précoce du remodelage cardiaque post-ischémique, stade qui rappelle l'IC aiguë décompensée au cours de laquelle le nésiritide est administré. Nous avons voulu savoir si un traitement de type nésiritide était bénéfique, le modèle d'infarctus aigu avec décompensation immédiate au niveau intégré était très intéressant pour étudier cela dès les premiers stades post-ischémiques. Nous avons voulu aussi vérifier si, en phase précoce post-ischémique, les effets vasodilatateurs, inhibiteurs du SRAA, diurétiques et natriurétiques du BNP pourraient contre-balancer l'ensemble de systèmes de compensation, notamment des systèmes hormonaux vasoconstricteurs comme le SN sympathique et le SRAA, qui se mettent en route et agir sur le remodelage cardiaque. Pour cela, nous avons tout d'abord caractérisé la phase précoce du remodelage cardiaque post-ischémique à 3, 7 et 14 jours après la ligature. D'une manière intéressante, le taux endogène de BNP augmente progressivement au cours de cette phase et atteint son maximum à J14, stade auquel les altérations des fonctions protéiques, notamment RyR et SERCA, commencent à apparaître. Nous avons traité, par la suite, des souris PMI au BNP à la même dose donnée aux Sham, pendant les deux premières semaines suivant la ligature.

Notre modèle de souris PMI présente beaucoup d'inconvénients :

i) une mortalité qui peut être entre 20 et 50 % durant les deux premières semaines post-opératoires,

ii) nous avons noté des effets post-opératoires importants, notamment sur la fonction cardiaque *in vivo*, au cours de la première semaine suivant l'opération; ce qui a restreint le domaine temporel de nos investigations sur les effets propres de l'infarctus et du BNP. Les stades 3 et 7 jours principalement posent problème.

iii) pour induire un remodelage cardiaque, la ligature expérimentale de l'artère coronaire gauche doit être proximale et donc induire la nécrose de plus de 70% du VG. Ceci rend les études au niveau *in vivo* assez limitées parce que les effets des traitements sont occultés par l'ampleur de la diminution drastique de la contractilité du myocarde.

Cependant, les avantages de ces souris PMI en faveur de notre étude restent non négligeables:

i) le remodelage cardiaque au niveau cellulaire (mouvements calciques et CEC) est rapide, tout en restant progressif et homogène. Il passe par une phase compensatrice où les mouvements calciques vont dans le sens d'un inotropisme positif avec une augmentation de la contractilité cellulaire au cours des deux premières semaines. A J14 apparaissent les premières altérations fonctionnelles des RyR et SERCA. Au bout d'un mois, l'activité des cardiomyocytes décompense avec une réduction importante des mouvements calciques et de la contractilité,

ii) le passage de la phase compensée à la décompensation est rapide (1 mois),

i et ii) nous avons pu alors étudier les effets de la supplémentation de BNP sur la progression du remodelage du CEC.

iii) le taux de BNP endogène augmente progressivement au cours des deux premières semaines après la ligature. Nous avons donc pu activer cette voie en précoce en infusant du BNP par voie sous-cutanée et voir les effets du BNP sur le remodelage cardiaque précoce, phase qui peut simuler l'IC aiguë décompensée où le traitement au nésiritide est appliqué.

iv) le modèle est résistant aux arythmies cardiaques.

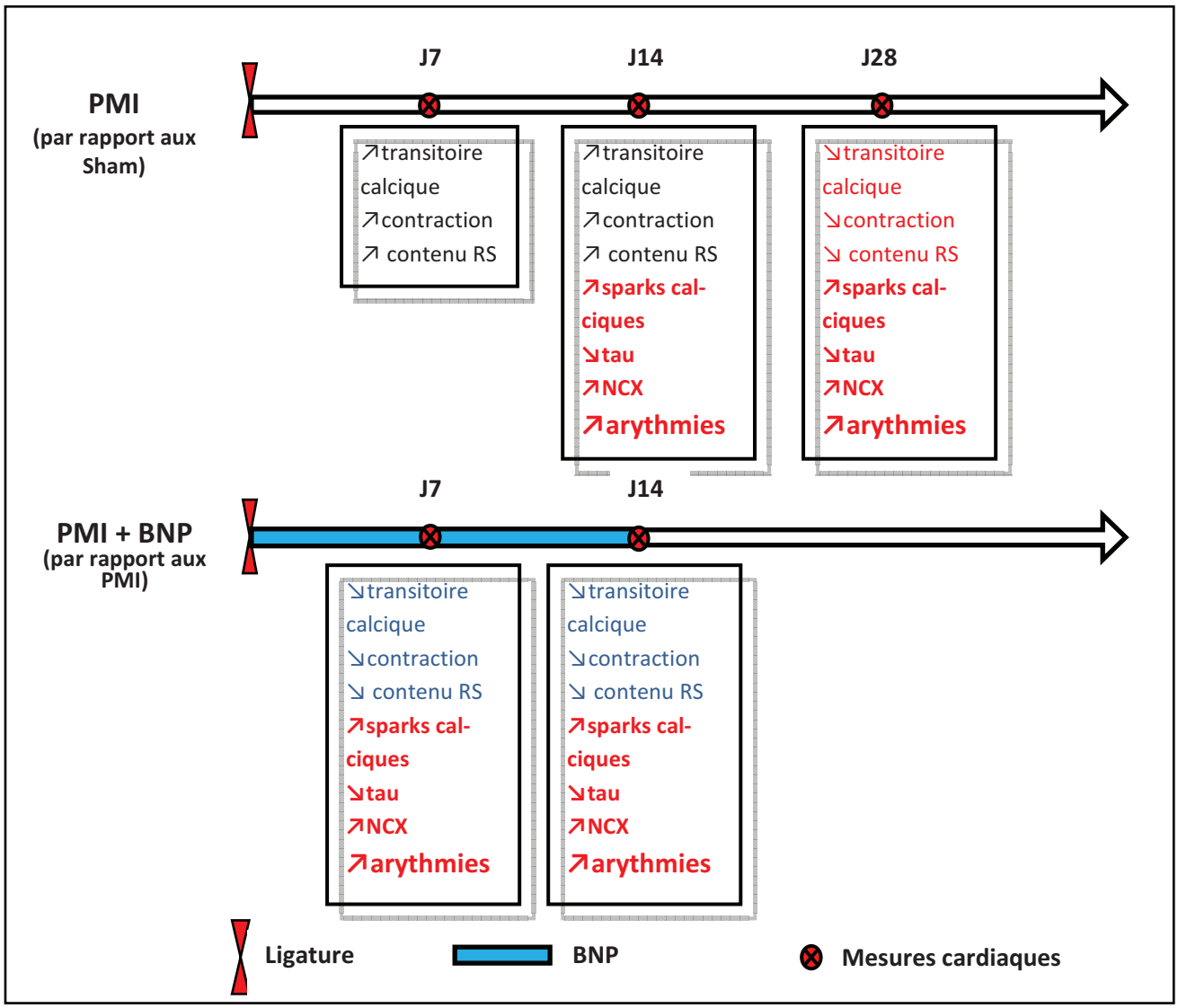


Figure 47 - Schéma récapitulatif de la progression du remodelage post-ischémique des cellules du VG et des effets du BNP dessus

La figure 47 résume les résultats obtenus au niveau cellulaire sur la progression du remodelage cardiaque ischémique chez les PMI à J7, J14 et J28 ; ainsi que les effets du traitement au BNP au cours des deux premières semaines. Par ses effets sur l'augmentation des fuites calciques spontanées et la réduction de l'efficacité sur la SERCA, le BNP altère les modifications précoces compensatrices du CEC et semble accélérer le passage en phase de décompensation cardiaque. Nous avons identifié la voie par laquelle le BNP altère la fonction des RyR : il induit une augmentation de la S-nitrosylation des RyR, un effecteur majeur de la dissociation de sa protéine régulatrice FKBP12,6 en phase diastolique. Cependant, les effets chroniques du BNP sur la SERCA ne sont pas encore identifiés. Nous savons que le BNP diminue l'expression de la SERCA. Nous sommes actuellement en cours d'étude des effets du BNP sur d'autres protéines pouvant influencer l'activité de cette pompe calcique, comme le PLB et la S100A1. Nous sommes également en cours d'analyse des arythmies *in vivo* sur les ECG pour

savoir si les altérations induites par le BNP augmentent les arythmies *in vivo*, notamment les ESV, comme chez les Sham traitées ; ces arythmies risquant d'être fatales chez l'Homme. Nos résultats à présent vont dans le même sens que certaines méta-analyses cliniques qui montrent que le nésiritide risque d'augmenter le taux de mortalité chez les patients en IC aiguë décompensée traités. Malgré les effets hémodynamiques vasorelaxants et ses effets anti-fibrotiques, le **BNP peut induire une augmentation de la voie β-adr** (effet observé chez les Sham traitées et pas les PMI traitées parce que chez ces dernières le tonus sympathique est suractivé après la ligature), **une prolongation redoutable de l'intervalle QTc** (observée chez les Sham traitées et pas chez les PMI traitées parce que chez ces dernières l'intervalle QTc est prolongé après la ligature par effet de fibrose et de changements structuraux du cœur) **et des altérations des mouvements calciques intracellulaires pro-arythmogéniques**.

Le traitement au BNP est alors délétère, même dans les stades précoces suivant l'événement ischémique. Le BNP, bien qu'il ne montre pas d'effet au niveau morpho-fonctionnel cardiaque, il aggrave les altérations des mouvements calciques intracellulaires, augmente les arythmies et accélère la décompensation du CEC. Ceci peut être à l'origine de l'augmentation du taux de mortalité chez des patients en IC aiguë décompensée traités au nésiritide. Mais est-ce qu'une bi-thérapie BNP - β-bloqueur pourrait-elle sauver le remodelage cardiaque des effets délétères du BNP, comme ceci a été montré chez les Sham et les PMI en phase décompensée? Il serait très intéressant de vérifier cette hypothèse en testant les effets de cette bi-thérapie sur le modèle souris en stade aigu post-infarctus. Il serait également intéressant, sur le long terme, de la tester chez des patients en IC aiguë décompensée, surtout qu'il n'existe toujours pas de nos jours un traitement de cette pathologie qui permet de réduire les symptomes et améliorer les issues cliniques.(1)

Liste des figures

Figure 1 - Anatomie du cœur et du tissu de conduction. 14
Figure 2 - Illustration d'un ECG enregistré en dérivation DII chez l'Homme et la souris. 16
Figure 3 - Relation entre la fréquence cardiaque (*Heart rate*) et la durée de vie (*Life expectancy*) des mammifères 18
Figure 4 - Activité électrique cardiaque en conditions physiologiques *in vivo* (a), au niveau des cellules ventriculaires (b) et nodales (c) 20
Figure 5 - Comparaison des potentiels d'action et des courants ioniques de base dans le cardiomyocyte ventriculaire de l'Homme (gauche) et de la souris (droite). 22
Figure 6 - Couplage excitation – contraction dans les cardiomyocytes ventriculaires. 23
Figure 7 - Activation des ponts actine – myosine des sarcomères par le Ca^{2+} cytosolique. 24
Figure 8 - Structure moléculaire du canal calcique voltage-dépendant de type L (LTCC) des cardiomyocytes ventriculaires adultes 25
Figure 9 - Représentation schématique du complexe macromoléculaire formé du RyR2 et de ses protéines associées. 28
Figure 10 - a) Enregistrement d'un *spark* calcique en microscopie confocale, b) Mesure simultanée d'un *spark* et d'un transitoire calcique 29
Figure 11 - Modélisation de la régulation fonctionnelle de la SERCA2a par le PLB 32
Figure 12 - a) Les effets de la S100A1 dans les différents compartiments d'un cardiomyocyte ventriculaire. b) Expression et interaction de la S100A1 avec différentes protéines cardiomyocytaires Ca^{2+}-dépendantes. 35
Figure 13 - Comparaison de la relation force-fréquence myocardique dans différentes espèces 37
Figure 14 - Activation de la phosphorylation par PKA et CamKII en réponse à une stimulation β-adrénergique. 39
Figure 15 - Les causes de mortalité des hommes (a) et des femmes (b) en Europe. 43
Figure 16 - Schématisation des principaux événements aboutissant à l'installation de l'IC 44
Figure 17 - Représentation schématique des principales modifications morphologiques et fonctionnelles du cœur remodelé suite à une hypertension (au milieu) et une cardiomyopathie ischémique ou idiopathique (à droite) par rapport à un cœur sain (à gauche) 47
Figure 18 - Schématisation des modifications électrophysiologiques (durée du PA et des courants de repolarisation), de la concentration en Ca^{2+} et de la contractilité cellulaire du cœur en phase tardive de l'IC. 49
Figure 19 - Les flux calciques normaux et remodelés au cours de l'IC. 51
Figure 20 - Schématisation des flux calciques myocardiques induits par la S-nitrosylation des protéines du coupalge excitation-contraction 53
Figure 21 - Facteurs contribuant aux arythmies cellulaires déclenchées dans l'insuffisance cardiaque: les arythmies après-dépolarisations précoces (EADs) et tardives (DADs) 55
Figure 22 - Schématisation des mécanismes principaux impliqués dans les arythmies ventriculaires: de l'activité ectopique cellulaire au déclenchement des arythmies ventriculaires. 57
Figure 23 - L'inhibition et la stabilisation pharmacologiques du RyR réduit le risque arythmogénique dans les pathologies cardiaques telles que la fibrillation atriale (AF), l'insuffisance cardiaque (HF) et les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT). 59
Figure 24 - Peptides natriurétiques cardiaques 61
Figure 25 - Les voies GMPc-dépendantes des récepteurs des peptides natriurétiques de type A et B 65
Figure 26 - Schéma des principales phosphodiestérases cardiaques (PDE1, 2, 3, 4 et 5) et du *cross-talk* AMPc - GMPc dans un cardiomyocyte ventriculaire 66

Figure 27 - Effets physiologiques majeurs des NP cardiaques en réponse à des modifications aigues du volume sanguin 68
Figure 28 - Régulation et effets des NP cardiaques dans les pathologies cardiaques. 71
Figure 29 - Cinétique d'augmentation du taux plasmatique sanguin de l'ANP et du BNP chez des patients après un infarctus du myocarde. 72
Figure 30 - Boites à moustaches montrant les niveaux médians du BNP chez des patients en IC appartenant aux 4 groupes du classement NYHA. 73
Figure 31 - BNP: évaluateur pronostic de l'IC. (A) Incidence de mort, de survenue d'une IC ou d'un infarctus du myocarde dans les 30 jours et 10 mois en fonction du taux sérique de BNP au moment de l'hospitalisation. (B) Taux de mortalité des patients après 31 et 180 jours par rapport à la diminution du taux de BNP en réponse aux traitements 74
Figure 32 - Courbes de Kaplan-Meyer montrant des effets contradictoires du traitement au nésiritide sur la mortalité au bout de 30 jours de : (A) patients en IC aigue décompensée et (B) d'autres ayant une dysfonction du VG 76
Figure 33 - Schématisation du *cross-talk* GMPc-AMPc dépendant de la PDE3 et de la compartimentalisation dans les cellules ventriculaires dans l'IC 79
Figure 34 - Représentation schématique de la boucle de rétroaction de la voie β3-adrénergique..... 80
Figure 35 - Illustration de la ligature de l'artère coronaire gauche du modèle souris PMI. 85
Figure 36 - Illustration d'une pompe osmotique *Alzet* et des différentes parties qui la constituent. 86
Figure 37 - Protocole expérimental suivi pendant le travail de thèse. 87
Figure 38 - Système télémétrique d'acquisition des ECG chez la souris. 88
Figure 39 - Etapes principales de l'isolement des cellules cardiaques du VG. 91
Figure 40 - Dispositif du système Ionoptix muni d'un microscope à fluorescence utilisé dans l'étude du CEC sur des cellules chargées en Indo-1 AM. 94
Figure 41 - Schéma du trajet de la lumière dans un microscope confocal inversé 96
Figure 42 – Illustration de l'acquisition de *sparks* calciques sur un cardiomyocyte chargé au Fluo-4 AM. 97
Figure 43 - Principe du dosage EIA du BNP plasmatique murin à l'aide du kit Phoenix Pharmaceuticals. 100
Figure 44 - Protocole expérimental suivi au cours de la première partie des résultats 102
Figure 45 - Protocole expérimental suivi au cours de la deuxième partie des résultats 108
Figure 46 - Protocole expérimental suivi au cours de la troisième partie des résultats 123
Figure 47 - Schéma récapitulatif de la progression du remodelage post-ischémique des cellules du VG et des effets du BNP dessus 131

Tableau 1 - Poids corporel et fréquence cardiaque de quelques mammifères 17
Tableau 2 - Composition du Laemmli – β-mercaptoéthanol (4X) 98
Tableau 3 - Composition du Laemmli – urée (2X) 98

Références bibliographiques

1. Givertz MM, Teerlink JR, Albert NM, Westlake Canary CA, Collins SP, Colvin-Adams M, et al. Acute decompensated heart failure: update on new and emerging evidence and directions for future research. J Card Fail. 2013 Jun;19(6):371–89.
2. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. Circ Res. 2012 Jun 22;111(1):131–50.
3. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. Circulation. 1993 Jul;88(1):82–91.
4. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. J Am Coll Cardiol. 2001 Feb;37(2):379–85.
5. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med. 2002 Jul 18;347(3):161–7.
6. Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. JAMA J Am Med Assoc. 2005 Apr 20;293(15):1900–5.
7. Sackner-Bernstein JD, Skopicki HA, Aaronson KD. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. Circulation. 2005 Mar 29;111(12):1487–91.
8. Topol EJ. Nesiritide - not verified. N Engl J Med. 2005 Jul 14;353(2):113–6.
9. Lacolley P. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext; 2007.
10. Tripathi ON, Ravens U, Sanguinetti MC. Heart Rate and Rhythm: Molecular Basis, Pharmacological Modulation and Clinical Implications. Springer; 2011.
11. Kaese S, Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. Front Physiol. 2012;3:345.
12. Noujaim SF, Lucca E, Muñoz V, Persaud D, Berenfeld O, Meijler FL, et al. From mouse to whale: a universal scaling relation for the PR Interval of the electrocardiogram of mammals. Circulation. 2004 Nov 2;110(18):2802–8.
13. Zhang GQ, Zhang W. Heart rate, lifespan, and mortality risk. Ageing Res Rev. 2009 Jan;8(1):52–60.
14. Fye WB. A history of the origin, evolution, and impact of electrocardiography. Am J Cardiol. 1994 May 15;73(13):937–49.
15. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflüg Arch Eur J Physiol. 1981 Aug;391(2):85–100.
16. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias--diagnosis and therapy. Nat Rev Cardiol. 2012 Jun;9(6):319–32.
17. Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? Circ Res. 2001 Nov 23;89(11):944–56.
18. Bers DM. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. Circ Res. 2002 Jan 11;90(1):14–7.

19. Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. Circ Res. 2000 Aug 18;87(4):275–81.
20. Bers DM, Shannon TR. Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2013 May;58:59–66.
21. Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca2+ and Na+ in normal and failing cardiac myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1080:165–77.
22. Shaw RM, Colecraft HM. L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. Cardiovasc Res. 2013 May 1;98(2):177–86.
23. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca^{2+} handling in heart failure. Circ Res. 2013 Aug 30;113(6):690–708.
24. Benitah J-P, Alvarez JL, Gómez AM. L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 2010 Jan;48(1):26–36.
25. Harvey RD, Hell JW. CaV1.2 signaling complexes in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2013 May;58:143–52.
26. Lacampagne A, Fauconnier J, Richard S. [Ryanodine receptor and heart disease]. Médecine Sci MS. 2008 Apr;24(4):399–405.
27. Fauconnier J, Roberge S, Saint N, Lacampagne A. Type 2 ryanodine receptor: a novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. Pharmacol Ther. 2013 Jun;138(3):323–32.
28. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. Physiol Rev. 2008 Oct;88(4):1491–545.
29. Thireau J, Pasquié J-L, Martel E, Le Guennec J-Y, Richard S. New drugs vs. old concepts: a fresh look at antiarrhythmics. Pharmacol Ther. 2011 Nov;132(2):125–45.
30. Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, et al. The cAMP binding protein Epac modulates Ca2+ sparks by a Ca2+/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. J Physiol. 2007 Sep 1;583(Pt 2):685–94.
31. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res. 2004 Apr 2;94(6):e61–70.
32. Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Pereira L, Fernández-Velasco M, Cassan C, Lezoualc'h F, et al. Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 2012 Nov;53(5):617–25.
33. Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, et al. Epac2 mediates cardiac β1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak and arrhythmia. Circulation. 2013 Feb 26;127(8):913–22.
34. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. Circ Res. 2012 Jun 8;110(12):1646–60.
35. Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase. J Mol Cell Cardiol. 2007 May;42(5):903–11.
36. Shintani-Ishida K, Yoshida K-I. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC-α, and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. Biochim Biophys Acta. 2011 Jul;1812(7):743–51.
37. Ren X, Philipson KD. The topology of the cardiac Na^{+}/Ca^{2+} exchanger, NCX1. J Mol Cell Cardiol. 2013 Apr;57:68–71.
38. Ottolia M, Torres N, Bridge JHB, Philipson KD, Goldhaber JI. Na/Ca exchange and contraction of the heart. J Mol Cell Cardiol. 2013 Aug;61:28–33.
39. Reppel M, Fleischmann BK, Reuter H, Pillekamp F, Schunkert H, Hescheler J. Regulation of Na+/Ca2+ exchange current in the normal and failing heart. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar;1099:361–72.

40. Schillinger W, Fiolet JW, Schlotthauer K, Hasenfuss G. Relevance of Na+-Ca2+ exchange in heart failure. Cardiovasc Res. 2003 Mar 15;57(4):921–33.
41. Ritterhoff J, Most P. Targeting S100A1 in heart failure. Gene Ther. 2012 Jun;19(6):613–21.
42. Janssen PML, Periasamy M. Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2007 Nov;43(5):523–31.
43. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. Eur J Pharmacol. 2004 Oct 1;500(1-3):73–86.
44. Frampton JE, Harrison SM, Boyett MR, Orchard CH. Ca2+ and Na+ in rat myocytes showing different force-frequency relationships. Am J Physiol. 1991 Nov;261(5 Pt 1):C739–750.
45. Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. J Mol Cell Cardiol. 2010 Feb;48(2):322–30.
46. Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause EG. The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+/calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca2+-independent in intact beating hearts. FEBS Lett. 1997 Jun 9;409(2):131–6.
47. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. Circulation. 2005 May 31;111(21):2837–49.
48. Latronico MVG, Elia L, Condorelli G, Catalucci D. Heart failure: targeting transcriptional and post-transcriptional control mechanisms of hypertrophy for treatment. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(9):1643–8.
49. Xiao R-P, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, et al. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. Trends Pharmacol Sci. 2006 Jun;27(6):330–7.
50. Zhou YY, Cheng H, Bogdanov KY, Hohl C, Altschuld R, Lakatta EG, et al. Localized cAMP-dependent signaling mediates beta 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. Am J Physiol. 1997 Sep;273(3 Pt 2):H1611–1618.
51. Rozec B, Gauthier C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. Pharmacol Ther. 2006 Sep;111(3):652–73.
52. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. Circulation. 2001 Mar 27;103(12):1649–55.
53. Bristow MR, Feldman AM, Adams KF Jr, Goldstein S. Selective versus nonselective beta-blockade for heart failure therapy: are there lessons to be learned from the COMET trial? J Card Fail. 2003 Dec;9(6):444–53.
54. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8;96(12):7059–64.
55. Bristow MR. What type of beta-blocker should be used to treat chronic heart failure? Circulation. 2000 Aug 1;102(5):484–6.
56. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. J Clin Invest. 2007 Mar;117(3):568–75.
57. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. Circulation. 1991 Feb;83(2):504–14.
58. Kaprielian RR, Stevenson S, Rothery SM, Cullen MJ, Severs NJ. Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. Circulation. 2000 Jun 6;101(22):2586–94.
59. Crossman DJ, Ruygrok PN, Ruygrok PR, Soeller C, Cannell MB. Changes in the organization of excitation-contraction coupling structures in failing human heart. PloS One. 2011;6(3):e17901.

60. Guo A, Zhang C, Wei S, Chen B, Song L-S. Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure. Cardiovasc Res. 2013 May 1;98(2):204–15.
61. Louch WE, Mørk HK, Sexton J, Strømme TA, Laake P, Sjaastad I, et al. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca2+ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. J Physiol. 2006 Jul 15;574(Pt 2):519–33.
62. Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie Y-P, Zimmerman K, et al. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. Circ Res. 2010 Aug 20;107(4):520–31.
63. Michael G, Xiao L, Qi X-Y, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. Cardiovasc Res. 2009 Feb 15;81(3):491–9.
64. Armoundas AA, Wu R, Juang G, Marbán E, Tomaselli GF. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. Pharmacol Ther. 2001 Dec;92(2-3):213–30.
65. Bailly P, Bénitah JP, Mouchonière M, Vassort G, Lorente P. Regional alteration of the transient outward current in human left ventricular septum during compensated hypertrophy. Circulation. 1997 Aug 19;96(4):1266–74.
66. Gómez AM, Benitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P, Delgado C. Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. Am J Physiol. 1997 Mar;272(3 Pt 2):H1078–1086.
67. Perrier E, Kerfant B-G, Lalevee N, Bideaux P, Rossier MF, Richard S, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. Circulation. 2004 Aug 17;110(7):776–83.
68. Jeyaraj D, Wan X, Ficker E, Stelzer JE, Deschenes I, Liu H, et al. Ionic bases for electrical remodeling of the canine cardiac ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Aug;305(3):H410–419.
69. Perrier E, Perrier R, Richard S, Bénitah J-P. Ca2+ controls functional expression of the cardiac K+ transient outward current via the calcineurin pathway. J Biol Chem. 2004 Sep 24;279(39):40634–9.
70. Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gõmez AM, et al. "Ca(2+)-induced Ca(2+) entry" or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. Prog Biophys Mol Biol. 2006 Apr;90(1-3):118–35.
71. Bito V, Heinzel FR, Biesmans L, Antoons G, Sipido KR. Crosstalk between L-type Ca2+ channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling. Cardiovasc Res. 2008 Jan 15;77(2):315–24.
72. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, et al. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. Circulation. 2002 Sep 3;106(10):1288–93.
73. Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. Science. 1997 May 2;276(5313):800–6.
74. Gómez AM, Guatimosim S, Dilly KW, Vassort G, Lederer WJ. Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. Circulation. 2001 Aug 7;104(6):688–93.
75. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y-H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. Physiol Rev. 2007 Apr;87(2):425–56.
76. Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H. Calcium handling proteins in the failing human heart. Basic Res Cardiol. 1997;92 Suppl 1:87–93.
77. Kögler H, Schott P, Toischer K, Milting H, Van PN, Kohlhaas M, et al. Relevance of brain natriuretic peptide in preload-dependent regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase expression. Circulation. 2006 Jun 13;113(23):2724–32.
78. Sipido KR, Stankovicova T, Flameng W, Vanhaecke J, Verdonck F. Frequency dependence of Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum in human ventricular myocytes from end-stage heart failure. Cardiovasc Res. 1998 Feb;37(2):478–88.

79. Toischer K, Teucher N, Unsöld B, Kuhn M, Kögler H, Hasenfuss G. BNP controls early load-dependent regulation of SERCA through calcineurin. Basic Res Cardiol. 2010 Nov;105(6):795–804.
80. Toischer K, Kögler H, Tenderich G, Grebe C, Seidler T, Van PN, et al. Elevated afterload, neuroendocrine stimulation, and human heart failure increase BNP levels and inhibit preload-dependent SERCA upregulation. Circ Heart Fail. 2008 Nov;1(4):265–71.
81. Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, et al. Enhanced Ca(2+) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. Circulation. 2000 Oct 24;102(17):2137–44.
82. O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kääb S, Tunin R, Marbán E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. Circ Res. 1999 Mar 19;84(5):562–70.
83. Golden KL, Fan QI, Chen B, Ren J, O'Connor J, Marsh JD. Adrenergic stimulation regulates Na(+)/Ca(2+)Exchanger expression in rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2000 Apr;32(4):611–20.
84. Golden KL, Ren J, O'Connor J, Dean A, DiCarlo SE, Marsh JD. In vivo regulation of Na/Ca exchanger expression by adrenergic effectors. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Mar;280(3):H1376–1382.
85. Schillinger W, Schneider H, Minami K, Ferrari R, Hasenfuss G. Importance of sympathetic activation for the expression of Na+-Ca2+ exchanger in end-stage failing human myocardium. Eur Heart J. 2002 Jul;23(14):1118–24.
86. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell. 2000 May 12;101(4):365–76.
87. Eschenhagen T. Is ryanodine receptor phosphorylation key to the fight or flight response and heart failure? J Clin Invest. 2010 Dec;120(12):4197–203.
88. Fischer T, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, et al. CaMKII and PKA Differentially Regulate SR Ca2+-Leak in Human Cardiac Pathology. Circulation. 2013 Jul 19;
89. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, et al. Requirement for Ca2+/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. J Clin Invest. 2009 May;119(5):1230–40.
90. Wu Y, Luczak ED, Lee E-J, Hidalgo C, Yang J, Gao Z, et al. CaMKII effects on inotropic but not lusitropic force frequency responses require phospholamban. J Mol Cell Cardiol. 2012 Sep;53(3):429–36.
91. Carnicer R, Crabtree MJ, Sivakumaran V, Casadei B, Kass DA. Nitric oxide synthases in heart failure. Antioxid Redox Signal. 2013 Mar 20;18(9):1078–99.
92. Cutler MJ, Plummer BN, Wan X, Sun Q-A, Hess D, Liu H, et al. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Oct 30;109(44):18186–91.
93. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, Cassan C, Richard S, Matecki S, et al. Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 26;107(4):1559–64.
94. Gonzalez DR, Beigi F, Treuer AV, Hare JM. Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 18;104(51):20612–7.
95. Mørk HK, Sjaastad I, Sande JB, Periasamy M, Sejersted OM, Louch WE. Increased cardiomyocyte function and Ca2+ transients in mice during early congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2007 Aug;43(2):177–86.

96. Okayama H, Hamada M, Kawakami H, Ikeda S, Hashida H, Shigematsu Y, et al. Alterations in expression of sarcoplasmic reticulum gene in Dahl rats during the transition from compensatory myocardial hypertrophy to heart failure. J Hypertens. 1997 Dec;15(12 Pt 2):1767–74.
97. Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier J-M, Vassort G, Richard S. Ca2+-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? Cardiovasc Res. 2005 Nov 1;68(2):204–12.
98. Rubart M, Zipes DP. Mechanisms of sudden cardiac death. J Clin Invest. 2005 Sep;115(9):2305–15.
99. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. Heart. 2007 Sep 1;93(9):1137–46.
100. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci. 1981 Jan 5;28(1):89–94.
101. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature. 1988 Mar 3;332(6159):78–81.
102. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Apr 30;168(2):863–70.
103. Thibault G, Charbonneau C, Bilodeau J, Schiffrin EL, Garcia R. Rat brain natriuretic peptide is localized in atrial granules and released into the circulation. Am J Physiol. 1992 Aug;263(2 Pt 2):R301–309.
104. Suga S, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Yoshimasa T, et al. Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. Endocrinology. 1993 Dec;133(6):3038–41.
105. Winquist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F, Rapoport RM. Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Dec;81(23):7661–4.
106. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. Endocr Rev. 2006 Feb;27(1):47–72.
107. Chan JCY, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 18;102(3):785–90.
108. Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, Postnikov AB, Karpova NS, Serebryanaya DV, et al. Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. Clin Chem. 2010 Jul;56(7):1166–76.
109. Ichiki T, Boerrigter G, Huntley BK, Sangaralingham SJ, McKie PM, Harty GJ, et al. Differential expression of the pro-natriuretic peptide convertases corin and furin in experimental heart failure and atrial fibrosis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Jan 15;304(2):R102–109.
110. Sawada Y, Inoue M, Kanda T, Sakamaki T, Tanaka S, Minamino N, et al. Co-elevation of brain natriuretic peptide and proprotein-processing endoprotease furin after myocardial infarction in rats. FEBS Lett. 1997 Jan 3;400(2):177–82.
111. McGrath MF, de Bold MLK, de Bold AJ. The endocrine function of the heart. Trends Endocrinol Metab TEM. 2005 Dec;16(10):469–77.
112. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):4239–44.
113. Potter LR, Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. J Biol Chem. 1994 May 20;269(20):14636–42.
114. Fortin Y, De Léan A. Role of cyclic GMP and calcineurin in homologous and heterologous desensitization of natriuretic peptide receptor-A. Can J Physiol Pharmacol. 2006 May;84(5):539–46.

115. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 23;94(26):14730–5.
116. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Kanmatsuse K, Furuya K. Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. Circ Res. 2000 Apr 28;86(8):841–5.
117. Tsuji T, Kunieda T. A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (Npr2) gene is responsible for disproportionate dwarfism in cn/cn mouse. J Biol Chem. 2005 Apr 8;280(14):14288–92.
118. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, et al. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4016–21.
119. Bartels CF, Bükülmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, et al. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. Am J Hum Genet. 2004 Jul;75(1):27–34.
120. Potter LR. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization. Biochemistry (Mosc). 1998 Feb 24;37(8):2422–9.
121. Potthast R, Abbey-Hosch SE, Antos LK, Marchant JS, Kuhn M, Potter LR. Calcium-dependent dephosphorylation mediates the hyperosmotic and lysophosphatidic acid-dependent inhibition of natriuretic peptide receptor-B/guanylyl cyclase-B. J Biol Chem. 2004 Nov 19;279(47):48513–9.
122. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. J Cell Sci. 2000 May;113 (Pt 10):1671–6.
123. Takimoto E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. Circ J Off J Jpn Circ Soc. 2012;76(8):1819–25.
124. Layland J, Li J-M, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. J Physiol. 2002 Apr 15;540(Pt 2):457–67.
125. Wegener JW, Nawrath H, Wolfsgruber W, Kühbandner S, Werner C, Hofmann F, et al. cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. Circ Res. 2002 Jan 11;90(1):18–20.
126. Hammond J, Balligand J-L. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: From contractility to remodeling. J Mol Cell Cardiol. 2012 février;52(2):330–40.
127. Miao L, Wang M, Yin W-X, Yuan Q, Chen Y-X, Fleischmann B, et al. Atrial natriuretic peptide regulates Ca channel in early developmental cardiomyocytes. PloS One. 2010;5(1):e8847.
128. Qvigstad E, Moltzau LR, Aronsen JM, Nguyen CHT, Hougen K, Sjaastad I, et al. Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. Cardiovasc Res. 2010 Mar 1;85(4):763–72.
129. Mokni W, Keravis T, Etienne-Selloum N, Walter A, Kane MO, Schini-Kerth VB, et al. Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. PloS One. 2010;5(12):e14227.
130. Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. Endocrinology. 2007 Jul;148(7):3518–22.

