

Université de Montréal

**Remodelage électrique cardiaque chez les souris transgéniques  
surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II**

Par  
Katy Rivard

Université de Montréal  
Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences (M.Sc.)  
En Sciences Pharmaceutiques  
Option Pharmacologie

Octobre 2006

© Katy Rivard, 2006



QV

705

U58

2007

V.002

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Remodelage électrique cardiaque chez les souris transgéniques  
surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II

Présenté par :  
Katy Rivard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sylvie Marleau	Présidente rapporteur
Dr Céline Fiset	Directrice de recherche
Dr Jocelyn Dupuis	Membre du Jury

## Résumé

La surexpression cardiaque du récepteur de type 1 humain de l'angiotensine II (Ang II) chez la souris (nommée souris AT1R) amène de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque. De plus, ces souris meurent prématurément, suggérant qu'en conditions pathologiques, l'Ang II pourrait contribuer à la mort subite par l'induction d'arythmies cardiaques. Puisqu'un retard de la repolarisation est un facteur de risque d'arythmies, nous avons caractérisé la repolarisation ventriculaire des souris AT1R afin d'établir s'il existe un lien entre l'Ang II, un retard de repolarisation et la survenue d'arythmies.

Les résultats ont montré que comparativement aux souris témoins (contrôles, Ctl) du même âge (6-8 mois), les souris AT1R présentent une prolongation de l'intervalle QTc (Ctl:  $53.6 \pm 1.5$  ms,  $n = 7$ ; AT1R:  $64.2 \pm 1.4$  ms,  $n = 7$ ,  $p = 0.0007$ ) ainsi que de la durée du potentiel d'action ( $APD_{90}$ , Ctl:  $19.0 \pm 1.8$  ms,  $n = 11$ ; AT1R:  $39.1 \pm 4.7$  ms,  $n = 10$ ,  $p = 0.0005$ ). Nous avons étudié les courants  $K^+$  ventriculaires et leurs canaux potassiques correspondants (entre parenthèse) : (1) transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$ ,  $I_{to}$  (Kv4.2 / Kv4.3), (2) à rectification retardée ultrarapide,  $I_{Kur}$  (Kv1.5), (3) sortant à l'équilibre,  $I_{ss}$  (Kv2.1) et (4) à rectification entrante,  $I_{K1}$  (Kir2.1). Comparés aux Ctl, les courants  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{K1}$  des AT1R sont diminués alors que  $I_{ss}$  est semblable entre les deux groupes. De même, l'expression protéique des canaux Kv4.2, Kv1.5 et Kir2.1 est diminuée chez les AT1R, alors que l'expression de Kv4.3 et Kv2.1 n'est pas changée. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris AT1R âgées de 50 jours ne présentant pas de signe d'hypertrophie cardiaque.

En conclusion, le retard de repolarisation observé chez les souris AT1R serait dû à une diminution des courants  $K^+$  et pourrait expliquer l'incidence accrue d'arythmies et de mort subite chez ces souris. Le retard de repolarisation aussi observé chez les souris de 50 jours suggère que ces troubles seraient dus à la stimulation chronique du récepteur AT1.

Mots clés : Angiotensine II, courants potassiques, repolarisation ventriculaire, souris, arythmies.

## Abstract

Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II (AngII) receptor in mice (AT1R) leads to the development of hypertrophy and heart failure. Moreover, AT1R mice died prematurely suggesting that under pathological conditions angiotensin II might contribute to cardiac sudden death by promoting ventricular arrhythmias. Since delayed repolarization is an important risk factor for the development of ventricular arrhythmias, we characterized ventricular repolarization of AT1R mice to establish whether there is a relationship between angiotensin II, delayed repolarization and ventricular arrhythmia.

Our results show that compare to age-matched (6-8 month old) controls (Ctl), AT1R transgenic mice had a prolongation of the QTc interval (Ctl:  $53.6 \pm 1.5$  ms,  $n = 7$ ; AT1R:  $64.2 \pm 1.4$  ms,  $n = 7$ ,  $p = 0.0007$ ) and of the action potential duration (APD) (APD<sub>90</sub>, Ctl:  $19.0 \pm 1.8$  ms,  $n = 11$ ; AT1R:  $39.1 \pm 4.7$  ms,  $n = 10$ ,  $p = 0.0005$ ). We then studied the functional K<sup>+</sup> currents (and their K<sup>+</sup> channels) involved in repolarization in mouse ventricle, corresponding to: (1) the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current, I<sub>to</sub> (Kv4.2 / Kv4.3), (2) the ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current, I<sub>Kur</sub> (Kv1.5), (3) the steady-state K<sup>+</sup> current, I<sub>ss</sub> (Kv2.1) and (4) the inward rectifier K<sup>+</sup> current, I<sub>K1</sub> (Kir2.1). Compared to Ctl, I<sub>to</sub>, I<sub>Kur</sub> and I<sub>K1</sub> were decreased in AT1R cardiac myocytes, whereas I<sub>ss</sub> was comparable in both groups. In line with these results, expression levels of Kv4.2, Kv1.5 and Kir2.1 were decreased in AT1R while there was no difference in protein expression for Kv4.3 and Kv2.1. Similar results were obtained in 50 days old AT1R mice, which do not present sign of cardiac hypertrophy.

Delayed repolarization which is caused by a decreased density of K<sup>+</sup> currents might contribute to explain the increased incidence of cardiac sudden death reported in mice overexpressing the human type 1 angiotensin II receptor. Delayed repolarization observed in young AT1R mice suggests that repolarization defects might be due to chronic stimulation of AT1 receptor.

Key words: Angiotensin II, potassium currents, ventricular repolarization, mouse, arrhythmias.

## Table des Matières

<b>Chapitre 1 : Introduction.....</b>	<b>14</b>
1.1 Les paramètres de l'excitabilité cardiaque.....	14
1.1.1 Le potentiel d'action ventriculaire humain.....	14
1.1.2 Les courants potassiques ventriculaires chez l'homme.....	16
1.1.2.1 Les canaux potassiques.....	16
1.1.2.2 Le courant $K^+$ transitoire sortant : $I_{to}$ .....	17
1.1.2.3 Les courants $K^+$ à rectification sortante retardée : $I_k$ .....	18
1.1.2.4 Le courant à rectification entrante : $I_{K1}$ .....	18
1.1.2.5 Les courants $K^+$ ventriculaires chez la souris.....	18
1.1.3 L'électrocardiogramme.....	19
1.1.4 L'intervalle QT.....	20
1.1.4.1 La correction de l'intervalle QT.....	21
1.1.4.2 La prolongation de l'intervalle QT.....	22
1.1.5 Les arythmies cardiaques.....	23
1.1.5.1 Généralités et facteurs de risque d'arythmies cardiaques.....	23
1.1.5.2 Origine des arythmies.....	23
1.1.5.3 Les arythmies ventriculaires.....	24
1.2 L'angiotensine II.....	27
1.2.1 Historique de l'angiotensine II.....	27
1.2.2 Le système rénine-angiotensine.....	27
1.2.2.1 La biosynthèse de l'angiotensine II.....	27
1.2.2.2 Le système rénine-angiotensine local.....	28
1.2.3 Les récepteurs de l'angiotensine II.....	29
1.2.3.1 Les différents types de récepteurs à l'angiotensine II.....	29
1.2.3.2 Le récepteur AT1.....	29
1.2.3.3 Le récepteur AT2.....	30
1.2.3.4 Configuration des récepteurs de l'angiotensine II.....	31
1.2.3.5 La signalisation intracellulaire.....	31
1.2.3.6 Signalisation intracellulaire associée aux protéines G.....	32

1.2.3.7	Signalisation intracellulaire indépendante des protéines G.....	33
1.2.4	Le rôle de l'angiotensine II.....	34
1.2.4.1	Rôle physiologique et pathologique de l'angiotensine II.....	34
1.2.4.2	Effets pathologiques indirects de l'angiotensine II au niveau cardiaque.....	35
1.2.4.3	Effets pathologiques spécifiques de l'angiotensine II au niveau cardiaque.....	36
1.2.5	Le modèle de souris AT1R.....	37
1.2.5.1	Généralités.....	37
1.2.5.2	Profil cardiovasculaire des souris AT1R.....	39
1.3	Résumé des connaissances et buts de l'étude.....	40
1.3.1	Connaissances sur le sujet.....	40
1.3.2	Hypothèses et objectifs de recherche.....	40
<b>Chapitre 2 : Article.....</b>		<b>41</b>
<b>Chapitre 3 : Discussion et conclusion.....</b>		<b>74</b>
3.1	Étude de la repolarisation ventriculaire chez les souris mâles AT1R de plus de six mois.....	74
3.1.1	Résumé des principaux résultats.....	74
3.1.2	Effets de l'angiotensine II sur les courants $K^+$ dans la littérature.....	74
3.1.2.1	Le courant $K^+$ transitoire sortant, $I_{to}$ .....	74
3.1.2.2	Les courants $K^+$ à rectification retardée sortante.....	75
3.1.2.3	Le courant à rectification entrante $I_{K1}$ .....	75
3.1.2.4	Mécanismes d'action des effets de l'angiotensine II sur les courants $K^+$ .....	75
3.1.2.5	Récepteurs et signalisation intracellulaire.....	76
3.1.2.6	Lien entre la littérature et les résultats obtenus chez les souris AT1R.....	77
3.1.3	Caractérisation du phénotype pathologique cardiaque des souris AT1R âgées de 6-8 mois.....	77