131. Dickey DM, Dries DL, Margulies KB, Potter LR. Guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B activities in ventricles and cardiomyocytes from failed and non-failed human hearts: GC-A is inactive in the failed cardiomyocyte. J Mol Cell Cardiol. 2012 Mar;52(3):727–32.
132. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 22;96(13):7403–8.
133. Azer J, Hua R, Vella K, Rose RA. Natriuretic peptides regulate heart rate and sinoatrial node function by activating multiple natriuretic peptide receptors. J Mol Cell Cardiol. 2012 Nov;53(5):715–24.
134. Moro C, Lafontan M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Feb 1;304(3):H358–368.
135. Burger AJ. A review of the renal and neurohormonal effects of B-type natriuretic peptide. Congest Heart Fail Greenwich Conn. 2005 Feb;11(1):30–8.
136. Herring N, Zaman JA, Paterson DJ. Natriuretic peptides like NO facilitate cardiac vagal neurotransmission and bradycardia via a cGMP pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Dec;281(6):H2318–2327.
137. Thomas CJ, Head GA, Woods RL. Similar baroreflex bradycardic actions of atrial natriuretic peptide and B and C types of natriuretic peptides in conscious rats. J Hypertens. 1999 Jun;17(6):801–6.
138. Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. Circulation. 1991 Oct;84(4):1581–8.
139. Lainchbury JG, Burnett JC Jr, Meyer D, Redfield MM. Effects of natriuretic peptides on load and myocardial function in normal and heart failure dogs. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 Jan;278(1):H33–40.
140. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, et al. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. Circ Res. 2004 Mar 5;94(4):453–61.
141. Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, et al. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. Circulation. 2004 Nov 23;110(21):3306–12.
142. Jacob M, Saller T, Chappell D, Rehm M, Welsch U, Becker BF. Physiological levels of A-, B- and C-type natriuretic peptide shed the endothelial glycocalyx and enhance vascular permeability. Basic Res Cardiol. 2013;108(3):347.
143. Glezeva N, Collier P, Voon V, Ledwidge M, McDonald K, Watson C, et al. Attenuation of monocyte chemotaxis--a novel anti-inflammatory mechanism of action for the cardio-protective hormone B-type natriuretic peptide. J Cardiovasc Transl Res. 2013 Aug;6(4):545–57.
144. Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, et al. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. J Biol Chem. 2010 Apr 23;285(17):13244–53.
145. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jian Z, Rong X, Kiyonaka S, et al. Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. Circ Res. 2010 Jun 25;106(12):1849–60.
146. Koitabashi N, Aiba T, Hesketh GG, Rowell J, Zhang M, Takimoto E, et al. Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte

NFAT activation: Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. J Mol Cell Cardiol. 2010 avril;48(4):713–24.
147. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. Nat Med. 2005 Feb;11(2):214–22.
148. Neeland IJ, Drazner MH, Berry JD, Ayers CR, deFilippi C, Seliger SL, et al. Biomarkers of chronic cardiac injury and hemodynamic stress identify a malignant phenotype of left ventricular hypertrophy in the general population. J Am Coll Cardiol. 2013 Jan 15;61(2):187–95.
149. Costello-Boerrigter LC, Boerrigter G, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Urban LH, Mahoney DW, et al. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide in the general community: determinants and detection of left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2006 Jan 17;47(2):345–53.
150. Springer J, Azer J, Hua R, Robbins C, Adamczyk A, McBoyle S, et al. The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stimulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. J Mol Cell Cardiol. 2012 May;52(5):1122–34.
151. Sodi R, Dubuis E, Shenkin A, Hart G. B-type natriuretic peptide (BNP) attenuates the L-type calcium current and regulates ventricular myocyte function. Regul Pept. 2008 Nov 29;151(1-3):95–105.
152. Fares N, Nader L, Saliba Y, Aftimos G, Gebara V. B-type natriuretic peptide modulates the action potential and the L-type calcium current in adult rat heart muscle cells. J Méd Liban Leban Med J. 2010 Dec;58(4):222–7.
153. Thibault G, Amiri F, Garcia R. Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. Annu Rev Physiol. 1999;61:193–217.
154. Vuolteenaho O, Ala-Kopsala M, Ruskoaho H. BNP as a biomarker in heart disease. Adv Clin Chem. 2005;40:1–36.
155. Azizi C, Carayon A, Masson F, Noé E, Barthelemy C, Eurin J, et al. Mechanisms of isoproterenol-induced atrial natriuretic peptide release from superfused rabbit atria. Am J Physiol. 1993 Oct;265(4 Pt 2):H1283–1288.
156. Azizi C, Barthélemy C, Masson F, Maistre G, Eurin J, Carayon A. Myocardial production of prostaglandins: its role in atrial natriuretic peptide release. Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc. 1995 Aug;133(2):255–9.
157. Irons CE, Sei CA, Hidaka H, Glembotski CC. Protein kinase C and calmodulin kinase are required for endothelin-stimulated atrial natriuretic factor secretion from primary atrial myocytes. J Biol Chem. 1992 Mar 15;267(8):5211–6.
158. McDonough PM, Stella SL, Glembotski CC. Involvement of cytoplasmic calcium and protein kinases in the regulation of atrial natriuretic factor secretion by contraction rate and endothelin. J Biol Chem. 1994 Apr 1;269(13):9466–72.
159. Laine M, Weckström M, Vuolteenaho O, Arjamaa O. Effect of ryanodine on atrial natriuretic peptide secretion by contracting and quiescent rat atrium. Pflüg Arch Eur J Physiol. 1994 Feb;426(3-4):276–83.
160. Doubell AF, Thibault G. Calcium is involved in both positive and negative modulation of the secretory system for ANP. Am J Physiol. 1994 May;266(5 Pt 2):H1854–1863.
161. Laine M, Id L, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Weckström M. Role of calcium in stretch-induced release and mRNA synthesis of natriuretic peptides in isolated rat atrium. Pflüg Arch Eur J Physiol. 1996 Oct;432(6):953–60.

162. Suzuki E, Hirata Y, Kohmoto O, Sugimoto T, Hayakawa H, Matsuoka H, et al. Cellular mechanisms for synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cultured rat atrial cells. Circ Res. 1992 Nov;71(5):1039–48.
163. De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med. 2001 Oct 4;345(14):1014–21.
164. Harrison A, Morrison LK, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Dao Q, et al. B-type natriuretic peptide predicts future cardiac events in patients presenting to the emergency department with dyspnea. Ann Emerg Med. 2002 Feb;39(2):131–8.
165. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, et al. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. Circulation. 1997 Jul 15;96(2):509–16.
166. Cohen-Solal A, Logeart D, Huang B, Cai D, Nieminen MS, Mebazaa A. Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure. J Am Coll Cardiol. 2009 Jun 23;53(25):2343–8.
167. D'Amato R, Tomberli B, Castelli G, Spoladore R, Girolami F, Fornaro A, et al. Prognostic Value of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide in Outpatients With Hypertrophic Cardiomyopathy. Am J Cardiol. 2013 Oct 15;112(8):1190–6.
168. Gill D, Seidler T, Troughton RW, Yandle TG, Frampton CM, Richards M, et al. Vigorous response in plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-BNP) to acute myocardial infarction. Clin Sci Lond Engl 1979. 2004 Feb;106(2):135–9.
169. Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Mizuno Y, Harada E, Ito T, et al. Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic marker after acute myocardial infarction: a long-term follow-up analysis. Circulation. 2004 Sep 14;110(11):1387–91.
170. Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD, et al. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. N Engl J Med. 2000 Jul 27;343(4):246–53.
171. Chen HH, Martin FL, Gibbons RJ, Schirger JA, Wright RS, Schears RM, et al. Low-dose nesiritide in human anterior myocardial infarction suppresses aldosterone and preserves ventricular function and structure: a proof of concept study. Heart Br Card Soc. 2009 Aug;95(16):1315–9.
172. Silver MA, Horton DP, Ghali JK, Elkayam U. Effect of nesiritide versus dobutamine on short-term outcomes in the treatment of patients with acutely decompensated heart failure. J Am Coll Cardiol. 2002 Mar 6;39(5):798–803.
173. Burger AJ, Horton DP, LeJemtel T, Ghali JK, Torre G, Dennish G, et al. Effect of nesiritide (B-type natriuretic peptide) and dobutamine on ventricular arrhythmias in the treatment of patients with acutely decompensated congestive heart failure: the PRECEDENT study. Am Heart J. 2002 Dec;144(6):1102–8.
174. Mentzer RM Jr, Oz MC, Sladen RN, Graeve AH, Hebeler RF Jr, Luber JM Jr, et al. Effects of perioperative nesiritide in patients with left ventricular dysfunction undergoing cardiac surgery:the NAPA Trial. J Am Coll Cardiol. 2007 Feb 13;49(6):716–26.
175. O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, Armstrong PW, Dickstein K, Hasselblad V, et al. Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. N Engl J Med. 2011 Jul 7;365(1):32–43.

176. Reed SD, Kaul P, Li Y, Eapen ZJ, Davidson-Ray L, Schulman KA, et al. Medical resource use, costs, and quality of life in patients with acute decompensated heart failure: findings from ASCEND-HF. J Card Fail. 2013 Sep;19(9):611–20.
177. Abraham WT, Lowes BD, Ferguson DA, Odom J, Kim JK, Robertson AD, et al. Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. J Card Fail. 1998 Mar;4(1):37–44.
178. Aronson D, Burger AJ. Effect of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) and dobutamine on heart rate variability in decompensated heart failure. Am Heart J. 2004 Nov;148(5):e16.
179. La Villa G, Bisi G, Lazzeri C, Fronzaroli C, Stefani L, Barletta G, et al. Cardiovascular effects of brain natriuretic peptide in essential hypertension. Hypertension. 1995 May;25(5):1053–7.
180. Chan NY-K, Seyedi N, Takano K, Levi R. An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition. Circulation. 2012 Jan 17;125(2):298–307.
181. Chan NY-K, Robador PA, Levi R. Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H3 and H4 receptor activation. J Pharmacol Exp Ther. 2012 Dec;343(3):568–77.
182. Movsesian MA, Smith CJ, Krall J, Bristow MR, Manganiello VC. Sarcoplasmic reticulum-associated cyclic adenosine 5'-monophosphate phosphodiesterase activity in normal and failing human hearts. J Clin Invest. 1991 Jul;88(1):15–9.
183. Afzal F, Qvigstad E, Aronsen JM, Moltzau LR, Sjaastad I, Skomedal T, et al. Agents increasing cyclic GMP amplify 5-HT4-elicited positive inotropic response in failing rat cardiac ventricle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2011 Dec;384(6):543–53.
184. Brattelid T, Qvigstad E, Birkeland JAK, Swift F, Bekkevold SVS, Krobert KA, et al. Serotonin responsiveness through 5-HT2A and 5-HT4 receptors is differentially regulated in hypertrophic and failing rat cardiac ventricle. J Mol Cell Cardiol. 2007 Dec;43(6):767–79.
185. Gyurko R, Kuhlencordt P, Fishman MC, Huang PL. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 Mar;278(3):H971–981.
186. Hare JM, Givertz MM, Creager MA, Colucci WS. Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of beta-adrenergic inotropic responsiveness. Circulation. 1998 Jan 20;97(2):161–6.
187. Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung Y-F, Dostmann WR, et al. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. Circ Res. 2006 Feb 3;98(2):226–34.
188. Shan X, Quaile MP, Monk JK, French B, Cappola TP, Margulies KB. Differential expression of PDE5 in failing and nonfailing human myocardium. Circ Heart Fail. 2012 Jan;5(1):79–86.
189. Anand-Srivastava MB, Sehl PD, Lowe DG. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. J Biol Chem. 1996 Aug 9;271(32):19324–9.
190. Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JG, Grider JR, Makhlouf GM. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000 Jun;278(6):G974–980.
191. Rose RA, Lomax AE, Giles WR. Inhibition of L-type Ca2+ current by C-type natriuretic peptide in bullfrog atrial myocytes: an NPR-C-mediated effect. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Dec;285(6):H2454–2462.

192. Rose RA, Lomax AE, Kondo CS, Anand-Srivastava MB, Giles WR. Effects of C-type natriuretic peptide on ionic currents in mouse sinoatrial node: a role for the NPR-C receptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 May;286(5):H1970–1977.
193. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. Physiol Genomics. 2004 Feb 13;16(3):349–60.
194. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. Physiol Genomics. 2004 Feb 13;16(3):349–60.
195. Kramer K, van Acker SA, Voss HP, Grimbergen JA, van der Vijgh WJ, Bast A. Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. J Pharmacol Toxicol Methods. 1993 Dec;30(4):209–15.
196. Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. Exp Physiol. 2008 Jan;93(1):83–94.
197. Wolska BM, Solaro RJ. Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. Am J Physiol. 1996 Sep;271(3 Pt 2):H1250–1255.
198. Pereira L, Matthes J, Schuster I, Valdivia HH, Herzig S, Richard S, et al. Mechanisms of [Ca2+]i transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. Diabetes. 2006 Mar;55(3):608–15.
199. Ostap EM. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. J Muscle Res Cell Motil. 2002;23(4):305–8.
200. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Sep;293(3):C1073–1081.
201. Kinnunen P, Vuolteenaho O, Uusimaa P, Ruskoaho H. Passive mechanical stretch releases atrial natriuretic peptide from rat ventricular myocardium. Circ Res. 1992 Jun;70(6):1244–53.
202. Vrtovec B, Knezevic I, Poglajen G, Sebestjen M, Okrajsek R, Haddad F. Relation of B-type natriuretic peptide level in heart failure to sudden cardiac death in patients with and without QT interval prolongation. Am J Cardiol. 2013 Mar 15;111(6):886–90.
203. Hartmann F, Packer M, Coats AJS, Fowler MB, Krum H, Mohacsi P, et al. Prognostic impact of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe chronic congestive heart failure: a substudy of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial. Circulation. 2004 Sep 28;110(13):1780–6.
204. Fujimura M, Akaike M, Iwase T, Yoshida S, Sumitomo Y, Yagi S, et al. Decrease in plasma brain natriuretic peptide level in the early phase after the start of carvedilol therapy is a novel predictor of long-term outcome in patients with chronic heart failure. Acta Cardiol. 2009 Oct;64(5):589–95.
205. George I, Sabbah HN, Xu K, Wang N, Wang J. β-adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. Cardiovasc Res. 2011 Aug 1;91(3):447–55.
206. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, et al. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. J Biol Chem. 2003 Jan 3;278(1):444–53.
207. Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. Circulation. 1990 Feb;81(2 Suppl):III21–32.

208. Ono K, Yano M, Ohkusa T, Kohno M, Hisaoka T, Tanigawa T, et al. Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) release in heart failure. Cardiovasc Res. 2000 Nov;48(2):323–31.
209. Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, Völkers M, Heierhorst J, et al. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. Circulation. 2006 Sep 19;114(12):1258–68.
210. Kiewitz R, Acklin C, Schäfer BW, Maco B, Uhrík B, Wuytack F, et al. Ca2+ -dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca2+ -ATPase2a and phospholamban in the human heart. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 27;306(2):550–7.
211. Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittköpper K, Seppelt D, Dewenter M, et al. Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts β-Adrenergic Responses in Cardiomyocytes. J Am Coll Cardiol. 2013 Oct 22;62(17):1596–606.
212. WRITING GROUP MEMBERS, Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2010 Feb 23;121(7):e46–e215.
213. Puymirat E, Simon T, Steg PG, Schiele F, Guéret P, Blanchard D, et al. Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. JAMA J Am Med Assoc. 2012 Sep 12;308(10):998–1006.
214. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? Circulation. 2004 Apr 6;109(13):1580–9.
215. Parati G, Mancia G, Di Rienzo M, Castiglioni P. Point: cardiovascular variability is/is not an index of autonomic control of circulation. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2006 Aug;101(2):676–678; discussion 681–682.
216. Kato M, Komatsu T, Kimura T, Sugiyama F, Nakashima K, Shimada Y. Spectral analysis of heart rate variability during isoflurane anesthesia. Anesthesiology. 1992 Oct;77(4):669–74.
217. Galletly DC, Westenberg AM, Robinson BJ, Corfiatis T. Effect of halothane, isoflurane and fentanyl on spectral components of heart rate variability. Br J Anaesth. 1994 Feb;72(2):177–80.
218. Terrar DA, Victory JG. Isoflurane depresses membrane currents associated with contraction in myocytes isolated from guinea-pig ventricle. Anesthesiology. 1988 Nov;69(5):742–9.
219. Davies LA, Gibson CN, Boyett MR, Hopkins PM, Harrison SM. Effects of isoflurane, sevoflurane, and halothane on myofilament Ca2+ sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca2+ release in rat ventricular myocytes. Anesthesiology. 2000 Oct;93(4):1034–44.
220. Jiang Y, Julian FJ. Effects of isoflurane on [Ca2+]i, SR Ca2+ content, and twitch force in intact trabeculae. Am J Physiol. 1998 Oct;275(4 Pt 2):H1360–1369.
221. Bosnjak ZJ, Aggarwal A, Turner LA, Kampine JM, Kampine JP. Differential effects of halothane, enflurane, and isoflurane on Ca2+ transients and papillary muscle tension in guinea pigs. Anesthesiology. 1992 Jan;76(1):123–31.
222. Ding W, Li Z, Shen X, Martin J, King SB, Sivakumaran V, et al. Reversal of isoflurane-induced depression of myocardial contraction by nitroxyl via myofilament sensitization to Ca2+. J Pharmacol Exp Ther. 2011 Dec;339(3):825–31.
223. Leon LR, Walker LD, DuBose DA, Stephenson LA. Biotelemetry transmitter implantation in rodents: impact on growth and circadian rhythms. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 May;286(5):R967–974.
224. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. J Clin Invest. 2000 Jul;106(1):55–62.

225. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2009 Feb 15;81(3):457–64.
226. Huang BS, Ahmad M, Tan J, Leenen FHH. Sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction post-MI: different impact of specific CNS versus general AT1 receptor blockade. J Mol Cell Cardiol. 2007 Oct;43(4):479–86.
227. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2013 Jan 3;12(1):101–13.
228. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. Cell. 1998 Apr 17;93(2):215–28.
229. Semsarian C, Ahmad I, Giewat M, Georgakopoulos D, Schmitt JP, McConnell BK, et al. The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. J Clin Invest. 2002 Apr;109(8):1013–20.
230. McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. Cardiovasc Res. 2004 Aug 1;63(2):283–92.
231. Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C, Nargeot J. Ca2+ currents in compensated hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res. 1998 Feb;37(2):300–11.
232. Soliman EZ, Howard G, Cushman M, Kissela B, Kleindorfer D, Le A, et al. Prolongation of QTc and risk of stroke: The REGARDS (REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke) study. J Am Coll Cardiol. 2012 Apr 17;59(16):1460–7.
233. Panikkath R, Reinier K, Uy-Evanado A, Teodorescu C, Gunson K, Jui J, et al. Electrocardiographic predictors of sudden cardiac death in patients with left ventricular hypertrophy. Ann Noninvasive Electrocardiol Off J Int Soc Holter Noninvasive Electrocardiol Inc. 2013 May;18(3):225–9.
234. Muth JN, Bodi I, Lewis W, Varadi G, Schwartz A. A Ca(2+)-dependent transgenic model of cardiac hypertrophy: A role for protein kinase Calpha. Circulation. 2001 Jan 2;103(1):140–7.
235. Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. Circulation. 1993 Feb;87(2):454–63.
236. Scalvini S, Volterrani M, Zanelli E, Pagani M, Mazzuero G, Coats AJ, et al. Is heart rate variability a reliable method to assess autonomic modulation in left ventricular dysfunction and heart failure? Assessment of autonomic modulation with heart rate variability. Int J Cardiol. 1998 Nov 30;67(1):9–17.
237. Thireau J, Karam S, Fauconnier J, Roberge S, Cassan C, Cazorla O, et al. Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. Cardiovasc Res. 2012 Jul 1;95(1):59–68.
238. Ohte N, Cheng CP, Suzuki M, Little WC. Effects of atrial natriuretic peptide on left ventricular performance in conscious dogs before and after pacing-induced heart failure. J Pharmacol Exp Ther. 1999 Nov;291(2):589–95.
239. Neyses L, Vetter H. Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Sep 29;163(3):1435–43.
240. Tajima M, Bartunek J, Weinberg EO, Ito N, Lorell BH. Atrial natriuretic peptide has different effects on contractility and intracellular pH in normal and hypertrophied myocytes from pressure-overloaded hearts. Circulation. 1998 Dec 15;98(24):2760–4.
241. Aye T-T, Soni S, van Veen TAB, van der Heyden MAG, Cappadona S, Varro A, et al. Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. J Mol Cell Cardiol. 2012 Feb;52(2):511–8.

242. Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayrard S, Geny B, et al. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. Basic Res Cardiol. 2013 Nov;108(6):389.
243. Sun J, Aponte AM, Kohr MJ, Tong G, Steenbergen C, Murphy E. Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-nitros(yl)ation versus sGC/cGMP/PKG signaling? Free Radic Biol Med. 2013 Jan;54:105–12.
244. André L, Gouzi F, Thireau J, Meyer G, Boissiere J, Delage M, et al. Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. Basic Res Cardiol. 2011 Nov;106(6):1235–46.
245. Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marbán E, Balligand JL, et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca2+ release in cardiomyocytes. Nat Cell Biol. 2001 Oct;3(10):867–73.
246. Ren B, Shen Y, Shao H, Qian J, Wu H, Jing H. Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 2007 Feb;377(1-2):83–7.
247. Das A, Salloum FN, Xi L, Rao YJ, Kukreja RC. ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 May;296(5):H1236–1243.
248. Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 and retargeting of subcellular cGMP signaling during pathological hypertrophy. Circulation. 2012 Aug 21;126(8):916–9.
249. Shibazaki K, Kimura K, Fujii S, Sakai K, Iguchi Y. Brain natriuretic peptide levels as a predictor for new atrial fibrillation during hospitalization in patients with acute ischemic stroke. Am J Cardiol. 2012 May 1;109(9):1303–7.
250. Simon T, Becker R, Voss F, Bikou O, Hauck M, Licka M, et al. Elevated B-type natriuretic peptide levels in patients with nonischemic cardiomyopathy predict occurrence of arrhythmic events. Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc. 2008 May;97(5):306–9.
251. Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao R-P, et al. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca2+/calmodulin kinase signaling pathway. Circ Res. 2004 Oct 15;95(8):798–806.
252. Gomez N, Matheeussen V, Damoiseaux C, Tamborini A, Merveille AC, Jespers P, et al. Effect of heart failure on dipeptidyl peptidase IV activity in plasma of dogs. J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med. 2012 Aug;26(4):929–34.
253. Gomez N, Touihri K, Matheeussen V, Mendes Da Costa A, Mahmoudabady M, Mathieu M, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves cardiorenal function in overpacing-induced heart failure. Eur J Heart Fail. 2012 Jan;14(1):14–21.
254. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Harty GJ, Lapp H, Burnett JC Jr. Des-serine-proline brain natriuretic peptide 3-32 in cardiorenal regulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 Feb;292(2):R897–901.

ANNEXE

*Manuscript

Beta-adrenergic blockade combined with subcutaneous B-type natriuretic peptide: A promising strategy in heart failure?

Brief titled: Novel therapeutic concept against cardiac remodeling and arrhythmia

Jérôme Thireau[*], Sarah Karam[*]†, Stéphanie Roberge[*]†, Julien Roussel[*], Cécile Cassan[*], Arnaud Gac‡, Dominique Babuty§, Jean-Yves Le Guennec[*], Alain Lacampagne[*], Jérémy Fauconnier[*], Sylvain Richard[*]||

[*] Inserm U1046, *Physiologie & Médecine Expérimentale, Cœur et Muscles*, Université Montpellier-1 & 2, Montpellier, France.
‡ ADInstruments Limited, Oxford OX4 6HD, UK
§ Hôpital Trousseau, Tours, France.

† *Equal contribution.*

|| **Corresponding author:** Dr. Sylvain Richard

Inserm U1046, Physiologie & Médecine Expérimentale, Cœur et Muscles
CHU Arnaud de Villeneuve, 371 avenue doyen G. Giraud, 34295 Montpellier

Phone: (33) (0) 4.67.41.52.40
Fax: (33) (0) 4.67.41.52.42
E-mail:sylvain.richard@inserm.fr

Words number: 5495 words

Abstract

Aims. Clinical studies failed to prove convincing efficiency of *intravenous* infusion of neseritide during heart failure. However, *subcutaneous* BNP therapy was recently proposed, thus raising new perspectives over what was considered as a promising treatment. We tested the efficiency of a therapy combining oral β1-adrenergic receptor blocker metoprolol and *subcutaneous* B-type natriuretic peptide (BNP) infusion in decompensated heart failure. **Methods and Results.** The effects of the bi-therapy were studied on cardiac remodeling, excitation-contraction coupling and arrhythmias in an experimental mouse model of *ischemic heart failure* following post-myocardial infarction. We determined the cellular and molecular mechanisms involved in the anti-remodeling and anti-arrhythmic actions. As major findings, the combination therapy was more effective than metoprolol alone in reversing cardiac remodeling and preventing ventricular arrhythmia. The bi-therapy improved cardiac function, reduced hypertrophy and fibrosis, and corrected the heart rate, the sympatho-vagal balance (LF/HF) and ECG parameters (PR, QRS, QTc intervals). It also improved altered Ca^{2+} cycling by normalizing Ca^{2+}-handling protein levels (S100A1, SERCA2A, RyR2), and prevented pro-arrhythmogenic Ca^{2+} waves derived from abnormal Ca^{2+} sparks in single ventricular cardiomyocytes. Altogether these effects accounted for decreased occurrence of ventricular arrhythmias. Importantly, the anti-arrhythmic benefits were long-lasting due to a persistent anti-remodeling effect independent of heart rate and hemodynamic changes. **Conclusion.** Breaking the deleterious loop linking BNP and sympathetic overdrive in heart failure unmasks the efficiency of BNP against deleterious damages in heart failure and brings a new potential therapy against heart failure. Combined treatment appeared to be more effective than monotherapy with metoprolol alone.

Key Words: Remodeling, arrhythmias, calcium, natriuretic peptide

1. Introduction

A major source of preventable cardiac death in heart failure patients is the occurrence of ventricular arrhythmias (VAs), that can be triggered following alterations of Ca^{2+} homeostasis and ventricular remodeling [1-4]. Such modifications involve neurohormonal imbalances, including chronic adrenergic overactivation and release of B-type natriuretic peptide (BNP) [5-7]. We recently showed that high blood BNP levels promote Ca^{2+}-dependent VAs *via* a mechanism implicating overactivation of the adrenergic pathway [8]. Consistent with these findings, and despite the favorable hemodynamic effects of BNP in acute decompensated heart failure due to its natriuretic and vasorelaxant effects [9], the clinical advantages of the use of recombinant *intravenous* BNP nesiritide are subject to debate since no substantial beneficial effect was reported [10]. Some meta-analyses quite highlighted an increased short-term risk of death or impaired renal function in acute decompensated heart failure after BNP treatment [11-13]. One explanation could be that BNP further compromises autonomic regulation in heart failure patients when intravenously infused at high doses [14, 15]. In line, BNP also presents pro-adrenergic action [8, 16, 17].

A therapy based on chronic *subcutaneous* BNP administration has recently yielded promising results by improving cardiac function in systolic heart failure [18]. We thus aimed to determine whether a treatment combining a selective β1-adrenergic blocker (BB), a first-line treatment effective to prevent the long-term secondary effects of myocardial infarction (MI) [19, 20], with *subcutaneous* BNP could be a promising strategy in decompensated heart failure. This combination could associate (1) the efficiency of the main anti-arrhythmic drug therapy in use, in particular in post-myocardial ischemic heart failure with a reduced LV ejection fraction but no signs of hypertension[21] and (2) potentially unmask the highly beneficial effect of BNP infusion such as antifibrotic, antiapoptotic and antihypertrophic properties by abolishing the deleterious adrenergic effects associated with BNP[22, 23].

We tested the efficiency of a dual therapy combining an oral dose of β1-adrenergic receptor blocker metoprolol and *subcutaneous* application of BNP in a mouse model of decompensated heart failure. We investigated the cellular and molecular mechanisms involved in the anti-remodeling and anti-arrhythmic actions following post-myocardial infarction. The results showed that the combination therapy was more effective than metoprolol alone in reversing cardiac remodeling and preventing VAs, with better benefits on cardiac morphology and function, and better normalization of intracellular Ca^{2+} sparks and spontaneous Ca^{2+} waves involved in VAs.

2. Materials and Methods

Supplementary file for methods is available online.

2.1 Study design

All procedures conformed to European Parliament Directive 2010/63/EU and 22 September 2010 Council on the protection of animals, and were approved by our institutional animal research committee (N° CE-LR-0714). Seven-week-old male C57Bl/6 mice (Janvier, France) were randomly assigned to the following groups: 1) post-myocardial infarction mice (PMI); 2) PMI mice treated with BNP (BNP-PMI); 3) PMI mice treated with metoprolol (BB-PMI); 4) PMI mice treated with metoprolol and BNP (BB-BNP-PMI) and 5) sham-operated mice (Shams). For PMI, a left thoracotomy was performed under anesthesia and cardiac monitoring (2% isoflurane/O2, Aerrane®, Baxter, France). The artery was ligated 1-2 mm beyond its point of emergence from the top of the left atrium, using an 8-0 suture. A subcutaneous injection of 0.01 ml buprenorphine solution (0.3mg.ml-1) was administered for post-operative analgesia as previously described[8, 24]. Only animals surviving at day-5 post surgery were included in the study. Metoprolol (Sigma-Aldrich, 100 $mg.kg^{-1}.day.^{-1}$) was administered in the drinking water[8]. The mouse BNP (Ref. 14-5-30A, American Peptide, USA) was subcutaneously administered at

0.03 μg.kg^{-1}.min^{-1} for 14 days using Alzet 1002 osmotic pumps[8]. Following *in vivo* investigations, the heart was explanted after cervical dislocation for single-cell experiments. The time sequence of the protocol is available in the on-line supplement (**Fig. S1**).

2.2 *In vivo* analysis

Cardiac function was assessed by echocardiography (Vivid7Pro, GE Medical Systems, USA). LV mass (LVM), LV shortening fraction (SF), end-diastolic and end-systolic LV dimensions (LVEDd and LVEDs) were measured[25]. Telemetric electrocardiograms (ECGs) were recorded (DSI, St. Paul, MN)[25] and analyzed in respect of the Lambeth conventions. Heart rate variability (HRV), PR, QRS, corrected QT (QTc) intervals and arrhythmias were analyzed using 12h nocturnal ECGs (ECG-auto, EMKA Technologies, France) [26]. To assess the variability of the ventricular repolarization (an index of proarrhythmic outcome), we evaluated the QT interval variability [27]. To test the contribution of anti-remodeling effect of treatments on arrhythmogenic susceptibility, the β-adrenergic catecholamine isoproterenol was injected 4 weeks after the end of the treatment periods. The triggering of sustained ventricular tachycardia (SVT) was monitored. Systolic (sBP), diastolic (dBP) and mean arterial blood pressure (MAP, in mmHg) were measured with a tail cuff and pulse transducer (ML125/M NIBP System, ADInstruments, UK). Measurements were performed in triplicate in conscious mice after an acclimatization period of 3 weeks.

2.3 Autopsy and heart excision

Autopsies were performed to verify pleural effusion. The heart and lungs were excised and weighed, and the heart weight index (HWI) determined (heart weight/body weight). Lung congestion was established when lungs weight exceeded that of WT animals ±2 SD [26]. Interstitial fibrosis was measured in 10 μm thick transverse sections of hearts in the peri-infarcted area

(Hematoxylin-eosin and Sirius red staining). Results indicated the area of Sirius red-stained tissue (percentage of total area of myocardial tissue).

2.4 RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted from 25 mg of LV tissue using TRIzol reagent (Euromedex, France), and treated with DNase I at 37 °C for 30 min. cDNA was synthesized using superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, France). RT-qPCR was performed for myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) and serum response factor (SRF) in duplicate (LightCycler , Roche, France). Data were normalized to GAPDH (8 mice/group).

2.5 Ca^{2+} handling

Experiments were performed on freshly isolated left ventricular (LV) myocytes [8]. To monitor intracellular free Ca^{2+}, cardiomyocytes were loaded with Indo-1AM (10 µM, Invitrogen, France) and field-stimulated at 1.0 Hz with 1-ms current pulses (IonOptix system, Hilton, USA) [25]. Ca^{2+} fluorescence was measured during a 30 s pacing period, followed by a 30 s rest period. Diastolic Ca^{2+} level, Ca^{2+} transient decay time (t) and the number of cells developing spontaneous irregular Ca^{2+} waves were quantified during the rest period [25]. Ca^{2+} sparks were recorded in quiescent cells (Fluo-4AM, 5 µM, 1.5 ms/line; LSM510 Zeiss confocal microscope, 63X water-immersion objective, NA: 1.2) at 25°C [25]. Cell volume was estimated using Z-stack (x-y projection, front view) image acquisition [8]. Data were analyzed using *ImageJ* and *SparkMaster*.

2.6 Ca^{2+} handling proteins

LV were homogenized into lysis buffer (20 mM HEPES pH7.4, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 0.3% CHAPS, 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 1 mM EDTA). Lysates were centrifugated (6,000 x g, 5 min). Proteins were quantified with DC Protein Assay (Bio-Rad).

Fifty micrograms of total proteins were loaded on SDS-PAGE. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membranes were blocked (Thermoscientific) and incubated with primary antibodies at 4°C overnight: sarcoplasmique reticulum $Ca2^{+}$-ATPase SERCA2a (1:5,000) (A010-20, Badrilla, UK), Na^{+}-Ca^{2+} exchanger NCX1 (1:1,000) (R3F1, Swant), ryanodine receptor RyR2 (1:1,000) (Covalab, France) and its phosphorylated form, PhosphoSer2808-RyR-2 (1:1,000) (A010-30, Badrilla), phospholamban (1:20,000) (A010-14, Badrilla) and its phosphorylated form PhosphoSer16-PLB (1:5,000) (A010-12, Badrilla), and Ca^{2+}-binding protein S100A1 (1:2,500) (SP5355P, Acris antibodies GmbH, Germany). Protein levels were expressed relative to GAPDH (1:60,000, ab8245, Abcam, France). The membranes were then incubated with secondary antibody: anti-rabbit 800 nm (1:30,000) (for SERCA2a, PhosphoPLB, RyR2, PhosphoRyR2 and S100A1) or anti-mouse 800 nm (1:30,000) (for NCX1, PLB and GAPDH) for 1h in the dark. After final washes, membranes were scanned by using Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences).

2.7 Statistical analysis

All data are reported as means±SD. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism and Origin Softwares. One-way ANOVA for multiple comparisons was used, followed by a parametric t-test with Bonferroni's correction. Percentage data were analyzed by a *chi-square* test. A p-value of 0.05 or less indicated a statistically significant difference.

3. Results

3.1 BNP reduced fibrosis and metoprolol improved cardiac remodeling

MI mice exhibited heart failure with cardiac hypertrophy, increased LVEDd, decreased SF and major interstitial fibrosis *(**Tables** 1,2; **Fig.** S2)***.*** The sBP, the dBP and the MAP were decreased

*(**Fig.** S3a-c)*. BNP did not improve morpho-functional remodeling after MI but reduced interstitial fibrosis (***Tables** 1,2*). In contrast, the increases of the HWI and LVEDd in PMI mice were slightly reversed by metoprolol, while pleural effusion and lung congestion were worsened *(**Table** 1)*. Consistently, metoprolol reduced cell hypertrophy, which was confirmed by the quantification of MRTF-A and SRF mRNAs *(**Fig.** S4 a,b)* [28, 29].

3.2 BB+BNP normalized morpho-functional parameters

The BB+BNP combination was far more effective than metoprolol alone on HWI, pleural effusion, lung congestion, collagen, and LVEDd *(**Tables** 1 & 2)*. The combination reduced fibrosis and hypertrophy more efficiently than BB or BNP alone *(**Table** 2)*. BB, BNP and BB+BNP had no detrimental effect on the sBP *(**Fig.** S3a-c)*.

3.3 BB+BNP corrected rhythm disturbances better than monotherapy

PMI mice presented a high heart rate *(**Fig.** 1a),* a prolonged QRS, and lengthened QTc interval *(**Fig.** 1b,c)* when compared to Shams. The typical collapsed sympatho-vagal balance (LF/HF ratio) indicated that the sympathetic system was overactivated, as currently seen in heart failure *(**Fig.** 1d-f)* [30]. In addition, QT variability was increased, as indicated by the QT_{STV} *(**Fig.** 2a)* and Poincaré plots *(**Fig.** 2e,f)*. All these parameters are well-recognized prognostic markers for VAs [31, 32]. PMI mice displayed a higher incidence of ventricular extrasystoles (VES) than Shams *(**Fig.** 2b)*.

BB alone and BB+BNP both reduced the heart rate in PMI *(**Fig.** 1a)* and improved HRV *(**Fig.** 1d,f)*. The QT_{STV} and the number of VES were also diminished *(**Fig.** 2a,b)*. Similar results have been reported in heart failure patients under β-blocker therapy [33]. Overall, BB+BNP was more effective than BB alone in correcting the HRV (***Fig.** 1d-f)* and the QT_{STV} *(**Fig.** 2b,e-i)* and in reducing VES *(**Fig.** 2b)*.

Since catecholamines are a potent trigger of VAs, mice were challenged with isoproterenol 4 weeks after stopping the treatments. In the PMI group, 58% of the mice (7/12) developed SVT *(**Fig.** 2c)*, and 33% triggered ventricular fibrillation *(**Fig.** 2d)*. In the BNP-PMI group, 60% of mice developed SVT (8/12), and 33 % developed ventricular fibrillation followed by cardiac death (4/12). The BB+BNP therapy remained highly beneficial in successfully preventing the triggering of SVT (8%, 1/12 mice) (*Chi-square* test, $p<0.05$) (***Fig.** 2c*).

3.4 BB+BNP prevented Ca^{2+} handling alterations

In PMI, Ca^{2+} transient were altered with reduced SR Ca^{2+} content, slower decay kinetics, smaller amplitude and higher diastolic Ca^{2+} levels than in Shams (***Fig.** 3a-e*). These changes accounted for the decrease in sarcomeres shortening and the triggering of spontaneous irregular Ca^{2+} waves *(**Fig.** 3a,f)*. Chronic BNP worsened all these alterations and irregular Ca^{2+} waves persisted (***Fig.** 3,4*). In contrast, both BB and BB+BNP improved Ca^{2+} homeostasis *(**Fig.** 3a-e)* and reduced the number of pro-arrhythmogenic Ca^{2+} waves *(**Fig.** 3f,g*). Nevertheless, BB+BNP was more effective than BB alone to reduce Ca^{2+} sparks frequency *(**Fig.** 4)* and occurrence of spontaneous Ca^{2+} waves *(**Fig.** 5)*. Thus, the beneficial effects of BB+BNP on Ca^{2+} cycling could explain its anti-arrhythmic advantages.

3.5 BB+BNP normalized changes in Ca^{2+} handling proteins

The alterations of Ca^{2+} homeostasis in heart failure result from modifications of key Ca^{2+}-handling proteins [34, 35] as we observed for SERCA2a, S100A1 and NCX in PMI *(**Fig.** 5a,b,e).* In addition, PLB phosphorylation was decreased while RyR2 phosphorylation was increased *(**Fig.** 5c,d)*. BNP had no major effect on SERCA2a, NCX, or the phosphorylation of PLB and RyR2 *(**Fig.** 5a-d)*, but it further reduced S100A1 protein expression *(**Fig.** 5e)*. This additional reduction of S100A1 accounted for the higher Ca^{2+} sparks frequency in BNP-PMI mice [36, 37]. In contrast,

BB+BNP normalized SERCA2a, NCX and S100A1 expression levels, and the phosphorylation of PLB and RyR2 *(**Fig**. 5a-e).* The beneficial effects of BB were therefore enhanced by BNP, with an additional decrease in NCX1 expression and the P-RyR2/RyR2 ratio, and normalization of PLB phosphorylation *(**Fig**. 5b-d)*. These results altogether accounted for the improved control of SR Ca^{2+} leakage, improved inotropy and prevention of irregular Ca^{2+} waves by BB+BNP.

4. Discussion

β-blockers are commonly used as first-line treatment after acute MI and heart failure, with unquestionable benefits on mortality[19, 20]. Here, we conclude that a therapy combining the selective β1-adrenergic blocker metoprolol with *subcutaneous* BNP is more effective to prevent cardiac remodeling than metoprolol alone in chronic decompensated heart failure. We also provide novel insights into how the combination improves cardiac function, and prevents Ca^{2+}-handling alterations and subsequent morbid arrhythmias during heart failure *(**Fig.** 6)*.

4.1 Higher benefits of BB+BNP on cardiac remodeling

Favorable effects of BNP have been reported in hypertension-induced heart failure [38, 39], but these effects are still debated in post-ischemic heart failure [40-42]. Here, we showed that *subcutaneous* BNP therapy was highly beneficial when used in combination with metoprolol. In addition, the overall beneficial effect which we observed, was independent of heart rate and hemodynamic changes. In particular, no severe hypotension was observed with subcutaneous infusion of BNP comparatively with intravenous administration [10]. The combination therapy clearly associated the antifibrotic effect of BNP and the anti-remodeling action of metoprolol that account for efficient anti-arrhythmic properties. This was not highlighted in the ASCEND-HF trial, where almost 60 % of patients received a β-blocker therapy or angiotensin-converting

enzyme (ACE) inhibitors with intravenous BNP infusion [10]. The difference may reflect differences of dosage, administration route (*intravenous*, 0.010 μg per kilogram per minute for 24 hours or more for up to 7 days in acute decompensated heart failure vs. *subcutaneous* 0.03 μg per kilogram per minute for 15 days in established chronic heart failure) and of model. Moreover, the effects of BNP are far more highly complex than initially thought, and they are likely to depend on various factors such as the dosage, timing and duration of treatment, the administration mode as well as the status of other neuro-hormonal systems [8, 16, 43]. Indeed, it was also shown that BNP present *per se* anti-renin-angiotensin-aldosterone properties that could explain anti-fibrotic and anti-hypertrophic effects[44].

The normalization of the sympatho-vagal balance by the combination was a key mechanism contributing to its overall therapeutic effect. Metoprolol not only provided its well-known benefits, but it broke the deleterious loop linking BNP and sympathetic overdrive [8]. Indeed, BNP promotes norepinephrine release from sympathetic cardiac neurons and selectively inhibits phosphodiesterase 3 in heart failure, which is likely to offset the desirable effects of natriuretic peptides [16, 17, 45]. Moreover, whereas low dose of nesiritide have beneficial effect on autonomic nervous system, high dose of BNP as a potent vasodilator could potentially be associated with relatively prolonged hypotension [14, 46]. The physiologic response to hypotension is activation of SNS[14]. This action could account for the increased propensity of BNP-PMI mice to develop catecholamines-induced VT, fibrillation and death. Such major pro-arrhythmic effect of intravenous BNP was not observed in patients, even if high dose of nesiritide induced a minor increase of ventricular ectopic activity (VT, couplets and triplets) [47]. However, in this study, the anti-arrhythmic therapy of patients may have prevented or attenuated the effect of parenteral vasoactive therapy on the occurrence of VA [47]. In addition, nonsustained ventricular tachycardia was also reported during study drug infusion of nesiritide (in 3 patients) in clinical trial by Mills *et al.*; all subjects received a high dose of nesiritide (0.030 μg/kg/min)[46].

We therefore propose that the combination retains the beneficial effects of subcutaneous BNP but attenuates the deleterious consequences mediated by β1-adrenergic receptor stimulation. In line, the combination therapy reduced fibrosis and corrected the QRS lengthening and QT dispersion, which both correlate with a lowered risk of developing VA [31, 33]. Importantly, this anti-arrhythmic benefit persisted over time, and lasted longer than that of metoprolol alone, which in line with a protective long-term anti-remodeling effect.

4.2 Mechanisms of higher benefits of BB+BNP combination therapy

Alterations in Ca^{2+} homeostasis are responsible for excitation-contraction coupling defects and VA [2-4, 25]. Aberrant RyR opening in diastole, observed functionally as the abnormal occurrence of Ca^{2+} sparks, generates spontaneous irregular Ca^{2+} waves that are involved in the triggering of VA/SVT [2, 25]. Sympathetic overdrive, leading to RyR2 hyperphosphorylation by cAMP-dependent protein kinase and subsequent SR Ca^{2+} leakage in diastole [48], may be involved [49]. The combination therapy effectively reduced Ca^{2+} leakage from the SR, and improved SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} transient amplitude, by normalizing proteins alterations which accounted for the maintained cell contraction and the antiarrhythmic properties. Interestingly, the combination restored baseline levels of S100A1 and increase SR Ca^{2+} content, a parameter favorable for cell inotropy. S100A1 is considered as a Ca^{2+}-dependent molecular inotrope regulating cardiac SR Ca^{2+} cycling [50]. Restoration of S100A1 expression was mentioned to treat heart failure [51].

4.3 Clinical implication

The most important finding of this study is that combination therapy of oral metoprolol with *subcutaneous* application of BNP is more effective than monotherapy with the β-blocker alone in reducing ventricular remodeling and VAs following MI. The interest of combinations, elevating circulating plasma concentration of natriuretic peptides associated with classical drugs

has been recently highlighted[52, 53]. For example, neutral endopeptidase inhibitors have *per se* limited clinical benefice. However, their association with angiotensin-converting enzyme or angiotensin receptor antagonists is promising, despite limitations such as incidence of multilevel potentially life-threatening, angioedema [52]. Our results are in line and may challenge this innovative concept because β1-adrenergic receptor antagonization abolished the main adverse effects of BNP (***Fig.*** *6*). Under these conditions, BNP resulted in both a distinct beneficial effect (reduction of fibrosis) and the enhancement of the benefits of metoprolol, while its negative effects (pleural effusion, lung congestion) were attenuated, explaining the synergic effect of the two molecules on ventricular remodeling and VAs. The therapeutic benefits on cardiac remodeling in terms of fibrosis and intracellular Ca^{2+} cycling resulted from an improved balance of the BNP and adrenergic systems, and from mechanisms intrinsic to the two pathways at the cardiomyocytes level. These promising results obtained in an experimental model of ischemic heart failure warrants further evaluation in human.

Funding: This work was supported by funding from the *Fondation de France* (Project PepNaRhythm, N° 2068001722) and the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM). JT, SR, JF, OC and AL hold CNRS (Centre National de la recherche scientifique) positions.

Acknowledgment: We thank Dr S. Rasika of Gap Junction for English editing.

Conflict of Interest: none declared.

References

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB*, et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;**125**:e2-e220.
2. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev* 2008;**88**:1491-1545.
3. Sipido KR, Volders PG, Vos MA, Verdonck F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res* 2002;**53**:782-805.
4. Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR. Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2008;**23**:6-16.
5. Engelhardt S, Hein L, Dyachenkow V, Kranias EG, Isenberg G, Lohse MJ. Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 2004;**109**:1154-1160.
6. Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B*, et al.* B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2002;**105**:2392-2397.
7. Toischer K, Teucher N, Unsold B, Kuhn M, Kogler H, Hasenfuss G. BNP controls early load-dependent regulation of SERCA through calcineurin. *Basic Res Cardiol* 2010;**105**:795-804.
8. Thireau J, Karam S, Fauconnier J, Roberge S, Cassan C, Cazorla O*, et al.* Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:59-68.
9. Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD*, et al.* Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* 2000;**343**:246-253.
10. O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, Armstrong PW, Dickstein K, Hasselblad V*, et al.* Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *N Engl J Med* 2011;**365**:32-43.
11. Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005;**293**:1900-1905.
12. Sackner-Bernstein JD, Skopicki HA, Aaronson KD. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* 2005;**111**:1487-1491.
13. Topol EJ. Nesiritide - not verified. *N Engl J Med* 2005;**353**:113-116.
14. Aronson D, Burger AJ. Effect of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) and dobutamine on heart rate variability in decompensated heart failure. *Am Heart J* 2004;**148**:e16.
15. Azevedo ER, Newton GE, Parker AB, Floras JS, Parker JD. Sympathetic responses to atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**35**:129-135.
16. Chan NY, Seyedi N, Takano K, Levi R. An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition. *Circulation* 2012;**125**:298-307.
17. Qvigstad E, Moltzau LR, Aronsen JM, Nguyen CH, Hougen K, Sjaastad I*, et al.* Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:763-772.
18. Chen HH, Glockner JF, Schirger JA, Cataliotti A, Redfield MM, Burnett JC, Jr. Novel protein therapeutics for systolic heart failure: chronic subcutaneous B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol* 2012;**60**:2305-2312.
19. Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ* 1999;**318**:1730-1737.
20. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK*, et al.* 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart

Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation* 2008;**117**:296-329.

21. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG*, et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005;**112**:e154-235.
22. Burley DS, Baxter GF. B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart. *Basic Res Cardiol* 2007;**102**:529-541.
23. Richards AM. The natriuretic peptides in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2004;**99**:94-100.
24. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004;**16**:349-360.
25. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, Cassan C, Richard S, Matecki S*, et al.* Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:1559-1564.
26. Thireau J, Aimond F, Poisson D, Zhang B, Bruneval P, Eder V*, et al.* New insights into sexual dimorphism during progression of heart failure and rhythm disorders. *Endocrinology* 2010;**151**:1837-1845.
27. Dallas ML, Yang Z, Boyle JP, Boycott HE, Scragg JL, Milligan CJ*, et al.* Carbon monoxide induces cardiac arrhythmia via induction of the late Na+ current. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**186**:648-656.
28. Nelson TJ, Balza R, Jr., Xiao Q, Misra RP. SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**39**:479-489.
29. Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T*, et al.* Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Mol Cell Biol* 2010;**30**:4134-4148.
30. Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996;**93**:1043-1065.
31. Hinterseer M, Beckmann BM, Thomsen MB, Pfeufer A, Ulbrich M, Sinner MF*, et al.* Usefulness of short-term variability of QT intervals as a predictor for electrical remodeling and proarrhythmia in patients with nonischemic heart failure. *Am J Cardiol* 2010;**106**:216-220.
32. Vrtovec B, Delgado R, Zewail A, Thomas CD, Richartz BM, Radovancevic B. Prolonged QTc interval and high B-type natriuretic peptide levels together predict mortality in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2003;**107**:1764-1769.
33. Bonnar CE, Davie AP, Caruana L, Fenn L, Ogston SA, McMurray JJ*, et al.* QT dispersion in patients with chronic heart failure: beta blockers are associated with a reduction in QT dispersion. *Heart* 1999;**81**:297-302.
34. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J*, et al.* Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1994;**75**:434-442.
35. Pott C, Eckardt L, Goldhaber JI. Triple threat: the Na+/Ca2+ exchanger in the pathophysiology of cardiac arrhythmia, ischemia and heart failure. *Curr Drug Targets* 2011;**12**:737-747.

36. Volkers M, Loughrey CM, Macquaide N, Remppis A, DeGeorge BR, Jr., Wegner FV*, et al.* S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium* 2007;**41**:135-143.
37. Most P, Remppis A, Pleger ST, Katus HA, Koch WJ. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**:R568-577.
38. Moilanen AM, Rysa J, Mustonen E, Serpi R, Aro J, Tokola H*, et al.* Intramyocardial BNP gene delivery improves cardiac function through distinct context-dependent mechanisms. *Circ Heart Fail* 2011;**4**:483-495.
39. Cataliotti A, Tonne JM, Bellavia D, Martin FL, Oehler EA, Harders GE*, et al.* Long-term cardiac pro-B-type natriuretic peptide gene delivery prevents the development of hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2011;**123**:1297-1305.
40. Pan Y, Zhu W, Ma J, Xin P, Han B, He Y*, et al.* Therapeutic effects of continuous infusion of brain natriuretic peptides on postmyocardial infarction ventricular remodelling in rats. *Arch Cardiovasc Dis* 2011;**104**:17-28.
41. He J, Chen Y, Huang Y, Yao F, Wu Z, Chen S*, et al.* Effect of long-term B-type natriuretic peptide treatment on left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol* 2009;**602**:132-137.
42. George I, Xydas S, Klotz S, Hay I, Ng C, Chang J*, et al.* Long-term effects of B-type natriuretic peptide infusion after acute myocardial infarction in a rat model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;**55**:14-20.
43. Brunner-La Rocca HP, Kaye DM, Woods RL, Hastings J, Esler MD. Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. *J Am Coll Cardiol* 2001;**37**:1221-1227.
44. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:318-328.
45. Chan NY, Robador PA, Levi R. Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H3 and H4 receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;**343**:568-577.
46. Mills RM, LeJemtel TH, Horton DP, Liang C, Lang R, Silver MA*, et al.* Sustained hemodynamic effects of an infusion of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) in heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Natrecor Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1999;**34**:155-162.
47. Burger AJ, Horton DP, LeJemtel T, Ghali JK, Torre G, Dennish G*, et al.* Effect of nesiritide (B-type natriuretic peptide) and dobutamine on ventricular arrhythmias in the treatment of patients with acutely decompensated congestive heart failure: the PRECEDENT study. *Am Heart J* 2002;**144**:1102-1108.
48. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D*, et al.* Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 2003;**278**:444-453.
49. Reiken S, Gaburjakova M, Gaburjakova J, He Kl KL, Prieto A, Becker E*, et al.* beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. *Circulation* 2001;**104**:2843-2848.
50. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Borries M*, et al.* S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:13889-13894.
51. Brinks H, Rohde D, Voelkers M, Qiu G, Pleger ST, Herzog N*, et al.* S100A1 genetically targeted therapy reverses dysfunction of human failing cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 2011;**58**:966-973.
52. Mangiafico S, Costello-Boerrigter LC, Andersen IA, Cataliotti A, Burnett JC, Jr. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur Heart J* 2012.

53. von Lueder TG, Sangaralingham SJ, Wang BH, Kompa AR, Atar D, Burnett JC, Jr.*, et al.* Renin-Angiotensin blockade combined with natriuretic Peptide system augmentation: novel therapeutic concepts to combat heart failure. *Circ Heart Fail* 2013;**6**:594-605.
54. Coumel P. Cardiac arrhythmias and the autonomic nervous system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993;**4**:338-355.
55. Zipes DP. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmias: role of the autonomic nervous system. *Cleve Clin J Med* 2008;**75 Suppl 2**:S94-96.

Figure legends

Fig. 1. ECG analysis from 12h nocturnal period. BB+BNP therapy improved electrocardiogram and heart rate variability. Parameters estimated (**a**) RR interval, (**b**) QRS duration, and (**c**) QTc interval. HRV in the frequency domain with (**d**) LF, (**e**) HF and (**f**) LF/HF ratio. *,†,‡ ; $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ *vs.* Sham; §,‖,; $p<0.05$, $p<0.01$ *vs*. PMI; ¶; $p<0.05$ *vs.* BB-PMI; n=15 per group.

Fig. 2. QT variability and arrhythmic events. BB+BNP therapy were more efficient than metoprolol to prevent variability of ventricular repolarization and ventricular arrhythmia. **(a)** QT_{STV}, (**b**) number of spontaneous VES, (**c**) percentage of mice developing SVT after isoproterenol assessed 8 weeks after coronary artery ligation (2.5 $mg.kg^{-1}$ i.p. of isoproterenol). **d)** Typical sustained VT and VF recorded in a PMI mouse during isoproterenol challenge. (**e-i**) Poincaré plots of QT intervals for each group. *,†,‡: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ *vs.* Sham ; §,‖; $p<0.05$, $p<0.01$ *vs.* PMI; ¶: $p<0.05$ *vs.* BB-PMI; n=15 per group.

Fig. 3. Ca^{2+} transients and cell shortening. BB+BNP decreased cellular susceptibility to arrhythmia by normalizing Ca^{2+} homeostasis. (**a**) Ca^{2+} transients in single LV cardiomyocytes expressed as ΔF/F0 (Indo1-AM). (**b**) averaged Ca^{2+} transient amplitudes, (**c**) averaged decay time constants (Tau) of Ca^{2+} transients, (**d**) averaged SR Ca^{2+}content following caffeine application, (**e**) averaged diastolic Ca^{2+} levels, (**f**) sarcomeres shortening and (**g**) percentage of cells exhibiting spontaneous irregular Ca^{2+} waves. *,†,‡; $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ *vs.* Sham; §,‖,¶; $p<0.05$, $p<0.01$, $P<0.001$ *vs.* PMI animals; #: $p<0.05$ *vs.* BB-PMI animals; n=50 cells, 5 mice per group.