3.2	Les souris mâles AT1R/AT1aR-KO.....	80
3.2.1	Le modèle de souris AT1R/AT1aR-KO.....	80
3.2.2	Étude de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R/AT1aR-KO.....	80
3.3	Les souris AT1R de 50 jours.....	82
3.3.1	Le modèle de souris AT1R à 50 jours.....	82
3.3.2	Étude de la repolarisation ventriculaire des mâles AT1R de cinquante jours...	82
3.4	Comparaison de la repolarisation ventriculaire chez les groupes de mâles AT1R de 6-8 mois et de 50 jours.....	85
3.4.1	Les courants $I_{to}$ et $I_{Kur}$ .....	85
3.4.1.1	Effets de l'hypertrophie sur $I_{to}$ dans la littérature.....	85
3.4.1.2	Effets de l'hypertrophie sur les courants $K^+$ à rectification sortante retardée ( $I_K$ ) dans la littérature.....	86
3.4.2	Le courant à rectification sortante $I_{K1}$ .....	87
3.4.3	Particularité du courant $I_{ss}$ .....	88
3.4.4	Comparaison des troubles de repolarisation à 6-8 mois et à 50 jours.....	88
3.4.5	Variabilité des effets observés sur les courants $K^+$ par les différents groupes de recherche.....	89
3.5	Limitation de l'étude et extrapolation des résultats obtenus à partir du modèle de souris transgénique AT1R.....	90
3.5.1	La souris comme modèle d'étude.....	90
3.5.2	Le modèle transgénique.....	90
3.5.3	Limitation expérimentale.....	91
3.5.4	Les avantages du modèle transgénique AT1R.....	92
3.6	Perspectives.....	92
3.6.1	Étude des différences mâle/femelle.....	93
3.6.2	Voie(s) de signalisation intracellulaire impliquée(s).....	93
3.6.3	Réversibilité des mécanismes d'action.....	94
3.7	Conclusion.....	95
	Bibliographie.....	96

## Liste des Figures

### Chapitre 1

Figure 1.1 : Le potentiel d'action ventriculaire chez l'homme et les différents courants ioniques impliqués.....	16
Figure 1.2 : Conformation des canaux $K^+$ cardiaques.....	17
Figure 1.3 : Comparaison des courants potassiques du potentiel d'action chez l'homme et la souris.....	19
Figure 1.4 : Illustration de l'ECG.....	21
Figure 1.5 : Prolongation de la repolarisation.....	25
Figure 1.6 : Exemple d'enregistrements d'arythmies ventriculaires.....	26
Figure 1.7 : Cascade de la biosynthèse de l'angiotensine II.....	28
Figure 1.8 : Structure secondaire du récepteur de type 1 de l'angiotensine II.....	31
Figure 1.9 : Voies de signalisation intracellulaire associées à AT1.....	33
Figure 1.10 : Les différents effets de l'activation du récepteur de type 1 de l'angiotensine II...	34
Figure 1.11 : Représentation du transgène des souris AT1R.....	38

### Chapitre 2

Figure 1: Comparison of ventricular repolarization between 6-8 month old CTL and AT1R mice.....	62
Figure 2: Comparison of the action potential duration (APD) between AT1R and there CTL littermate mice.....	63
Figure 3: Total $K^+$ current recorded in CTL and AT1R ventricular myocytes.....	64
Figure 4: Comparison of the $Ca^{2+}$ -independent transient outward $K^+$ current ( $I_{to}$ ) between CTL and AT1R ventricular myocytes.....	65
Figure 5: Comparison of the ultra-rapid delayed rectifier $K^+$ current ( $I_{Kur}$ ) between CTL and AT1R myocytes.....	66

Figure 6: Comparison of the steady-state outward  $K^+$  current ( $I_{ss}$ ) and the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) between CTL and AT1R mouse ventricular myocytes.....67

Figure 7: Steady-state inactivation and reactivation of  $I_{to}$  in CTL and AT1R mouse ventricular myocytes.....68

Figure 8: Comparison of  $K^+$  channels protein expression in CTL and AT1R ventricle.....69

### Chapitre 3

Figure 3.1 : Caractérisation du phénotype pathologique cardiaque des souris AT1R de 6-8 mois .....79

Figure 3.2 : Étude de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R/AT1aR-KO de 6-8 mois .....81

Figure 3.3 : Comparaison de la repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R âgées de 50 jours et 6-8 mois.....83

Figure 3.4 : Séparation des courants  $K^+$  ventriculaires chez les souris AT1R de 50 jours.....84

## Liste des abbreviations

4-AP	:	4-aminopyridine
ACE	:	"Angiotensin converting enzyme"
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
APD <sub>xx</sub>	:	Durée du potentiel d'action
ATP	:	Adénosine triphosphate
Ang I	:	Angiotensine I
Ang II	:	Angiotensine II
ARA	:	Antagoniste du récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT1	:	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT1a	:	Sous-type a du récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT1aR-KO	:	Souris n'exprimant pas le sous-type a du récepteur de type 1 sauvage
AT1b	:	Sous-type b du récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT1R	:	Souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT2	:	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
BSA	:	sérum d'albumine bovine ("bovin serum albumin")
Ca <sup>2+</sup>	:	Calcium / Calcique
CTL	:	control
DAG	:	Diacylglycérol
ECA	:	enzyme de conversion de l'angiotensine
ECG	:	electrocardiogramme
FV	:	Fibrillation ventriculaire
His	:	Histidine
Hz	:	Hertz
I <sub>Kr</sub>	:	Composante rapide du courant K <sup>+</sup> à rectification retardée
I <sub>Ks</sub>	:	Composante lente du courant K <sup>+</sup> à rectification retardée
I <sub>Kur</sub>	:	Courant potassique à rectification retardée ultra rapide sensible au calcium ("ultrarapid delayed rectifier")
I <sub>Kslow</sub>	:	I <sub>Kur</sub> + I <sub>ss</sub>
I <sub>ss</sub>	:	Courant K <sup>+</sup> sortant à l'équilibre ("steady-state")
I <sub>to</sub>	:	Courant K <sup>+</sup> transitoire sortant ("transient outward")
I <sub>peak</sub>	:	Courant K <sup>+</sup> total
I <sub>K1</sub>	:	Courant K <sup>+</sup> à rectification entrante ("inward rectifier")
IECA	:	Inhibiteur de l'enzyme conversion de l'angiotensine II
IP <sub>3</sub>	:	Inositol-1,4,5-trisphosphate
Jrs	:	Jours
K <sup>+</sup>	:	Potassium / potassique
KB	:	Solution Kraft-Brühe
Kir	:	Canaux potassiques à rectification entrante ("inward rectifier")
Kv	:	Canaux potassiques dépendant du voltage ("voltage-dependent")
LVIDd	:	Dimension interne du ventricule gauche en diastole
LVIDs	:	Dimension interne du ventricule gauche en systole
αMHC	:	Chaîne lourde de myosine α ("α myosin heavy chain")
mo	:	Mois
ml	:	Millilitre

mM	:	Millimolaire
MMP-1	:	Métalloprotéinase 1
MΩ	:	Méga Ohms
ms	:	Milliseconde
mv	:	Millivolts
Na <sup>+</sup>	:	Sodium / sodique
NB	:	Nombre
nA	:	Nanoampère
PCR	:	Réaction en chaîne de Polymérase (« polymerase chain reaction »)
pF	:	Picofarade
Phe	:	Phénylalanine
PIP <sub>2</sub>	:	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	:	Protéine kinase A
PKC	:	Protéine kinase C
PLC	:	Phospholipase C
PT	:	Poids total des souris(masse corporelle)
QT	:	Intervalle QT
QTc	:	Intervalle QT corrigé par le rythme cardiaque
RAS	:	Système rénine-angiotensine
Ser	:	Sérine
SHR(rat)	:	Lignée de rat spontanément hypertendus
SLQT	:	Syndrome du long QT ("long QT syndrome, LQTS")
STZ	:	Streptozotocine
Tdp	:	Torsade de pointe
TG	:	Transgénique
TV	:	Tachycardie ventriculaire
Tyr	:	Tyrosine
μM	:	Micromolaire
VG	:	Ventricule gauche
WT	:	Souris de type sauvage (« Wild-type »)

Je dédie ce mémoire à  
Tous les êtres chers qui m'entourent  
Amour, Amis(es) et parents  
Qui font que la vie est si belle!

## Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier ma directrice de maîtrise, Dr Céline Fiset qui a su bien m'encadrer tout au long de ces deux dernières années. Sa patience, sa grande accessibilité, son excellent esprit formateur et son grand savoir ont su me stimuler à repousser mes limites et ont attisé mon intérêt pour la recherche.

Cette étude n'aurait pas été possible sans la collaboration des Drs Mona Nemer et Pierre Paradis de l'Institut de recherche clinique de Montréal (IRCM). Je les remercie pour leur aide très précieuse, leur soutien ainsi que pour les nombreuses discussions qui ont fait que mon projet est devenu tellement stimulant.