Fig. 4. Ca^{2+} sparks. BB+BNP prevented Ca^{2+} leakage from RyR2. (**a**) Representative ΔF/F line scan images of Ca^{2+} sparks, recorded in intact Fluo-4 AM-loaded cardiomyocytes, (**b**) averaged Ca^{2+} spark frequencies. *,†; p<0.05, p<0.001 *vs.* Sham animals; ‡, §,‖: p<0.05, p<0.01, P<0.001 *vs.* PMI animals; ¶: p<0.05 *vs.* BB-PMI animals; n=60 cells, 6 animals per group.

Fig. 5. Ca^{2+} handling proteins. BB+BNP normalized expression and post-traductional modifications of proteins involved in Ca^{2+} cycling. Normalized protein content to GAPDH and protein ratios obtained by western blotting for (**a**) SERCA2a, (**b**) NCX1, (**c**) P-PLB/PLB ratio, (**d**) P-RyR/RyR, and (**e**) S100A1. *,†,#; p<0.05, p<0.01, p<0,01 *vs.* Sham animals; ‡,§,‖: p<0.05, p<0.01, P<0.001 *vs.* PMI animals, ¶: p<0.05 *vs.* BB-PMI animals.

*,†,‡; p<0.05, p<0.01, p<0.001 *vs.* Sham; §,‖,¶; p<0.05, p<0.01, P<0.001 *vs.* PMI animals, #: p<0.05 *vs.* BB-PMI animals. (n=10 per group).

Fig. 6. Beneficial effect of combination therapy in the concept of *Coumel*'s triangle of arrhythmogenesis [54, 55]. In addition to its beneficial effects on the *"substrate"* (cardiac remodeling, myocytes hypertrophy) and the *"trigger"* (Ca^{2+} cycling), β1-adrenergic receptor antagonism also abolishes the adverse consequences of BNP on the "*modulator"* (sympathetic system overactivation).

Online Supplementary Figures

Supplementary Figures are available at *Cardiovascular Research* online.

Legend of Supplementary Figures

Fig. S1. Time sequence of experimental procedure

Fig. S2. Histological sections from the mild ventricles from Sham. BB+BNP and BNP reduced cardiac interstitial fibrosis assessed by Sirius red staining. (**a**), PMI (**b**), BNP-PMI (**c**), BB-PMI (**d**) and BB-BNP-PMI (**e**). Scale bars: 2 mm.

Fig. S3. Non-invasive blood pressure measurement. BB+BNP did not present deleterious side effects on arterial pressure. (**a**) Systolic, sBP; (**b**) diastolic, dBP and (**c**) mean arterial pressure, MAP (in mmHg) were measured with a tail cuff in each group just before the end of the treatment period. *,†,‡: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ *vs.* Sham animals; §; $p<0.05$ *vs*. PMI animals, n=12 per group.

Fig. S4. mRNA expression of hypertrophic markers. BB+BNP reduced cardiomyocytes hypertrophy. **(a)** Myocardin-related transcription factor A and (**b**) Serum response factor mRNA expression normalized to GAPDH . *,†; $p<0.05$, $p<0.01$ *vs.* Sham animals; ‡,§,: $p<0.05$, $p<0,01$ *vs*. PMI animals, ||: $p<0.05$ *vs.* BB-PMI animals (n=8 per group).

Tables and tables legends

	n	HWI (mg/g)	Pleural effusion (%)	Lung congestion (%)
Sham	15	4.9 ±0.2	0	0
PMI	16	5.9±0.3‡	58†	41†
BNP-PMI	15	6.2±0.1 ‡	57†	42†
BB-PMI	15	5.5±0.1†§	69‡§	69‡§
BB-BNP-PMI	15	5.3±01.1*,‖, ¶	33*,§, #	33*,§,#

Table 1: Heart weight index, percentage of animals exhibiting pleural effusion and lung congestion. *,†,‡; $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ *vs.* Sham ; §,‖ $p<0.05$, $p<0.01$ *vs.* PMI; ¶,#: $p<0.05$, $p<0.01$ *vs.* BB-PMI; n = number of animals.

	LVEDd (mm)	SF (%)	Collagen (%)	Cell volume (10^{-5} mm^3)
Sham	25.4±0.5	58.9±1.3	0.1±0.0	3.5±0.1
PMI	52.4±0.4‡	17.4±1.1‡	5.2±1.8‡	5.5±0.5‡
BNP-PMI	47.1±0.3‡	17.5±0.8‡	3.6±0.2‡,§	4.8±0.4†
BB-PMI	42.1±0.5†,§	24.6±0.6†,§	4.6±1.9‡	4.3±0.3*,§
BB-BNP-PMI	39.9±0.4†,§	29.6±0.9†,‖,¶	2.4±1.5†,‖,¶	3.7±0.4‖,¶

Table 2: Echocardiography, histology and cellular hypertrophy. LVEDd and SF (n=14). Collagen content, (percentage of the total area of myocardial tissue analyzed, 8 mice/group) and cell volume (n=30 cells, 3 mice/group) *,†,‡; $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ *vs.* Sham; §, ‖ : $p<0.05$, $p<0.01$*vs.* PMI; ¶: $p<0.05$ *vs.* BB-PMI

Figure 1
Click here to download high resolution image

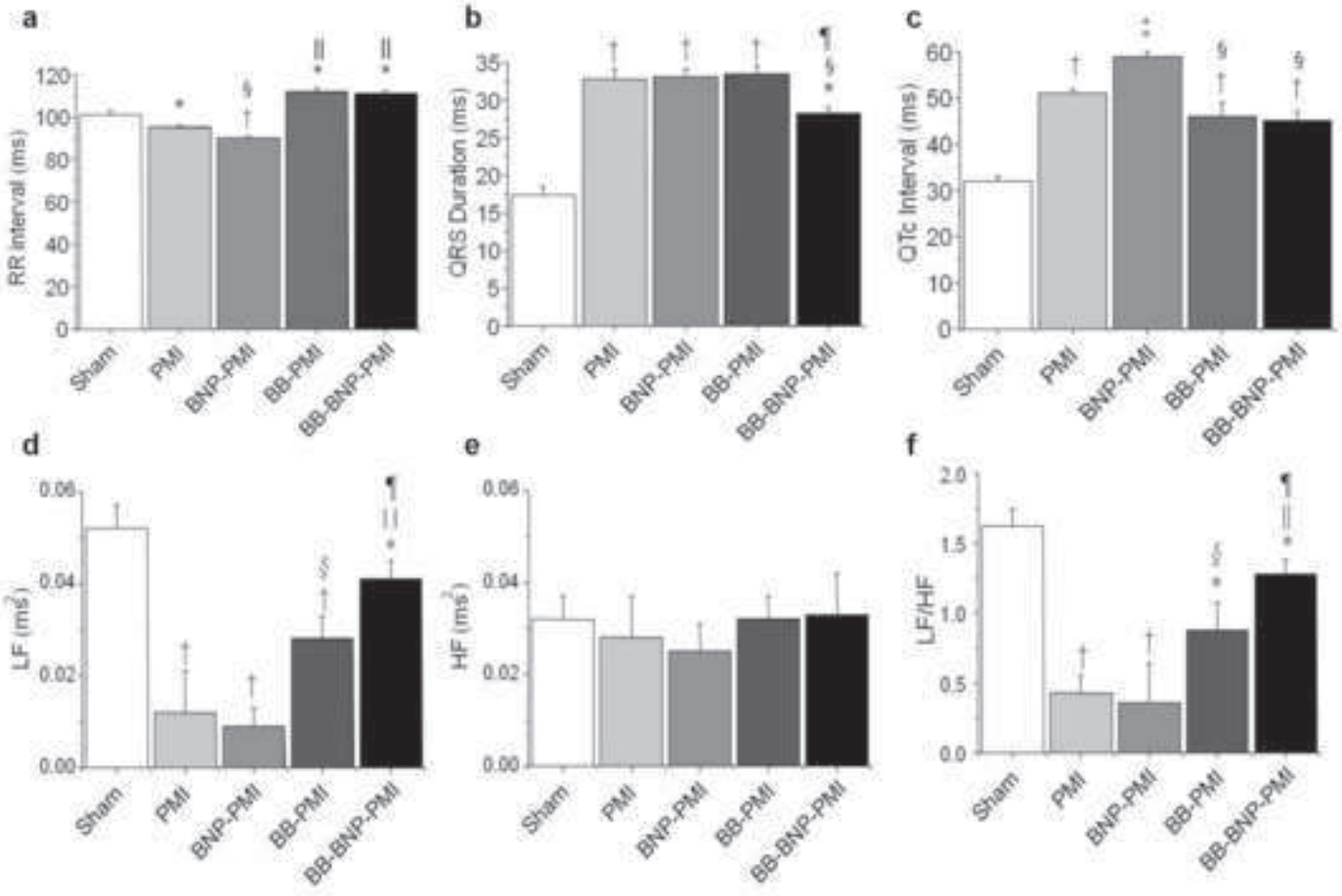


Figure 1. Thireau et al.

Figure 2
Click here to download high resolution image

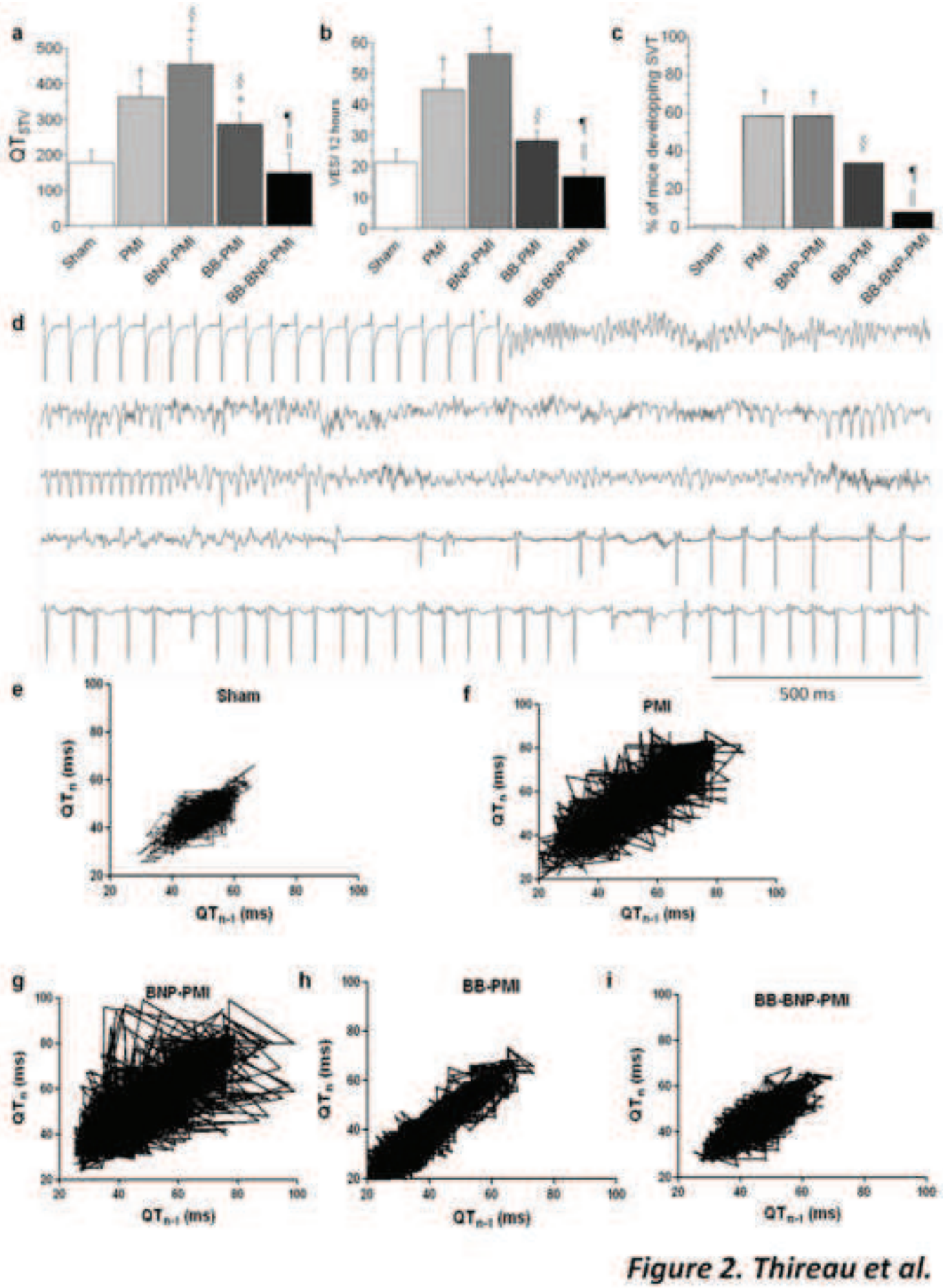


Figure 2. Thireau et al.

Figure 3
Click here to download high resolution image

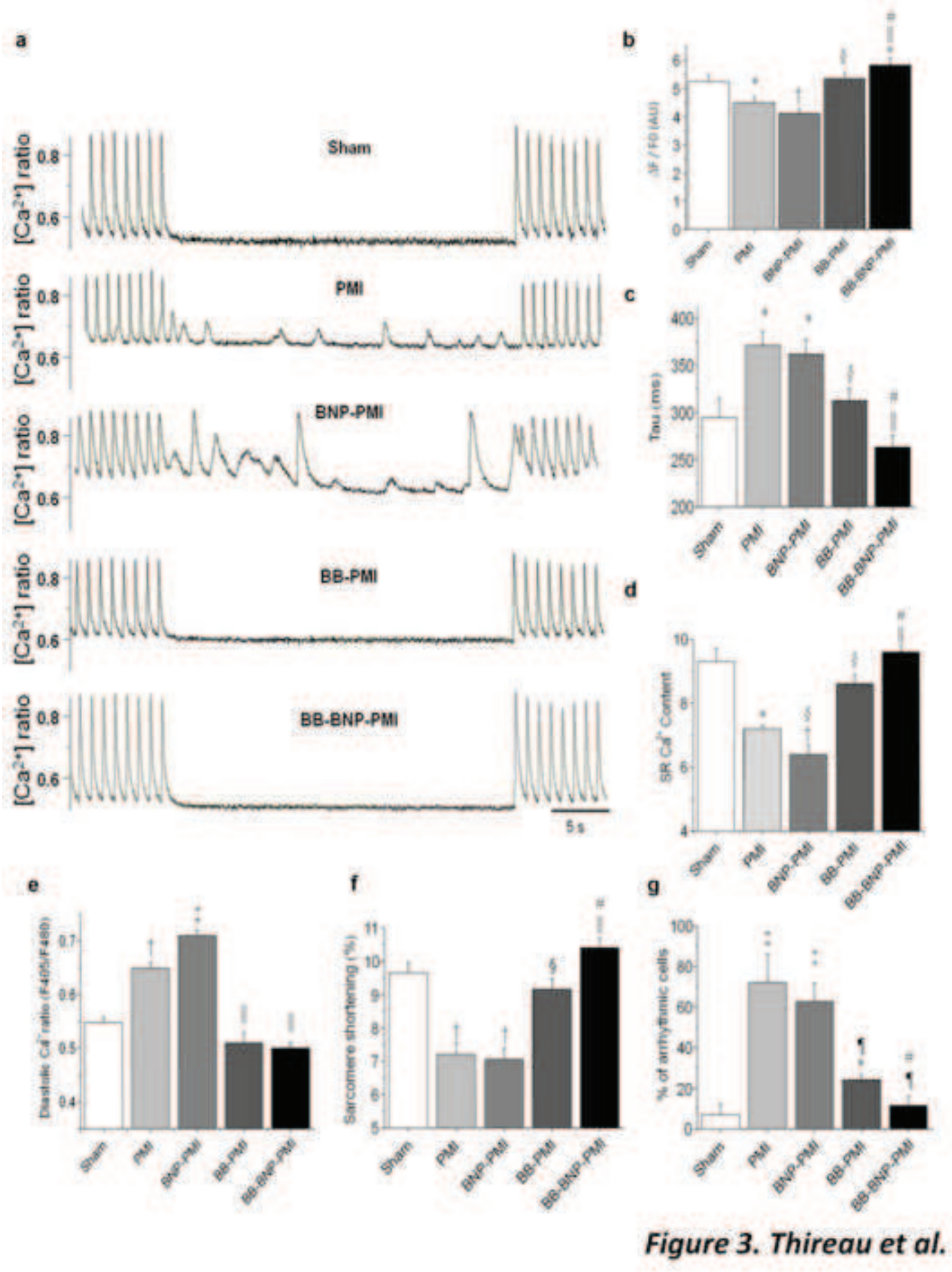


Figure 3. Thireau et al.