Merci au gens, présents et passés, du laboratoire. Merci à Marie-Andrée L. pour les conseils, les nombreuses discussions et tout l'aide (physique et morale) apportés au quotidien. Merci à Judith B. (pour l'aide, la coopération et la formation données) ainsi qu'à Frederic M., Gracia El-G, Chantale St-M., Scott G. et Anne-Louise M. pour tout le soutien apportée et tous les formidables moments passés. Merci aussi aux assistants et aux personne ressources des autres départements qui font parfois «presque parti» du labo (Marc-Antoine G., Louis V., Maya M. et toutes les personnes travaillant dans l'animalerie), pour leur aide, leur expertise et leur bonne humeur. Merci à tous les gens qui s'occupent du côté administratif et logistique de notre travail; je pense au personnel du centre de recherche de l'Institut de cardiologie et de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal (et plus spécialement à Andrée Mathieu); sans eux, tout serait tellement plus compliqué et parfois même impossible...

Je tiens à remercier spécialement et amoureusement mon chum, David, qui a toujours été là pour partager les petites et grandes victoire de ma maîtrise, mais aussi pour m'avoir soutenue et encouragée dans les moments plus difficiles. Merci aussi à mes parents, Lisette et Denis, ainsi qu'à mon « petit » frère (M-A) qui, malgré la distance qui nous sépare depuis les dernières années, ont eu une place importante pour moi tout au long de mon cheminement.

# Chapitre 1 : Introduction

En Amérique du nord, les maladies cardiovasculaires sont une des causes principales de mortalité autant chez les hommes que les femmes.<sup>1,2</sup> Parmi les troubles cardiaques les plus graves, il y a les arythmies qui diminuent l'activité du cœur, empêchent la circulation adéquate du sang et peuvent mener à la mort. Les troubles de repolarisation représentent un des facteurs de risque majeurs de la formation d'arythmies. Des facteurs génétiques ou pharmacologiques peuvent être la cause de ces troubles de repolarisation. Il est donc important de bien comprendre les caractéristiques électriques cardiaques associées à des pathologies cardiovasculaires ainsi que l'impact qu'ont certains agents pharmacologiques et certaines conditions physiques sur la repolarisation cardiaque afin de prévenir la survenue d'arythmies.

## 1.1 Les paramètres de l'excitabilité cardiaque

Le cœur bat normalement à un rythme constant qui lui permet de faire circuler le sang dans le but d'oxygéner et de nourrir tous les tissus. À la base, cette activité mécanique du cœur est contrôlée par des impulsions électriques.<sup>3,4</sup> Chacun des battements est créé par la propagation d'une onde d'excitation, la dépolarisation des cellules excitables, dans le but d'engendrer des potentiels d'action et de permettre la contraction du muscle cardiaque.

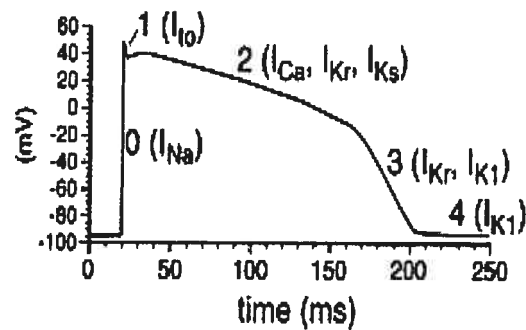
### 1.1.1 Le potentiel d'action ventriculaire humain

En conditions basales, la membrane cellulaire des cellules excitables, comme celle des cellules musculaires cardiaques et des neurones, est polarisée; c'est-à-dire que les charges ioniques et électriques sont distribuées de façon asymétrique de chaque côté de la membrane. Il y a ainsi plus de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule, alors que le potassium ( $\text{K}^+$ ) est en concentration supérieure à l'intérieur.<sup>5</sup> Ces différences de concentration créent des gradients ioniques. Des protéines transmembranaires, les canaux ioniques, servent à faire passer les ions d'un côté à l'autre de la membrane dépendamment de leur gradient ionique. Il existe plusieurs types de canaux ioniques qui s'ouvrent selon divers stimuli. Les canaux ioniques dépendants du voltage, activés suite à des changements de voltage, sont grandement impliqués dans la propagation de l'excitation dans les cellules musculaires



cardiaques. Normalement, la polarité de la membrane des cardiomyocytes est autour de  $-80$  mV, c'est-à-dire que le côté interne de la membrane cellulaire est plus négatif que l'extérieur. Suite à des changements de voltage, les canaux ioniques dépendant du voltage s'ouvrent pour laisser passer les ions selon leur gradient. La membrane se dépolarise lorsque ce potentiel de membrane augmente (devient plus positif) suite à l'entrée de charges positives dans la cellule et se repolarise par la sortie de charges positives.<sup>5</sup>

Le potentiel d'action est le phénomène électrique correspondant à la dépolarisation et à la repolarisation des cellules excitables qui permet la propagation de l'excitation et la contraction des cardiomyocytes.<sup>3,6</sup> Le potentiel d'action se produit en 5 phases, de 0 à 4, qui sont caractérisées par des changements de perméabilité ionique de la membrane cellulaire (Figure 1.1). En phase 0, les canaux sodiques s'ouvrent et causent l'entrée massive de  $\text{Na}^+$  qui dépolarise rapidement la membrane. La phase 1 se produit immédiatement après le pic de dépolarisation et elle est caractérisée par une courte phase de repolarisation. Cette repolarisation précoce est due à l'inactivation des courants  $\text{Na}^+$  et à l'activation d'un courant  $\text{K}^+$  sortant transitoire ( $I_{\text{to}}$ ). La phase 2, ou plateau, est la balance isoélectrique entre les différents courants ioniques actifs, soient le courant  $\text{Ca}^{2+}$  entrant de type-L ( $I_{\text{Ca-L}}$ ) et les courants  $\text{K}^+$  sortants. La phase majeure de repolarisation la phase 3, ramène le potentiel de membrane au repos et se produit alors que le courant  $\text{Ca}^{2+}$  s'inactivent et que les courants  $\text{K}^+$  sont les principaux courants actifs. Dans cette phase, deux courants  $\text{K}^+$  majeurs ont été identifiés au niveau des ventricules chez l'homme : les courants à rectification retardée  $I_{\text{Kr}}$  et  $I_{\text{Ks}}$ , qui correspondent respectivement à la composante rapide (r pour « rapid ») et lente (s pour « slow »). Le courant à rectification entrante,  $I_{\text{K1}}$ , est également présent dans la repolarisation terminale du potentiel d'action. Lorsque le potentiel de membrane est de retour au repos, le courant  $I_{\text{K1}}$ , en plus de participer à la repolarisation, maintient le potentiel de repos cellulaire stable. De plus, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ainsi que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ramènent les gradients ioniques à leurs niveaux de base, ce qui correspond à la phase 4. La cellule est alors prête pour le prochain potentiel d'action.<sup>5,7</sup>



**Figure 1.1 : Le potentiel d'action ventriculaire chez l'homme et les différents courants ioniques impliqués (Tirée de <sup>3</sup>)**

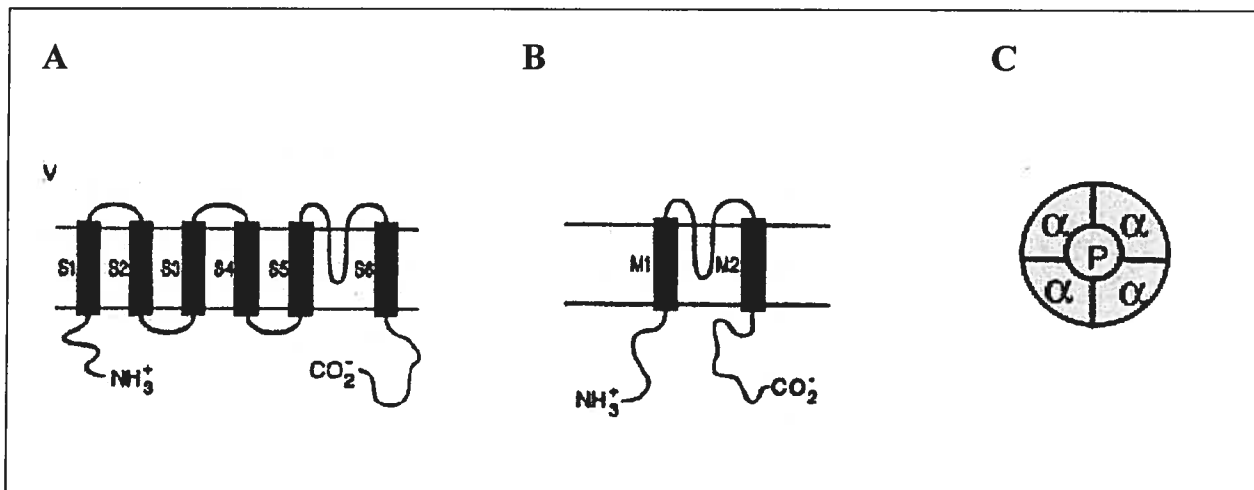
Le potentiel d'action cardiaque comprend 5 phases, de 0 à 4. La phase 0 est la dépolarisation membranaire causée par l'entrée massive de  $\text{Na}^+$ . La repolarisation rapide en phase 1 est due au courant  $\text{K}^+$  sortant  $I_{to}$ . Le plateau, ou phase 2 est l'équilibre entre les courants  $\text{Ca}^{2+}$  entrant et  $\text{K}^+$  sortant. La phase majeure de repolarisation, phase 3, se produit grâce à la sortie de  $\text{K}^+$  et finalement la phase 4 correspond au retour à la normale des différents gradients ioniques et au maintien stable du potentiel de membrane jusqu'à l'initiation du prochain potentiel d'action.

### 1.1.2 Les courants potassiques ventriculaires chez l'homme

Les courants  $\text{K}^+$  sortants sont indispensables à la repolarisation. Contrairement aux courants  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  impliqués dans le potentiel d'action, plusieurs courants potassiques sont présents dans les cardiomyocytes et sont activement impliqués dans plusieurs phases du potentiel d'action. La densité de ces courants  $\text{K}^+$  varie dépendamment de la région du cœur, du développement (de l'âge) et de l'espèce étudiée.<sup>8,9,10</sup> L'expression et la cinétique des courants  $\text{K}^+$  peuvent aussi être modulées par des facteurs hormonaux, neurohormonaux ou par certaines conditions pathologiques.<sup>7,11,12</sup>

#### 1.1.2.1 Les canaux potassiques

De façon générale, le canal ionique potassique proprement dit est formé de quatre sous-unités  $\alpha$ . Chacune de ces sous-unités est constituée de plusieurs domaines transmembranaires : six pour les canaux de type  $\text{Kv}$  (dépendant du voltage) et deux pour les canaux  $\text{Kir}$  (à rectification entrante ou inward rectifier) (Figure 1.2). Afin de former le pore transmembranaire nécessaire au passage spécifique des ions  $\text{K}^+$ , les sous-unités  $\alpha$  semblables s'associent sous forme de tétramères (Figure 1.2 C) Une autre sous-unité (la sous-unité  $\beta$ ) ne forme pas le canal, mais interagit avec la sous-unité  $\alpha$  afin de moduler les propriétés d'expression et cinétiques du canal.<sup>11</sup>



**Figure 1.2 : Conformation des canaux K<sup>+</sup> cardiaques (Adaptée de <sup>12</sup>)**

- A) Structure secondaire des canaux K<sup>+</sup> de type Kv
- B) Structure secondaire des canaux K<sup>+</sup> de type Kir
- C) Organisation des sous-unités  $\alpha$  sous forme de tétramères pour former le canal qui laissera passer les ions K<sup>+</sup>

Au niveau cardiaque, deux grands types de courants potassiques de repolarisation ont été caractérisés. Il y a le courant K<sup>+</sup> transitoire sortant ( $I_{to}$ , pour « transient outward ») et les courants K<sup>+</sup> à rectification sortante retardée ( $I_K$ ). Leur implication dans les différentes phases du potentiel d'action est directement associée à leurs dépendances au voltage et à leurs cinétiques d'activation et d'inactivation. (Figure 1.3).<sup>11,12</sup> La présence et la densité des divers courants K<sup>+</sup> sont dépendantes de l'espèce et de la région du cœur étudiées.<sup>12</sup> Puisque ce projet de maîtrise porte sur l'étude de la repolarisation ventriculaire, les prochaines sections traiteront plus particulièrement des courants K<sup>+</sup> retrouvés au niveau des cardiomyocytes ventriculaires chez l'homme.

### 1.1.2.2 Le courant K<sup>+</sup> transitoire sortant : $I_{to}$

Le courant  $I_{to}$  s'active et s'inactive rapidement. Il est spécifique aux ions K<sup>+</sup> et il n'est pas sensible aux variations de concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. On peut bloquer  $I_{to}$  avec le 4-aminopyridine (4-AP) à des concentrations élevées, de l'ordre du mM.<sup>13</sup>  $I_{to}$  peut être modulé de plusieurs façons. Par exemple, de façon neurohormonale par le récepteur  $\alpha$ -adrénergique ou encore, par l'hormone thyroïdienne.<sup>14</sup> Chez les mammifères de moyenne à grande taille, comme les humains,  $I_{to}$  est responsable de la phase rapide de repolarisation, la phase 1. Une variation de

densité de ce courant a un effet direct sur la durée du plateau.<sup>14</sup> Chez les espèces plus petites comme les souris, qui ont un rythme cardiaque de plus de 600 battements par minute,  $I_{to}$  joue un rôle très important dans la phase majeure de repolarisation. La base moléculaire de  $I_{to}$  est composée des protéines des canaux de type Kv4.X et Kv1.4. La composition moléculaire de ce courant est variable selon les espèces à l'étude; par exemple, chez l'homme et le chien,  $I_{to}$  est composé de Kv4.3, alors que chez certains rongeurs, ce courant est formé de deux types de sous-unités, Kv4.2 et Kv4.3.<sup>11,12,15,16,17</sup>

### 1.1.2.3 Les courants $K^+$ à rectification sortante retardée : $I_K$

Généralement, les courants à rectification sortante retardée ( $I_K$ ) s'activent et s'inactivent plus lentement que  $I_{to}$ . Le courant  $I_K$  est surtout présent dans les phases 2 et 3 du potentiel d'action et forme le principal courant de repolarisation. Contrairement à  $I_{to}$ ,  $I_K$  peut être divisé en plusieurs composantes. Chez l'homme, on retrouve  $I_{Kr}$  (la composante rapide) et  $I_{Ks}$  (la composante lente).<sup>7,12</sup>  $I_{Kr}$  s'active plus rapidement et à des voltages plus négatifs que  $I_{Ks}$ . Des études ont montré que les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , ERG et MirP1 interagissent ensemble et que leur association pourrait être responsable du courant  $I_{Kr}$ . Tandis que le courant  $I_{Ks}$  est formé par KvLQT1 et minK.<sup>3, 11, 12, 16, 18, 19</sup>

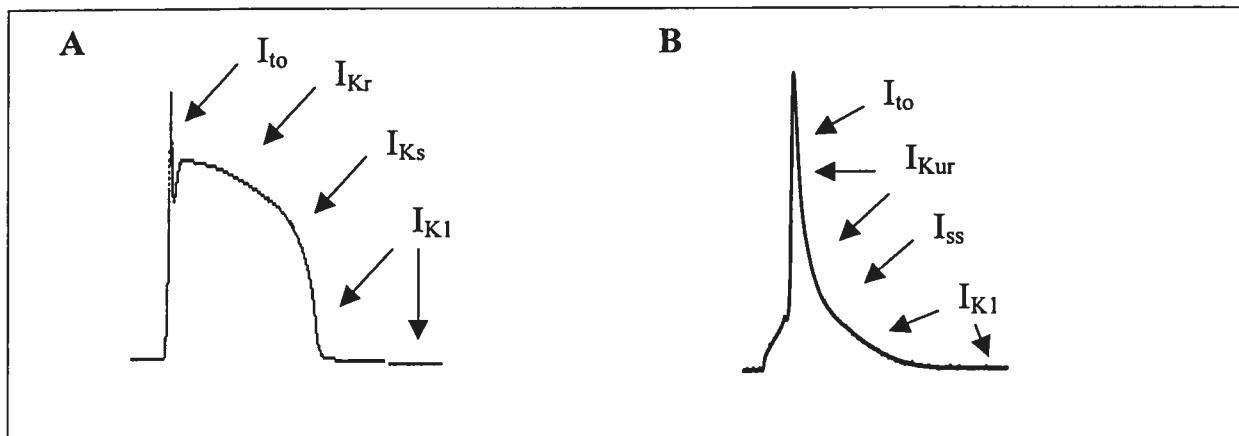
### 1.1.2.4 Le courant à rectification entrante : $I_{K1}$

Contrairement aux courants de la famille  $I_K$ , le courant  $I_{K1}$  possède une composante entrante de courant  $K^+$ .  $I_{K1}$  est impliqué surtout dans la repolarisation terminale et dans le maintien stable du potentiel de repos. La partie sortante de ce courant contribue à la repolarisation. Toutefois, l'amplitude la plus grande du courant se produit dans la portion entrante. La base moléculaire responsable de  $I_{K1}$  est Kir2.X, dont une composante majeure est Kir2.1.<sup>7, 12, 16</sup>

### 1.1.2.5 Les courants $K^+$ ventriculaires chez la souris

Tout comme pour les courants  $K^+$  cardiaques retrouvés chez l'homme, plusieurs courants  $K^+$  sont impliqués dans la repolarisation ventriculaire chez la souris. Tout d'abord, il y a  $I_{to}$ , formé par les protéines Kv4.2 et Kv4.3 qui s'associent sous forme d'hétérotétramères pour créer le pore du canal.<sup>16,17</sup> Chez la souris,  $I_{to}$  est très impliqué dans la phase principale de repolarisation

à cause de leur rythme cardiaque rapide qui force le retour rapide au potentiel de repos. Le courant  $I_K$  chez la souris est, comme chez l'homme, composé de deux éléments distincts :  $I_{Kur}$  et  $I_{ss}$ .  $I_{Kur}$  est le courant  $K^+$  à rectification retardée ultrarapide. Il est très important dans la repolarisation chez la souris puisqu'il s'active très rapidement et son inactivation est lente.  $I_{Kur}$  est très sensible à de faibles concentrations de 4-AP à des concentrations (dans l'ordre du  $\mu M$ ), ce qui nous permet de séparer les deux courants à rectification retardée par des protocoles d'électrophysiologie.  $I_{Kur}$  est formé par le canal  $Kv1.5$ .<sup>16, 20</sup>  $I_{ss}$  est formé par  $Kv2.1$ <sup>16</sup> et s'active lentement et s'inactive très peu. Il est insensible au 4-AP et son implication physiologique est moindre chez la souris à cause de son amplitude plus faible et de sa cinétique plus lente. Finalement, comme pour l'homme, le courant  $I_{K1}$  est composé d'une portion sortante et d'une portion entrante. Il est un joueur important dans le contrôle de l'excitabilité cardiaque en contribuant à la fin de la repolarisation ainsi qu'au maintien du potentiel de repos membranaire (figure 1.3B).