Figure 4
Click here to download high resolution image

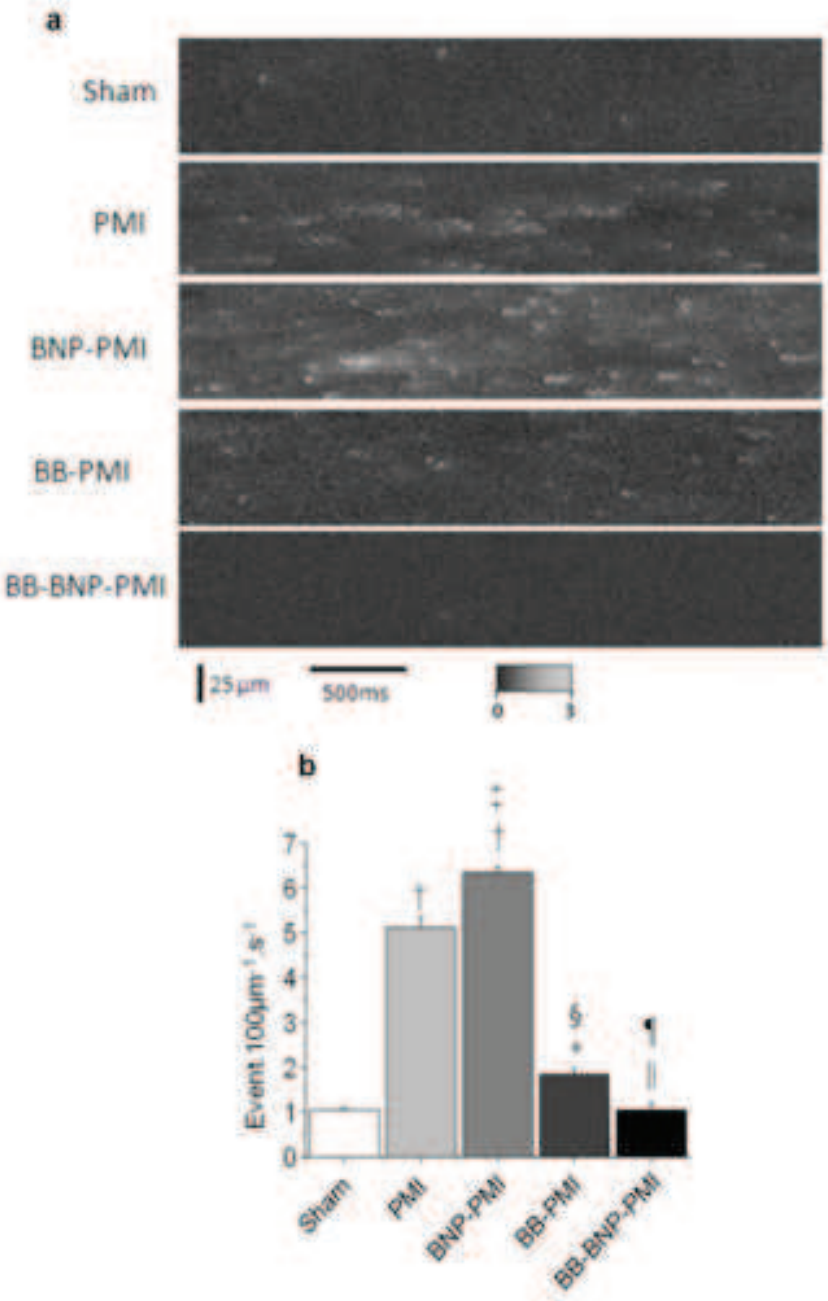


Figure 4. Thireau et al.

Figure 5
Click here to download high resolution image

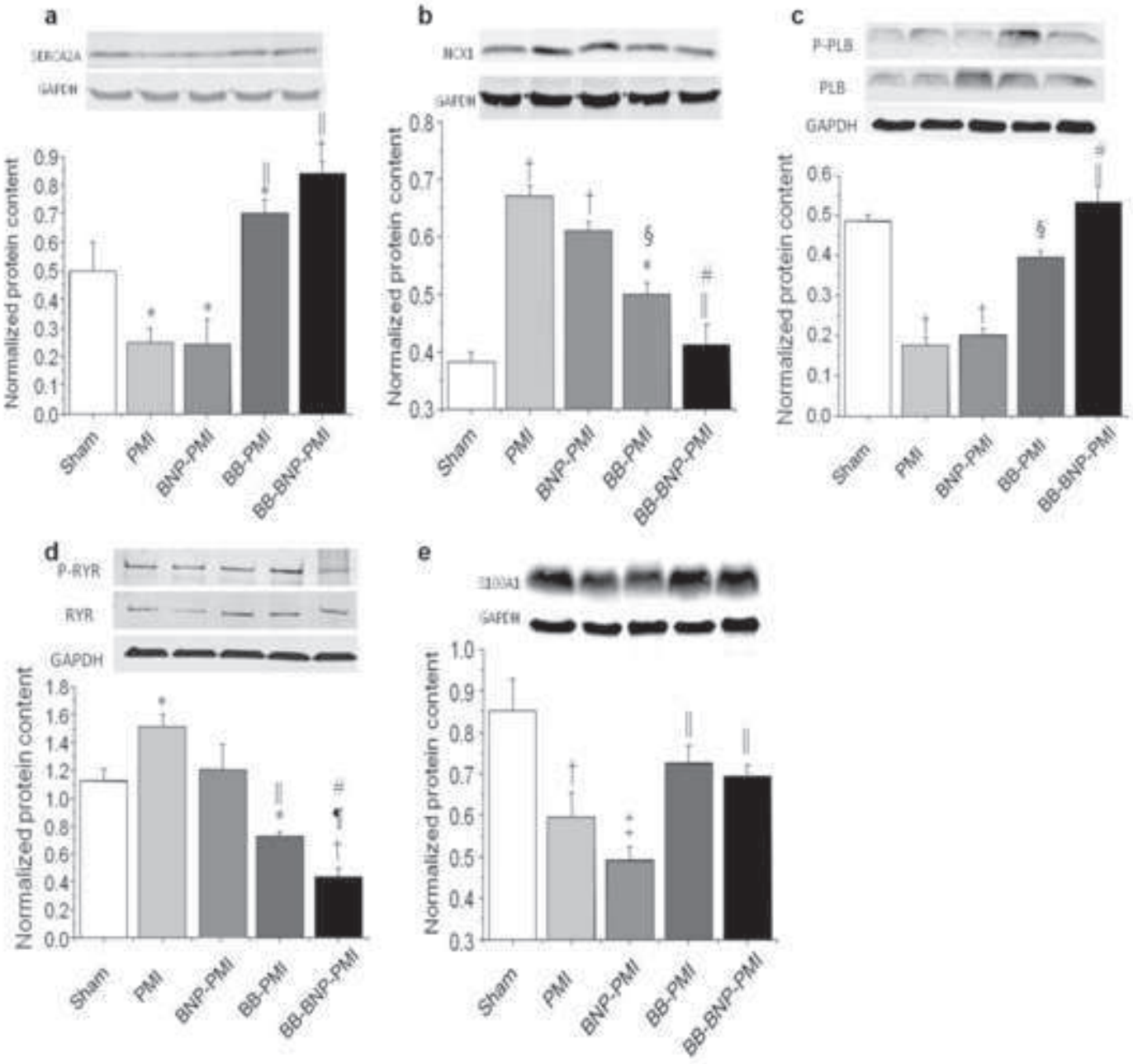


Figure 5. Thireau et al.

Figure 6
Click here to download high resolution image

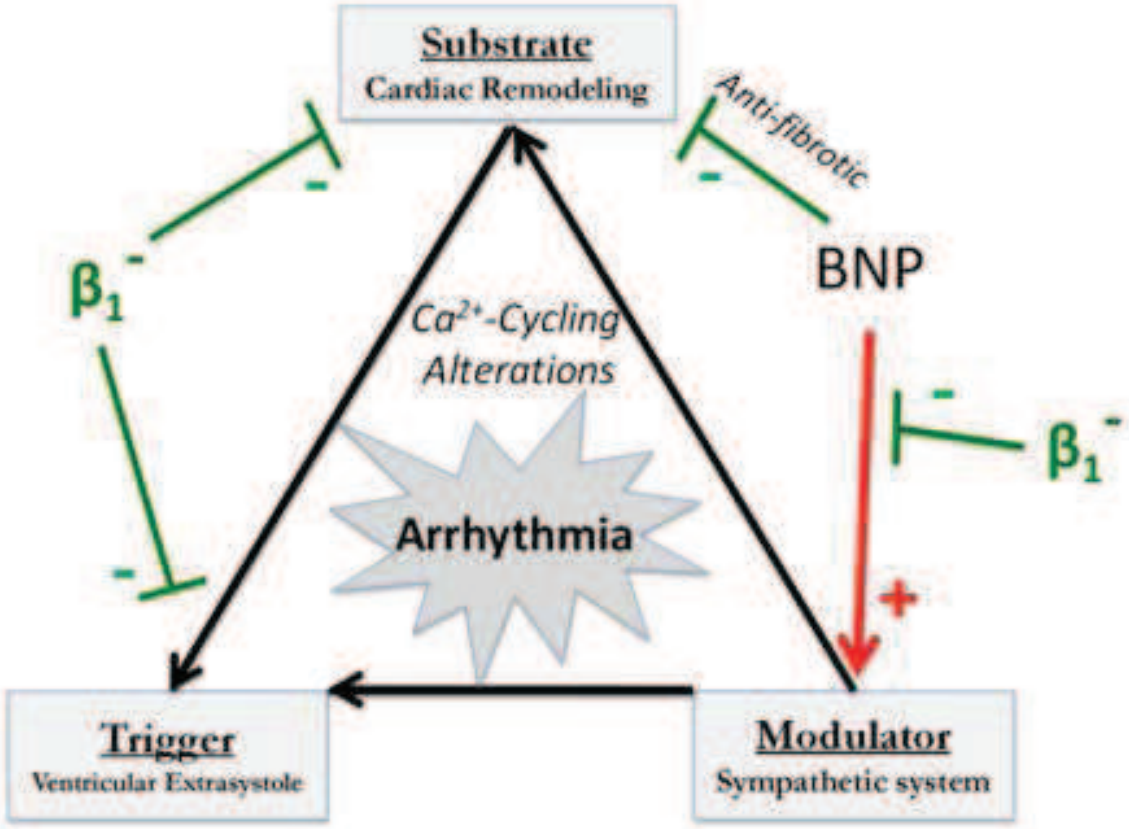


Figure 6. Thireau et al.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Beta-adrenergic blockade combined with subcutaneous B-type natriuretic peptide: a promising strategy in heart failure ?

Jérôme Thireau[*], Sarah Karam[*]†, Stéphanie Roberge[*]†, Julien Roussel[*], Cécile Cassan[*], Arnaud Gac‡, Dominique Babuty§, Jean-Yves Le Guennec[*], Alain Lacampagne[*], Jérémy Fauconnier[*], Sylvain Richard[*]||

[*]Inserm U1046, *Physiologie & Médecine Expérimentale, Cœur et Muscles*, Université Montpellier-1 & Université Montpellier-2, Montpellier, France.
‡ADInstruments Limited, Oxford OX4 6HD, UK
§Hôpital Trousseau, Tours, France.

†*Equal contribution.*

|| **Corresponding author:** Dr. Sylvain Richard

Inserm U1046, Physiologie & Médecine Expérimentale, Cœur et Muscles
CHU Arnaud de Villeneuve, 371 Rue du doyen G. Giraud, 34295 Montpellier

Phone: (33)04.67.41.52.40
Fax: (33)04.67.41.52.42
E-mail: sylvain.richard@inserm.fr

Animals and BNP

Seven-week-old male C57Bl/6 mice (Janvier, France) were randomly assigned to the following groups: 1) mice in post-myocardial infarction after left coronary artery ligation as previously described (PMI mice); 2) PMI mice treated with BNP (BNP-PMI); 3) PMI mice treated with metoprolol (BB-PMI); 4) PMI mice treated with metoprolol and BNP (BB-BNP-PMI) and 5) sham-operated mice[1] (Shams). For PMI, a left thoracotomy was performed under anesthesia and cardiac monitoring (2% isoflurane/O_2, Aerrane®, Baxter, France). The artery was ligated 1-2 mm beyond the emergence from the top of the left atrium, using an 8-0 suture. A subcutaneous injection of 0.01 ml buprenorphine solution (0.3 $mg.ml^{-1}$) for post-operative analgesia was administered. Shams were subjected to the same surgical procedure but without coronary artery ligation[1]. Only animals surviving to day-5 post surgery was included in the study. Echocardiography was systematically realized before the inclusion of animal to ensure that ligation was correctly performed. No animal died or had been sacrificed after inclusion and before the end of experiments due to achievement of endpoints (according to our ethics committee). Metoprolol (Sigma-Aldrich, $100mg.kg^{-1}.day.^{-1}$) was administered in the drinking water.[2] The active form of mouse BNP (Ref 14-5-30A, American Peptide, Sunnyvale, USA) was administered using a micro-osmotic pump (Alzet 1002, France, $0.03\mu g.kg^{-1}.min^{-1}$ for 14 days).[2] Circulating BNP levels were assessed on Day-28 (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, USA). BNP levels in Shams were inferior to 0.34 ng/ml. BNP levels increased to 5.1±0.9 ng/ml in PMI, 4.7±0.8 ng/ml in BB-PMI, 11.2±0.7 ng/ml in BNP-PMI, and 11.9±1.0 ng/ml in BB-BNP-PMI mice (n=8 per group). Following *in vivo* investigations, the heart was explanted after cervical dislocation for single-cell experiments. The time sequence of the protocol is available in the on-line supplement (**Figure S1**). All procedures conformed to European Parliament Directive 2010/63/EU and the 22 September 2010 Council on the protection of animals, and were approved by the institutional animal research committee (Departmental Directorate of protecting populations and animal health (ethics for animal welfare and environmental protection, N° A 34- 485) and by our Ethics committee for animal experiments, Languedoc Roussillon, N° CE-LR-0714).

***In vivo* analysis**

Cardiac function was assessed by echocardiography (Vivid7Pro, GE Medical Systems, USA). LV mass (LVM), LV shortening fraction (SF), end-diastolic and end-systolic LV dimension (LVEDd and LVEDs) were

measured.[3] Electrocardiograms (ECGs) were recorded by telemetry (DSI, St. Paul, MN).[3] We have taken care to respect the Lambeth conventions from the housing of animal to determination of arrhythmic events.[4] ECG signals were digitally filtered between 0.1 and 1,000 Hz. Heart rate variability (HRV), PR, QRS, corrected QT (QTc) intervals and arrhythmias were analyzed using 12h nocturnal ECGs (ECG-auto, EMKA Technologies, France).[5] The QT interval was defined as the time between the first deviation from an isoelectric PR interval until the return of the ventricular repolarisation to the isoelectric TP baseline from lead II ECGs. The QT correction was performed with the adapted Bazett's formula of Mitchell.[6] To assess the variability of the ventricular repolarization (an index of proarrhythmic outcome), we evaluated the QT interval variability.[7] The mean orthogonal distance from diagonal to the points of the Poincaré plots was calculated and referred as short term variability of QT (QTSTV) by using the formula $QT_{STV}=\sum|QT_n-QT_{n-1}|/(50\times\sqrt{2})$ [8, 9]. Only sinus beats were included in the analysis (60 analyses of 1 min every 2 minutes/ 2hours ≈ 40,000 analyzed QRST complexes). To test arrhythmogenic susceptibility, the β-adrenergic catecholamine isoproterenol was injected 4 weeks after the end of the treatment periods. The triggering of sustained ventricular tachycardia (SVT), as defined by the Lambeth conventions (more than 20 successive irregular beats), was monitored. Blood pressure (systolic, sBP; diastolic, dBP, mean arterial pressure, MAP, in mmHg) was measured non-invasively just before the end of all treatments, with a tail cuff and pulse transducer (ML125/M NIBP System, ADInstruments, United-Kingdom). Measurements were performed in triplicate in conscious restrained mice after an acclimatization period of 3 weeks.

Autopsy and heart excision

After euthanasia, autopsies were performed to verify for the presence of pleural effusion. The heart and lungs were excised and weighed, and the heart weight index (HWI) determined (heart weight/body weight). Lung congestion was established when the lung weight exceeded the mean lung weight of WT animals ± 2 SD.[5] Interstitial fibrosis was measured in 10 μm thick transverse sections of mouse hearts in the peri-infarcted area (Hematoxylin-eosin and Sirius red staining). Results indicate the area of Sirius red-stained tissue (percentage of total area of myocardial tissue).

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted from 25mg of LV tissue using TRIzol reagent (Euromedex, France), and treated with DNase I at 37 °C for 30 min. cDNA was synthesized using superscript II reverse transcriptase (Invitrogen,

France) at 42°C for 50 min. RT-qPCR was performed in duplicate (LightCycler , Roche, France). The reaction mixture (20µl) contained 10µl of Absolute qPCR SYBR Green Capillary Mix (Thermo Fisher Scientific), to which were added 0.5µM of the appropriate primer mix and 5µl of cDNA. Forward and reverse primers for each gene were chosen based on published sequences as follows: myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) - forward/reverse; CGTGCTCAATGCCTTC/GGCGGATCATTCACTCT; serum response factor (SRF) - forward/reverse TTGTCCCAGCCTGGTTCTCCA/ATCTGCTGAAATCTCTCCACTCTG. Amplification included an initial denaturation step at 95°C for 15 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 1s, annealing at 65°C for 10s, and extension at 72°C for 20s. Melting curves were used to determine the specificity of PCR products. Data were normalized to GAPDH (8 mice per group).

Ca^{2+} handling

Ca^{2+} experiments were performed on freshly isolated LV myocytes. The mouse was euthanized by cervical dislocation, after which the heart rapidly was excised and retrogradely perfused (Langendorff perfusion) at 37°C for 6–8 min with a modified tyrode solution [113m NaCl, 4.7 mM, KCL, 0.6mM KH2PO4, 0.6 mM Na2HPO4, 1.2 mM MgSO4, 12 mM NaHCO3, 10 mM KHCO3, 10 mM Hepes, 30 mM Taurine (pH 7.4)] containing 0.1g.ml^{-1} Liberase Dispase High Research Grade (Roche, France) perfusion. Cells were kept in 1.8 mM Ca^{2+} (20-22°C) before starting experiments. There were no differences between age groups. To monitor intracellular Ca^{2+} concentration, cardiomyocytes were loaded with the fluorescent ratiometric Ca^{2+} indicator Indo-1AM (10 µM, Invitrogen, France). Cells were field-stimulated at 1.0Hz with 1-ms current pulses delivered via two platinum electrodes, one on each side of the perfusion chamber (IonOptix system, Hilton, USA) (20V, 1 ms) and simultaneously illuminated at 305 nm using a xenon arc bulb light.[3] Indo-1AM fluorescence emitted at 405 nm and 480nm was recorded simultaneously and Ca^{2+} fluorescence was measured during a 30s pacing period (1.0Hz), followed by a 30s rest period. Diastolic Ca^{2+} levels and the number of cells developing spontaneous irregular Ca^{2+} waves were quantified during the rest period.[3] Ca^{2+} concentration was estimated through the fluorescence ratio (F405/F480). Ca^{2+} transient decay time (t) was measured by fitting the descending phase of the fluorescence trace to a single exponential function. Ca^{2+} sparks were recorded in quiescent cells incubated with Fluo-4AM (5µM, 1.5ms/line; LSM510 Zeiss confocal microscope, 63X water-immersion objective, NA: 1.2) at 25°C.[3] Fluorescence was excited at 488 nm and emission was collected through a 505-nm long-pass filter. Cell volume was estimated using Z-stack (x-y projection, front view) image acquisition.[2] Data were analyzed using *ImageJ* and *SparkMaster*.