**Figure 1.3 : Comparaison des courants potassiques impliqués dans le potentiel d'action chez l'homme (A) (adapté de <sup>21</sup>) et la souris (B) (données expérimentales de Katy Rivard, 2006)**

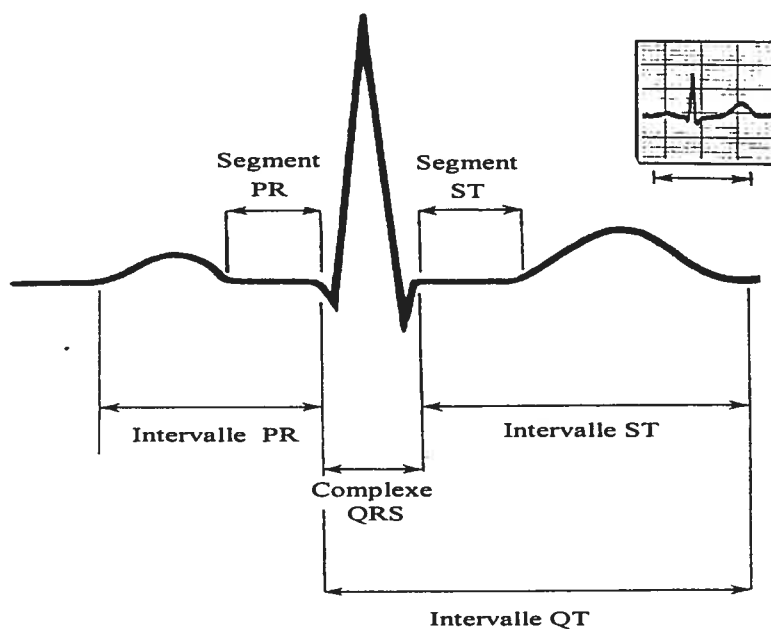
### 1.1.3 L'électrocardiogramme

L'activité électrique cardiaque peut être enregistrée de façon non invasive à la surface du corps par l'enregistrement d'électrocardiogramme (ECG). L'ECG est en fait, la représentation des variations électriques produites par la dépolarisation des cardiomyocytes dans les différentes zones du cœur. L'enregistrement de l'ECG est donc le reflet de la progression de l'onde d'excitation à travers tout le myocarde (voir Figure 1.4). Cette excitation, modulée par le

système nerveux autonome, commence dans les cellules spécialisées automatiques primaires du nœud sinusal situé dans l'oreillette droite.<sup>7,22</sup> Cette excitation se propage rapidement dans les myocytes auriculaires amenant leur dépolarisation (correspondant à l'onde P de l'ECG) et la contraction des oreillettes. La vague d'excitation se poursuit ensuite vers les ventricules via le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje. Suivra la dépolarisation des ventricules qui est représentée sur l'ECG par le complexe QRS. La repolarisation des ventricules est quant à elle symbolisée par l'onde T.<sup>3, 4, 22</sup> La durée des différentes ondes ainsi que des segments (portion entre les ondes) et des intervalles (comprenant les segments et ondes) représente le temps nécessaire au déroulement des processus électrophysiologiques. Ainsi, il est entre autre possible d'étudier la conduction entre les oreillettes et les ventricules en mesurant le temps que prend la vague d'excitation pour quitter les oreillettes et se rendre dans les ventricules par la mesure du segment P-R. L'intervalle QT comprenant le complexe QRS et l'onde T, mesure la dépolarisation et la repolarisation ventriculaires. Il est utilisé dans l'étude de la repolarisation ventriculaire puisque des changements de la durée de cet intervalle sont associés à des troubles de repolarisation.<sup>16, 22</sup>

#### **1.1.4 L'intervalle QT**

L'intervalle QT, est un reflet de l'activité totale des ventricules puisqu'il comprend la dépolarisation (le complexe QRS) et la repolarisation des ventricules (l'onde T). La mesure de la durée du potentiel d'action ventriculaire, ou l'intervalle QT, est couramment utilisée dans l'évaluation des paramètres électrophysiologiques ventriculaires. Le prolongement ou le raccourcissement de la durée de cet intervalle est souvent associé à des troubles de repolarisation ventriculaire et donc à des changements de densité des courants  $K^+$  impliqués dans cette phase du potentiel d'action au niveau des ventricules. Toutefois, comme l'ECG est le reflet global des changements électriques au cours de la propagation du potentiel d'action, des variations dans l'intervalle QT peuvent aussi être associées à des variations dans les autres courants ioniques retrouvés dans les ventricules, par exemple, à l'augmentation ou la diminution des courants  $Na^+$ . Il est donc important de mesurer les courants  $K^+$  responsables de la repolarisation ventriculaires afin d'identifier clairement la cause des changements observés dans la durée de l'intervalle QT.



**Figure 1.4 : Illustration de l'ECG (tirée de <sup>23</sup>)**

La durée des ondes, P, Q, R, S et T ainsi que des segments et des intervalles fournit des informations sur l'activité électrique cardiaque menant à la contraction du cœur.

#### 1.1.4.1 La correction de l'intervalle QT

L'intervalle QT varie normalement selon l'âge, le sexe et le rythme cardiaque. Ainsi, de façon générale, l'intervalle QT des hommes est plus court que celui des femmes (en conditions physiologiques, chez la femme, le QTc normales est plus petit que 470 ms alors que celui des hommes est normalement en dessous de 450 ms).<sup>24,25</sup> Aussi, plus le rythme est lent, plus le QT est long et vice versa. Afin de pouvoir comparer les mesures de QT, on corrige celui-ci en fonction du rythme cardiaque. La correction du QT se fait selon des formules établies lors d'études de populations. Il existe plusieurs formules de correction de QT qui sont basées sur la mesure de l'intervalle QT et de l'intervalle R-R qui est inversement proportionnel au rythme cardiaque. Le choix d'une de ces formules est surtout fait en fonction du rythme cardiaque moyen de l'espèce étudiée. Pour les souris qui ont un rythme cardiaque de plus de 600 battements par minute, la formule de Koren est la plus utilisée:  $QTc = QT / (RR/100)^{1/2}$ .<sup>26</sup>

#### 1.1.4.2 La prolongation de l'intervalle QT

La durée de l'intervalle QT peut être prolongée ou raccourcie dépendamment de divers facteurs. La prolongation de l'intervalle QT, ou syndrome du long QT (SLQT, ou en anglais, LQTS), est une anomalie dans l'activité électrique cardiaque. Dans la majorité des cas de prolongement de l'intervalle QT, la fonction mécanique du cœur est normale. Le problème se situe plutôt au niveau électrique dû à un défaut des canaux ioniques cardiaques reliés plus particulièrement à la repolarisation. Le syndrome du long QT est relié à un retard de repolarisation qui est causé par une augmentation globale de la dépolarisation ou par une diminution de la repolarisation. La prolongation du QT peut être de type familial (héréditaire) ou de type acquis.<sup>3</sup> Le syndrome du long QT héréditaire est la transmission de mutations des gènes responsables de former les canaux ioniques.<sup>21</sup> De nombreuses mutations de plusieurs canaux ont d'ailleurs été identifiées et associées à des types spécifiques de syndrome, LQTS-1 à 8. D'un autre côté, la forme acquise de la prolongation du QT est la plus fréquente. Elle peut être associée à l'administration de médicaments inhibant les courants  $K^+$  (la plupart du temps, hERG) comme l'érythromycine, la quinidine, le disopyramide, la terfénaire ou le sotalol.<sup>3,21,27</sup> Le long QT acquis peut aussi être relié à des conditions physiques particulières, comme l'hypothyroïdie ou l'hypokaliémie, ou encore à des pathologies cardiaques comme les cardiomyopathies et l'ischémie.<sup>3</sup> Toutefois, la prédisposition génétique joue également un rôle très important dans le long QT acquis puisque ce ne sont pas tous les patients qui prennent ces médicaments ou qui présentent une des conditions qui développent des LQTS. Il a été montré qu'une prédisposition génétique ou certains polymorphismes des canaux peuvent aussi être associés aux LQTS acquis.<sup>28,29</sup> Ainsi, des anomalies génétiques présentes chez des patients seraient démasquées par la prise de certains médicaments.

Une prolongation de l'intervalle QT, représentant des changements dans les processus électriques surtout au niveau de la repolarisation ventriculaire, rend les ventricules vulnérables à la survenue d'arythmies cardiaques. Ce sont surtout les arythmies qui sont responsables de l'apparition de symptômes reliés à la prolongation du QT tels que les syncopes, les palpitations ou la perte de conscience qui surviennent entre autres au cours d'activités physiques plus intenses ou suite à de fortes émotions. Le syndrome du long QT est un facteur de risque important d'arythmies comme les Torsades de pointe (Tdp).<sup>3</sup>



## **1.1.5 Les arythmies cardiaques**

### **1.1.5.1 Généralités et facteurs de risque d'arythmies cardiaques**

Le cœur bat normalement à un rythme constant et stable afin de fournir le débit sanguin suffisant et nécessaire à la circulation du sang dans tout le corps. Toutefois, en conditions physiologiques, le rythme cardiaque peut varier afin de s'adapter aux besoins en oxygène du corps. Par exemple, le rythme du cœur ralentit durant le sommeil alors qu'il s'accélère au cours d'activités sportives. Les stimulations électrophysiologiques amenant la contraction doivent aussi se faire de façon constante afin de permettre aux ventricules de se contracter de façon adéquate et efficace. Certaines conditions pathologiques peuvent affecter le rythme cardiaque et provoquer divers problèmes tels que la perte de conscience, des syncopes ou même la mort.<sup>3,30</sup>

Des facteurs de risques d'arythmies cardiaques comme les troubles de repolarisation et des troubles de conduction peuvent être de type familial (congénital) ou acquis. Les facteurs de type familial ou congénital sont souvent dus à la mutation de gènes codant pour les canaux ioniques alors que les facteurs acquis sont dus à des causes extérieures comme les cardiomyopathies, l'ischémie cardiaque, des anomalies métaboliques ou la prise de certains médicaments (antibiotiques, antihistaminiques et anti-arythmiques). Plusieurs médicaments sont d'ailleurs clairement associés à la formation d'arythmies comme les Torsades de pointe à cause de leur effet de prolongement de la durée de l'intervalle QT ([www.qtdrugs.org](http://www.qtdrugs.org)). Dans la majorité des cas, les facteurs de risques sont acquis et non héréditaires.

### **1.1.5.2 Origine des arythmies**

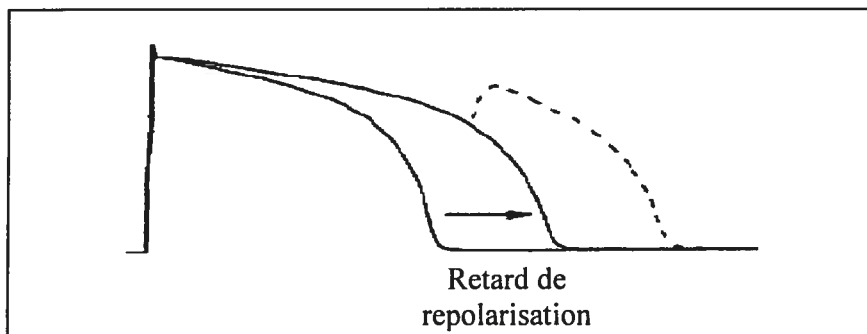
Il existe plusieurs causes d'arythmies et également différentes possibilités d'origine des arythmies. La propagation de l'onde d'excitation se fait normalement du nœud sinusal vers les ventricules en passant par les oreillettes et les faisceaux de His. Toutefois, il existe différents troubles qui vont avoir des effets sur la propagation normale du potentiel d'action dans tout le cœur. Ces troubles peuvent faire varier le rythme (ralentir ou accélérer) ou peuvent créer d'autres centres d'initiation de l'onde d'excitation. Par exemple, lors d'infarctus du myocarde, les cellules infarctées vont subir une modification de leurs propriétés naturelles cellulaires (exemple : perte de leur capacité de contraction). Dans certains cas, elles peuvent même devenir des cellules capables de générer par elles-mêmes un potentiel d'action, indépendamment de l'onde

d'excitation normale des cardiomyocytes. Elles peuvent ainsi nuire à la fluidité de la propagation et de la contraction induite normalement par le nœud sinusal et entraîner une perte de l'efficacité de la contraction du cœur. L'origine de l'arythmie peut être au niveau ventriculaire ou supra-ventriculaire, c'est-à-dire originaire précédemment la propagation de l'onde dans les ventricules (par exemple au niveau des cellules du nœud sinusal).

Les arythmies les plus graves sont celles qui touchent les ventricules comme les tachycardies ventriculaires (monomorphe et polymorphe) et la fibrillation ventriculaire (Figure 1.6). Ces formes d'arythmies désorganisent les contractions ventriculaires et empêchent le sang d'être expulsé adéquatement du cœur. Elles sont responsables de la mortalité arythmique.

### **1.1.5.3 Les arythmies ventriculaires**

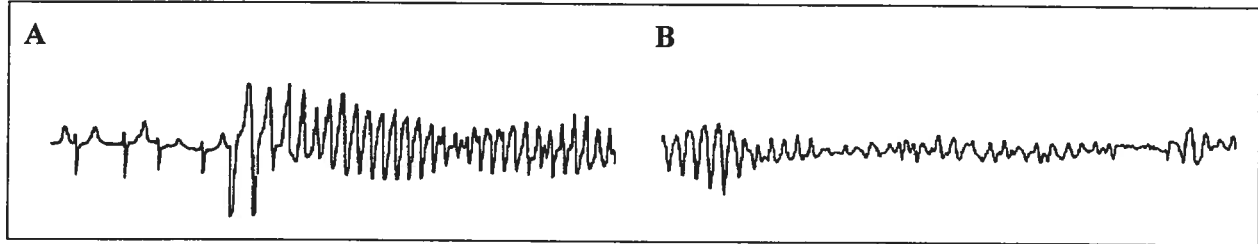
La tachycardie ventriculaire (TV) est une succession rapide de dépolarisations ventriculaires, donc une suite accélérée de complexes QRS dans l'ECG. Le sang est alors moins bien expulsé des ventricules puisque les contractions du cœur sont moins efficaces. Les TV peuvent être monomorphes ou polymorphes. Les tachycardies ventriculaires monomorphes sont caractérisées par des complexes QRS de forme et d'amplitude semblables alors que le profil du complexe QRS des tachycardies polymorphes est variable. Les Torsades de pointe (Figure 1.5A) font partie des TV polymorphes. Elles sont associées à une prolongation excessive de l'intervalle QT, due à un retard de la repolarisation dans le potentiel d'action ventriculaire. Dans ce cas, la prolongation de la repolarisation est tellement marquée qu'elle cause une dépolarisation précoce, c'est-à-dire que la dépolarisation du potentiel d'action suivant débute avant que le potentiel membranaire de la cellule n'ait eu le temps de revenir complètement au repos (voir Figure 1.5).<sup>5,16</sup>



**Figure 1.5 : Prolongation de la repolarisation (adapté de <sup>16</sup>)**

Un retard de repolarisation excessif, associé également à une prolongation de l'intervalle QT est un facteur de risque important d'arythmies cardiaques tels que les Torsades de pointe. Le retard peut être tellement marqué que le potentiel membranaire de la cellule ne revient pas au repos avant le commencement du prochain potentiel d'action.

Les Torsades de pointe ont été nommées ainsi à cause de leur forme particulière, où le complexe QRS tourne autour du point isoélectrique. (Figure 1.6A) Les tachycardies sont propices au développement de fibrillations ventriculaires puisque le prolongement de ce type d'arythmies sur une longue période peut amener la détérioration de la tachycardie en fibrillation.<sup>4,22</sup> La fibrillation ventriculaire (FV) est une désorganisation grave du rythme initié dans le ventricule. Le rythme est tellement désorganisé qu'il n'y a pas de réelle dépolarisation des ventricules et résulte en une perte globale de contraction cardiaque (Figure 1.6B). Les personnes souffrant d'une fibrillation ventriculaire perdent conscience, sont apnéiques et n'ont plus de pulsation cardiaque. On dit même qu'elles sont en arrêt cardiaque. Ce type d'arythmie grave doit être traité rapidement sinon il mène au décès de la personne.



**Figure 1.6 : Exemple d'enregistrements d'arythmies ventriculaires (adapté de <sup>3</sup>)**

- A) La Torsade de pointe est une tachycardie ventriculaire de type polymorphique. Elle a été nommée ainsi à cause de la forme de l'ECG où le complexe QRS alterne d'un côté à l'autre de l'axe isoélectrique.
- B) La fibrillation ventriculaire est une des arythmies cardiaques les plus graves. La dépolarisation ventriculaire est complètement désorganisée et le cœur ne bat plus de façon efficace.

## 1.2 L'angiotensine II

### 1.2.1 Historique de l'angiotensine II

Il y a plus de cent ans, soit en 1898, Tigertedt et Bergman ont montré pour la première fois qu'un extrait de rein contenait une substance vasopressive qu'ils appelèrent la rénine. Ce n'est qu'en 1940 que deux autres groupes de recherche firent la découverte d'un autre joueur important du désormais célèbre système rénine-angiotensine ("RAS"). L'un d'eux nomma le composé « hypertensin » et l'autre, « angiotonin ». <sup>31</sup> Après l'isolation et la caractérisation de ces deux molécules, ils découvrirent que ces deux peptides étaient en fait un seul et même composé et lui donnèrent le nom d'angiotensine. Depuis ce temps, l'angiotensine II (Ang II), ainsi que les différents composés formant le système rénine-angiotensine, ont fait l'objet de multiples études par plusieurs groupes de recherche qui ont montré l'importante implication au niveau physiologique et pathologique de ce système dans la fonction de plusieurs organes et surtout au niveau cardiovasculaire. <sup>31</sup>

### 1.2.2 Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine (RAS) est un joueur très important dans le maintien à court- et long-terme de la tension artérielle. Lorsqu'une diminution de la pression sanguine survient, différents mécanismes sont activés afin de maintenir un débit sanguin adéquat. Parmi ces mécanismes, il y a la production d'Ang II, le peptide vasoactif du système rénine-angiotensine.