Ca^{2+} handling proteins

LV were homogenized directly into lysis buffer (20 mM HEPES pH7.4, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 0.3% CHAPS, 1 mM PMSF, 1µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 1 mM EDTA). Lysates were centrifugated at 6,000 x g for 5 min. Proteins were quantified with DC Protein Assay (Biorad). Fifty micrograms of total proteins were loaded on SDS-PAGE. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane (0.2 µm) (GE Healthcare). The membranes were blocked (Blocking buffer from Thermoscientific) and then incubated with primary antibody at 4°C overnight: the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase SERCA2a (1:5,000) (A010-20, Badrilla), the Na^{+}-Ca^{2+} exchanger NCX1 (1:1,000) (R3F1, Swant), the ryanodine receptor RyR2 (1:1,000) (Covalab, France), its phosphorylated form, PhosphoSer2808-RyR-2 (1:1,000) (A010-30, Badrilla, UK), phospholamban (1:20,000) (A010-14, Badrilla) and its phosphorylated form PhosphoSer16-PLB (1:5,000) (A010-12, Badrilla) and the Ca^{2+}-binding protein S100A1 (1:2,500) (SP5355P, Acris antibodies GmbH, Germany). Protein levels were expressed relative to GAPDH (1:60,000) (ab8245, Abcam, France). The membranes were then incubated with secondary antibody: anti-rabbit 800 nm (1:30,000) (for SERCA2a, PhosphoPLB, RyR2, PhosphoRyR2 and S100A1) or anti-mouse 800 nm (1:30,000) (for NCX1, PLB and GAPDH) for 1h in the dark. After the final washes, the membranes were scanned by using Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences).

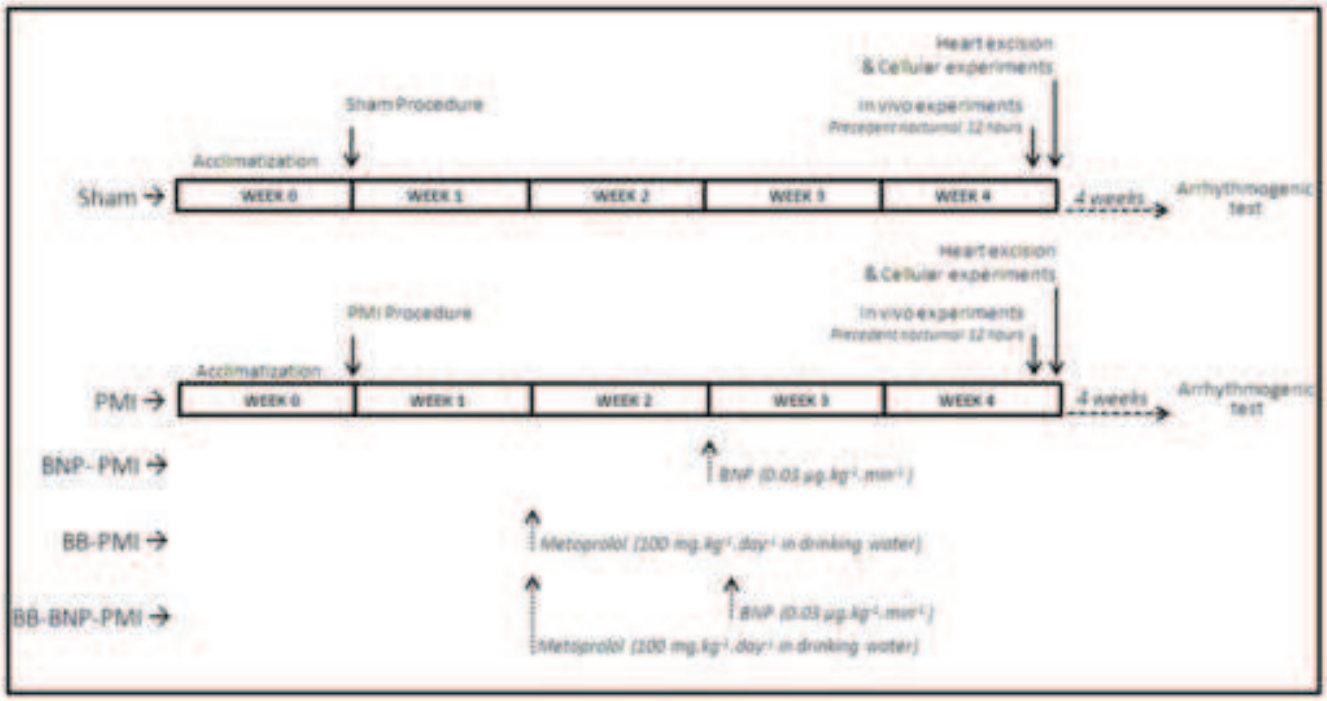
Statistical analysis

All data are reported as means±SD. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism and Origin Softwares. One-way ANOVA for multiple comparisons was used, followed by a parametric t-test with Bonferroni's correction. Percentage data were analyzed by a *chi-square* test. A p-value of 0.05 or less indicated a statistically significant difference.

References

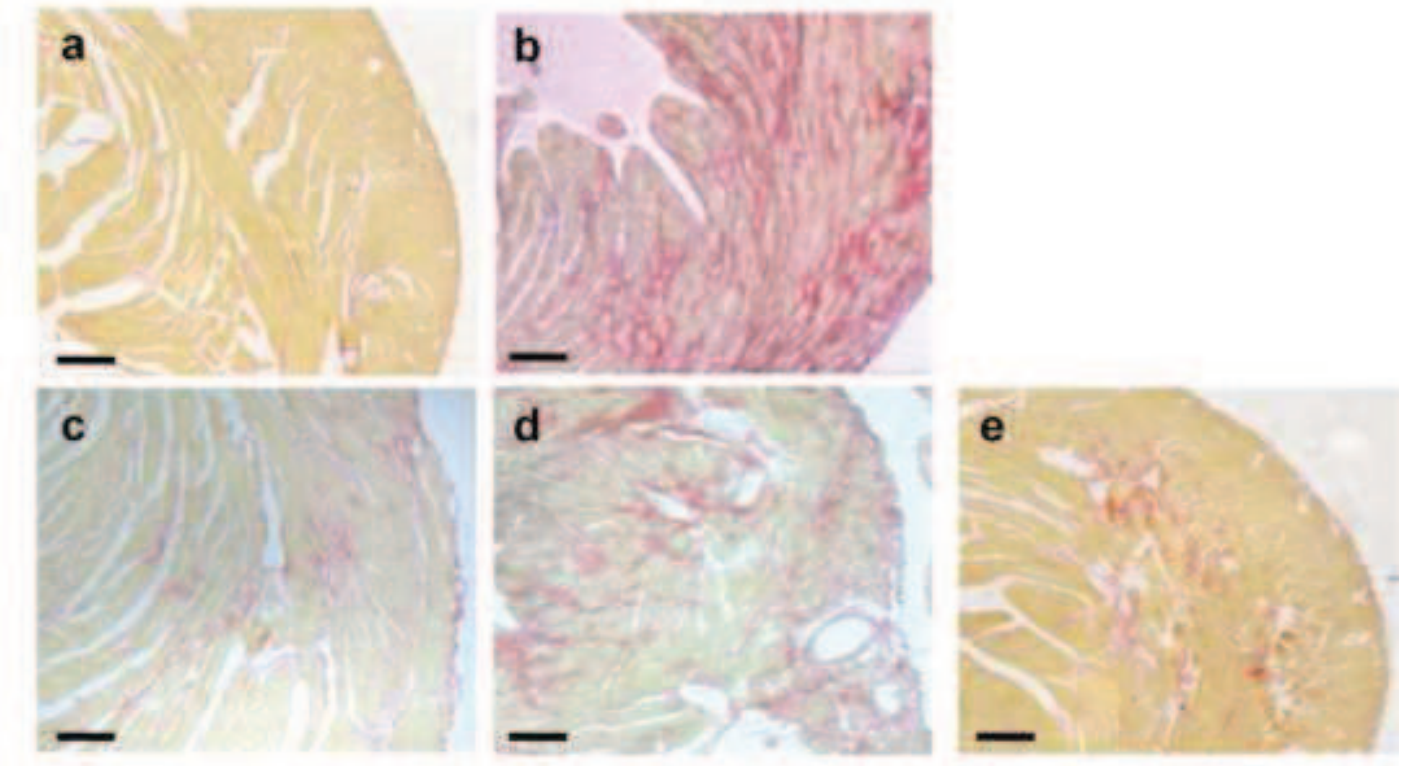
1. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004;**16**:349-360.
2. Thireau J, Karam S, Fauconnier J, Roberge S, Cassan C, Cazorla O*, et al.* Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:59-68.
3. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, Cassan C, Richard S, Matecki S*, et al.* Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:1559-1564.
4. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM*, et al.* The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988;**22**:447-455.
5. Thireau J, Aimond F, Poisson D, Zhang B, Bruneval P, Eder V*, et al.* New insights into sexual dimorphism during progression of heart failure and rhythm disorders. *Endocrinology* 2010;**151**:1837-1845.
6. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 1998;**274**:H747-751.
7. Vormberge T, Hoffmann M, Himmel H. Safety pharmacology assessment of drug-induced QT-prolongation in dogs with reduced repolarization reserve. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006;**54**:130-140.
8. Brennan M, Palaniswami M, Kamen P. Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans Biomed Eng* 2001;**48**:1342-1347.
9. van der Linde H, Van de Water A, Loots W, Van Deuren B, Lu HR, Van Ammel K*, et al.* A new method to calculate the beat-to-beat instability of QT duration in drug-induced long QT in anesthetized dogs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;**52**:168-177.

Supplementary Material - Figure 1



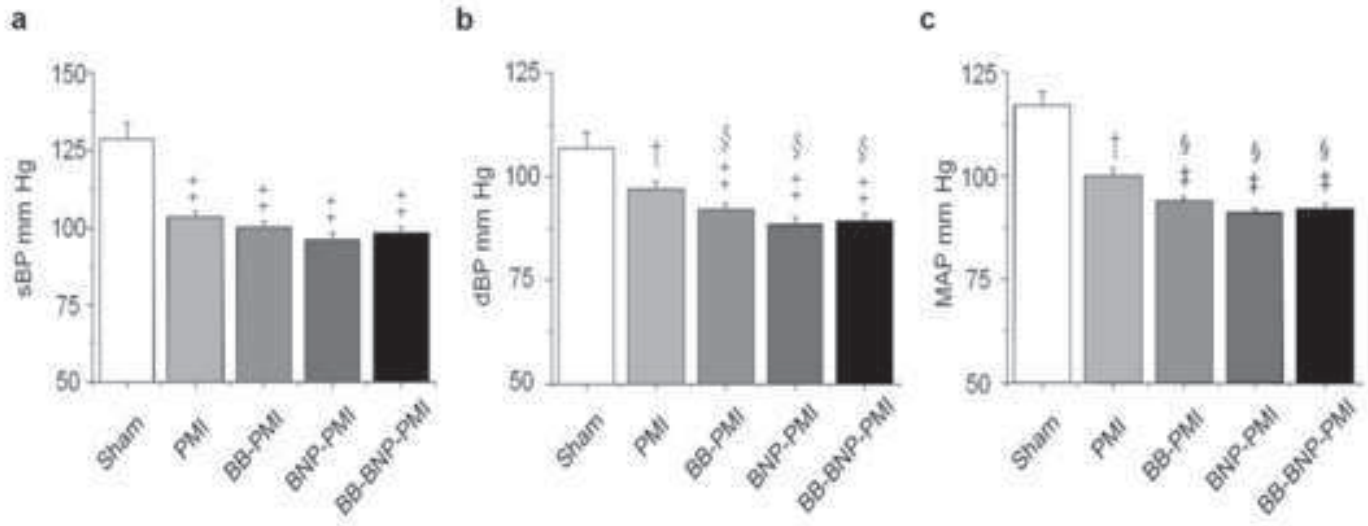
Supplementary Figure S1.
Thireau et al.

Supplementary Material - Figure 2

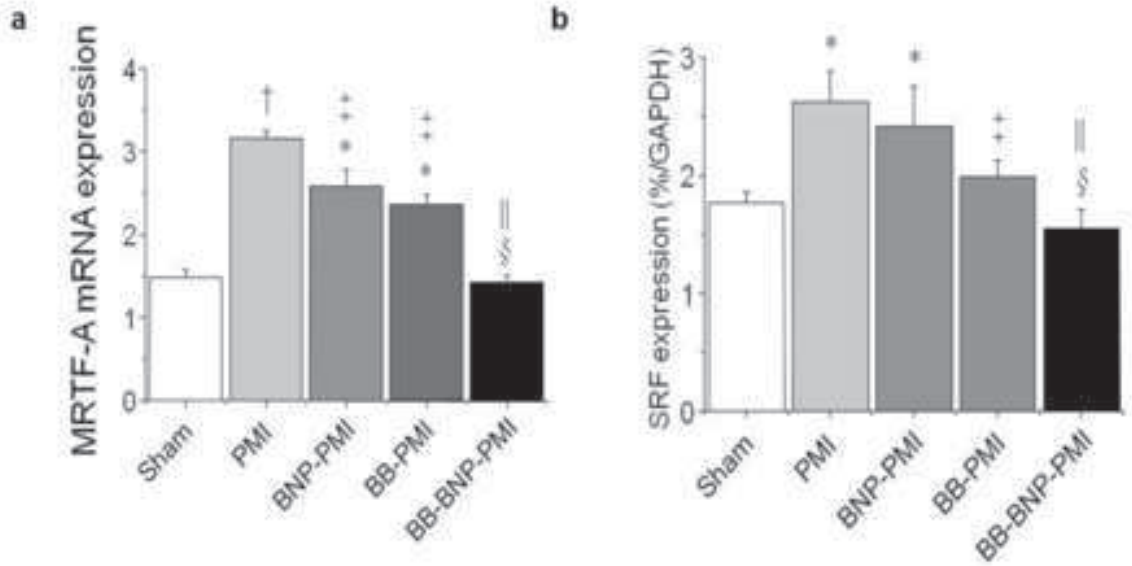


Supplementary Figure S2.
Thireau et al.

Supplementary Material - Figure 3



Supplementary Figure S3.
Thireau et al.



Supplementary Figure S4.
Thireau et al.

Résumé

Le peptide natriurétique de type B (BNP) est une hormone cardiaque fortement impliquée dans l'insuffisance cardiaque (IC). En clinique, le BNP est un bio-marqueur de diagnostic et de pronostic de l'IC ; son taux sanguin augmentant avec la progression du remodelage cardiaque, de la dysfonction du ventricule gauche (VG) et des altérations du couplage excitation-contraction (CEC). Administré à des patients en IC aiguë décompensée sous une forme recombinante, le nésiritide, pour ses effets hémodynamiques vasorelaxants, il a montré des effets controversés avec un risque d'augmentation de la mortalité. Pour comprendre l'implication du BNP dans le remodelage cardiaque post-ischémique et ses limites thérapeutiques, nous avons étudié les effets cardiaques *in vivo* et sur le CEC d'un traitement chronique au BNP (0,03 µg/kg/min) sur deux groupes expérimentaux: i) des souris saines, Sham, pendant 14 jours et ii) des souris PMI (*Post-Myocardial Infarction*) en stade précoce, après ligature de l'artère coronaire gauche (pendant 7 et 14 jours). Chez les Sham, le BNP a engendré une suractivation du système nerveux sympathique, une hypertrophie cardiaque, des altérations électrophysiologiques *in vivo* et des mouvements calciques dans les cardiomyocytes du VG, à l'origine d'arythmies cellulaires et cardiaques. Les effets délétères du BNP ont été prévenus par une combinaison de ce traitement avec un bêta1-bloqueur: le métoprolol. Chez les PMI, la supplémentation en BNP a réduit l'inotropisme positif précoce induit par une modification des mouvements calciques, a accéléré l'apparition des altérations des protéines du CEC et la survenue des arythmies. Le BNP accélère la décompensation cardiaque et pourrait être à déconseiller, du moins en monothérapie, en traitement clinique.

Title: Chronic cardiac effects of b-type natriuretic peptide (BNP) on healthy and post-ischemic cardiac remodeling: excitation-contraction coupling, arrhythmias and therapeutic aspects

Abstract

BNP is a natriuretic peptide released in excess in the blood during heart failure (HF) to reduce blood volume and pressure. A recombinant form of human BNP, nesiritide, is used for patients with acute decompensated HF but deleterious cardiac effects have been reported. We aimed to investigate the cardiac effects of chronic BNP supplementation (0.03 µg/kg/min) on: i) healthy mice (Sham) for 14 days and ii) mice subjected to myocardial infarction (MI) induced by coronary artery ligation (PMI) for 7 (D7) and (D14) 14 days. Sham treated animals (Sham-BNP) showed an increase in ventricular arrhythmias occurrence in consequence of sympathetic tone increase and Ca^{2+} handling alterations observed at cellular and protein levels in the left ventricle (LV). Most of these effects were reduced in Sham-BNP by the selective beta1-adrenergic blocker metoprolol. In the PMI group, at early stages after ligation, we showed an increase in cardiomyocytes contraction and Ca^{2+} handling at D7 and D14. But this response was attenuated in PMI-BNP. In PMI, alterations in Ca^{2+} handling proteins, particularly SERCA2a and RyR2 appeared at D14 but not D7. But BNP supplementation accelerated these alterations which appeared since D7 in the PMI-BNP group, in parallel with spontaneous arrhythmias occurrence at D7. BNP infusion attenuates compensatory "inotropism" intrinsic to the LV cardiomyocytes and promotes arrhythmias. Our results show that BNP, at least in monotherapy, may be hazardous for the treatment of patients with decompensated HF.

Discipline: Physiopathologie cardiaque

Mots-clés: peptide natriurétique, nésiritide, remodelage cardiaque, calcium, couplage excitation-contraction, arythmies.

Laboratoire: Physiologie & Médecine expérimentale du Cœur et des Muscles, INSERM U1046.
371 Avenue du Doyen G. Giraud, CHU Arnaud de Villeneuve, Bât. Crastes de Paulet, 34295 Montpellier, France.