#### 1.2.2.1 La biosynthèse de l'angiotensine II

La cascade de réactions enzymatiques menant à la formation de l'Ang II est maintenant bien connue. La biosynthèse classique de l'Ang II débute à partir de l'angiotensinogène qui est fabriqué par le foie et transformé en angiotensine I (Ang I) par la rénine (produite et relâchée par les reins). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), produite au niveau des poumons, catalysera ensuite l'Ang I en Ang II. <sup>32</sup> (Figure 1.7) Une fois synthétisée, l'Ang II agira sur plusieurs types de cellules se trouvant dans une grande variété de tissus cibles dont les reins, le cœur, le cerveau, le foie, les muscles lisses vasculaires et le système nerveux sympathique. <sup>33,34</sup>

Ensuite, l'Ang II sera rapidement dégradée et inactivée par des angiotensinases non spécifiques tels que des endopeptidases, des aminopeptidases et des carboxypeptidases.<sup>5,32</sup>

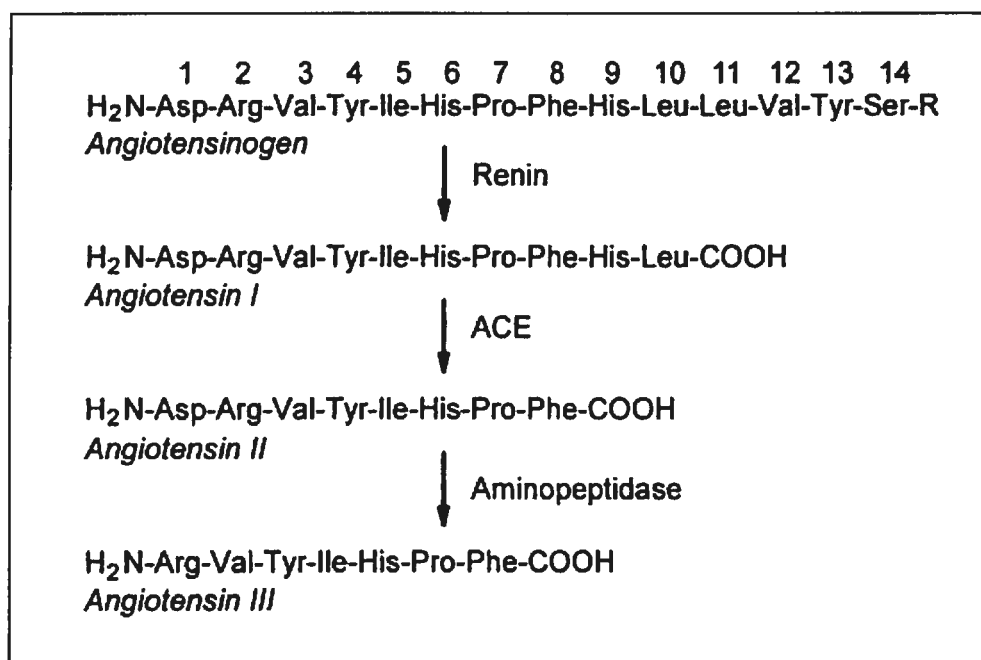


Figure 1.7 : Cascade de la biosynthèse de l'angiotensine II (Tirée de <sup>32</sup>)

### 1.2.2.2 Le système rénine-angiotensine local

L'Ang II est produite non seulement via la sécrétion de composés dans la circulation, mais aussi via la génération et l'activation locale de ces mêmes composés. Les tissus capables de produire l'Ang II localement expriment partiellement ou complètement la cascade catalytique menant à la formation du peptide actif.<sup>32</sup> Parmi ces tissus, il y a le cerveau, les reins, les vaisseaux sanguins et le cœur où l'ARNm de l'angiotensinogène, de la rénine et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine a été retrouvée.<sup>31,35,36,37</sup> Le rôle de ce système n'est pas clairement établi mais il pourrait avoir une implication dans la contractilité cardiaque, le tonus vasomoteur coronarien, l'arythmogénèse, l'hypertrophie, le remodelage et la fibrose cardiaque.<sup>37,38</sup> Cette production de l'Ang II locale montre que le RAS, en plus d'être un système endocrine, peut également être une fonction autocrine/paracrine régulée localement.<sup>35,36</sup>

L'Ang II pourrait aussi être produite par un système complémentaire au RAS. En effet, des évidences ont montré l'expression d'un système de production de l'Ang II indépendant de

l'action de la rénine ou de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ce système complémentaire utiliserait plutôt des enzymes tels que la cathepsin G, la tonine ou la chymase<sup>39</sup> dans la production de l'Ang II au niveau cardiaque.

### **1.2.3 Les récepteurs de l'angiotensine II**

#### **1.2.3.1 Les différents types de récepteurs à l'angiotensine II**

Afin de produire ses effets au niveau des différents tissus cibles, l'Ang II se lie de façon spécifique à des récepteurs que l'on retrouve à la surface cellulaire. Jusqu'à maintenant, deux types principaux de récepteurs à l'Ang II ont été clonés : le type 1 (AT1) et le type 2 (AT2). D'autres récepteurs liant l'Ang II ont également été proposés (AT3 et AT4), mais n'ont pas encore été caractérisés.<sup>40</sup> La stimulation du récepteur AT1 est responsable de la majorité des effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II au niveau cardiovasculaire, neuronal, rénal, endocrinien et hépatique.<sup>31,33</sup>

#### **1.2.3.2 Le récepteur AT1**

Le récepteur de type 1 de l'Ang II a été retrouvé dans les muscles lisses vasculaires, le cœur, le cortex rénal, le foie, les reins et dans certaines régions du cerveau. Sa stimulation par la liaison de l'Ang II amène la contraction des muscles lisses vasculaires, la sécrétion de l'aldostérone, la régulation de la balance électrolytique, une activation neuronale, la neurosécrétion d'hormones ou d'autres molécules vasoactives, le transport d'ions ainsi que la croissance et la prolifération cellulaire.<sup>31,33</sup>

Chez la souris, le rat et le lapin, deux sous-types de récepteur AT1 ont été clonés : AT1a et AT1b.<sup>31,41</sup> Environ 95% de la séquence d'acides aminés de ces deux sous-types de récepteurs est identique. Ils diffèrent surtout dans leur distribution tissulaire, leur localisation chromosomique, leur structure génomique ainsi que leur régulation transcriptionnelle.<sup>31</sup> De façon générale, le sous-type a se retrouve en plus grande concentration dans une majorité de tissus comme dans le foie, les poumons ou l'aorte.<sup>42</sup>

Suite à la liaison de l'Ang II avec le récepteur AT1, il y a une rapide désensibilisation du récepteur. L'exposition des récepteurs de cellules intactes à son ligand amène une perte rapide de

la réponse du récepteur. Cette désensibilisation du récepteur se produit par une diminution de l'expression de AT1 à la surface cellulaire. Suite à la liaison de l'Ang II au récepteur, il y a internalisation du récepteur et du ligand. Le rôle premier de l'internalisation est de diminuer le nombre de récepteur à la surface, donc de diminuer la fonction du récepteur. Toutefois, pour certains récepteurs liés aux protéines G (comme le récepteur AT1) cette internalisation par la formation d'endosomes permettrait la déphosphorylation du récepteur et ainsi sa resensibilisation et son recyclage à la membrane cellulaire. De plus, l'internalisation du récepteur avec son ligand permettrait aussi la distribution de l'Ang II à l'intérieur de la cellule ou pourrait même protéger le peptide de la dégradation par les endopeptidases. Ainsi, l'internalisation rapide du récepteur AT1 suite à la liaison à l'Ang II diminue le nombre de récepteurs présents à la membrane, mais permet aussi le recyclage de celui-ci à la membrane. Une augmentation de la stimulation du récepteur par l'Ang II à long terme provoque un état d'équilibre entre le nombre de récepteurs internalisés et recyclés.<sup>43,44</sup>

### 1.2.3.3 Le récepteur AT2

Le récepteur AT2 est moins connu que AT1. Chez l'adulte, on le retrouve en faible concentration dans quelques tissus comme l'endothélium vasculaire, la médulla rénale, certaines régions du cerveau, le cœur, le muscle lisse utérin et les ovaires.<sup>45</sup> Par contre, ce récepteur est très présent dans plusieurs tissus fœtaux.<sup>31,32</sup> AT2 serait ainsi plus impliqué dans le développement fœtal et son rôle physiologique à l'âge adulte reste incertain. Toutefois, dans certaines conditions pathologiques comme l'infarctus du myocarde, l'ischémie, l'insuffisance rénale et lors de dommages au niveau vasculaire, l'expression du récepteur AT2 pourrait être augmentée de façon importante<sup>32</sup> afin de contrebalancer les effets de l'activation du récepteur AT1 par des effets vasodilatateurs, anti-prolifératifs, pro-apoptotiques (dans la vasculature), de différenciation cellulaire et de réparation tissulaire.<sup>40,46,47</sup>

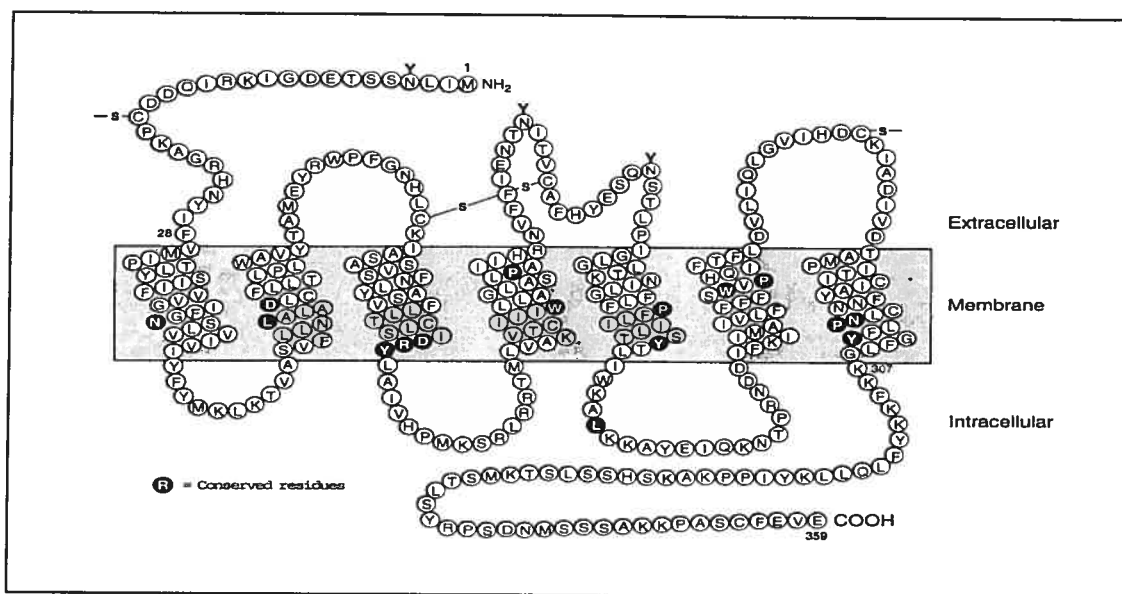
Plusieurs études ont aussi montré les effets bénéfiques de la présence du récepteur AT2 au niveau du système cardiovasculaire. Des études ont démontré qu'une diminution des récepteurs AT2 cause de l'hypertension<sup>48</sup>, alors qu'une augmentation de l'expression de celui-ci est associée à une diminution de la pression sanguine.<sup>49</sup> D'autres études ont également montré que le récepteur AT2 contrebalancerait les effets du récepteur AT1 au niveau cardiaque par l'inhibition



de la croissance cellulaire, de la prolifération et de l'hypertrophie.<sup>50,51</sup> Ce qui montre que AT2 pourrait avoir des effets cardioprotecteurs puisque son expression est augmentée lors de l'apparition de certaines conditions pathologiques cardiaques (hypertension, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde) dans des modèles animaux<sup>52</sup> ainsi que chez l'humain.<sup>53</sup>

### 1.2.3.4 Configuration des récepteurs de l'angiotensine II

Les deux types de récepteur principaux de l'Ang II (AT1 et AT2) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires faisant partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G.<sup>31,45,54</sup>



**Figure 1.8 : Structure secondaire du récepteur de type 1 de l'angiotensine II.** (Tirée de <sup>31</sup>)  
La structure secondaire du récepteur AT1 composée de sept domaines transmembranaires est celle typiquement retrouvée chez les récepteurs couplés aux protéines G.

### 1.2.3.5 La signalisation intracellulaire

Des évidences ont montré que les deux types de récepteurs de l'Ang II produisent leurs effets via une multitude de voies de signalisations intracellulaires. Ainsi, AT1 et AT2 activeraient tous deux des voies classiques couplées aux protéines G associées à des voies non conventionnelles. Toutefois, la signalisation du récepteur de type 1 est mieux connue que celle du type 2. De plus, comme le récepteur de type 1 de l'Ang II est le principal médiateur des effets

de l'Ang II et qu'il est le récepteur principal à l'étude dans le projet de recherche qui nous concerne, les prochaines sections traiteront plus particulièrement des voies de signalisation associées à AT1.

#### 1.2.3.6 Signalisation intracellulaire associée aux protéines G

En conditions basales, les protéines G se retrouvent sous forme d'hétérotrimères composés des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Pour tous les types de protéines G, la liaison du ligand à son récepteur amène la dissociation de  $G\alpha$  du complexe  $G\beta\gamma$ . Suite à cette dissociation, les deux groupes de sous-unités iront moduler différentes voies de signalisation intracellulaires dépendamment du type de protéine G qui a été activée.

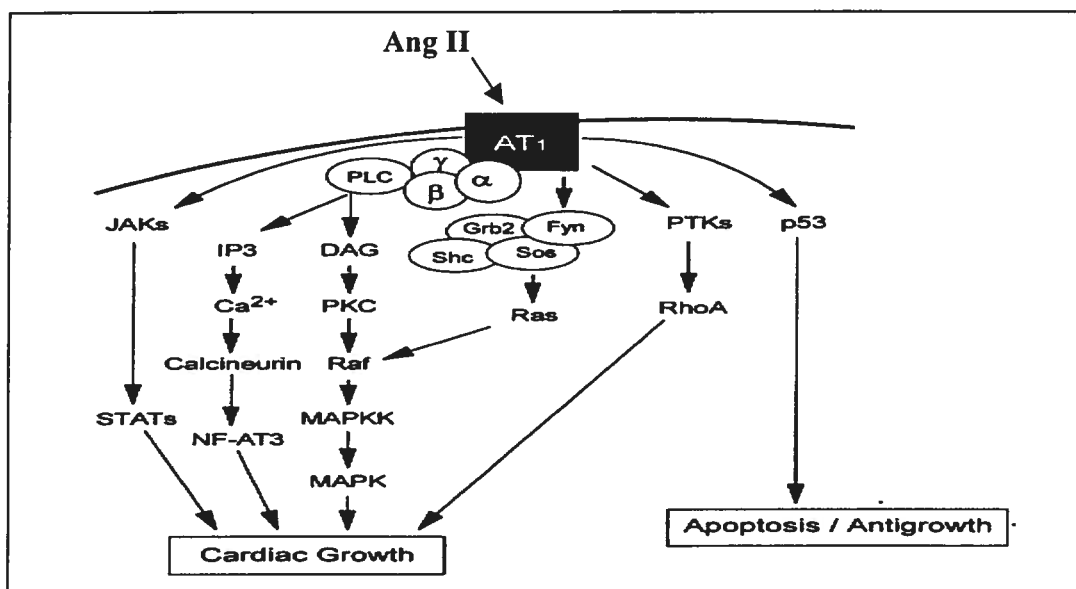
Le récepteur AT1 (reconnu pour moduler la majorité des effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II) est couplé à deux types de protéines G : la  $G_q$  et la  $G_i$ .<sup>5</sup> Les prochaines sections discuteront plus en détails des voies de signalisation reliées à ces deux protéines G.

D'une part, suite à la liaison de l'Ang II au récepteur AT1, la sous-unité  $G\alpha_q$  stimule l'activité de la phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG).<sup>5</sup> Chacun de ces deux composés déclenche une cascade de réactions spécifiques. D'une part, l'IP<sub>3</sub> agira au niveau du réticulum sarcoplasmique via la liaison à ses récepteurs afin de libérer le calcium intracellulaire. Les canaux calciques dépendants du voltage situés à la membrane cellulaire vont également s'ouvrir pour faire entrer plus de calcium dans la cellule. L'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire va ainsi activer les voies de signalisation dépendantes du calcium et amener la contraction musculaire. D'autre part, le DAG ainsi que le calcium libéré activeront des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases, les protéine kinases C (PKC). Les PKC agissent sur une multitude de protéines en phosphorylant des séquences consensus spécifiques. Les différentes protéines phosphorylées agiront dans de multiples cascades intracellulaires<sup>5,55,56</sup> (Figure 1.9)

D'autre part, la sous-unité  $G_{\alpha i}$  a quant à elle un effet inhibiteur sur l'enzyme adénylate cyclase (AC). Le rôle de l'AC est de transformer l'ATP en AMPc. L'AMPc a des effets activateurs entre autres, au niveau de la protéine kinase A (PKA). La PKA, tout comme la PKC, phosphoryle diverses protéines. L'activation de la  $G_{\alpha i}$  par la liaison de l'Ang II diminuera la production d'AMPc qui engendrera une réduction de l'activité de la PKA.<sup>5,55</sup>

### 1.2.3.7 Signalisation intracellulaire indépendante des protéines G

En plus des voies de signalisation intracellulaires conventionnelles associées aux protéines G, l'Ang II induit aussi bon nombre de voies typiquement associées à la croissance cellulaire et aux cytokines.<sup>38</sup> Ainsi, la liaison de l'Ang II au récepteur de type 1 peut aussi activer des voies telles que JAK/STAT, les tyrosine kinases (comme Src, Fyn, Yes et Pyk2) ou les petites protéines G (Rho)<sup>5,38</sup> (Figure 1.9) Ces voies sont reliées à des effets de croissance cellulaire, de remodelage tissulaire et de processus inflammatoires.<sup>5,57</sup>



**Figure 1.9 : Voies de signalisation intracellulaires associées à AT1 (Adaptée de <sup>38</sup>)**

La liaison du récepteur AT1 par l'Ang II active plusieurs voies de signalisation intracellulaires dépendantes ou non des protéines G.

Les différentes voies de signalisation intracellulaires ainsi activées auront une multitude d'effets dépendamment du tissu et du type de cellules touchées. Parmi ces effets, on note

l'induction de facteurs de transcription (c-fos, c-jun, c-Myc), l'activation de voies dépendantes du calcium (calmoduline, calcineurine), la voie JAK/STAT et la voie des MAP kinases (Figure 1.10).<sup>5,38,55,57</sup>

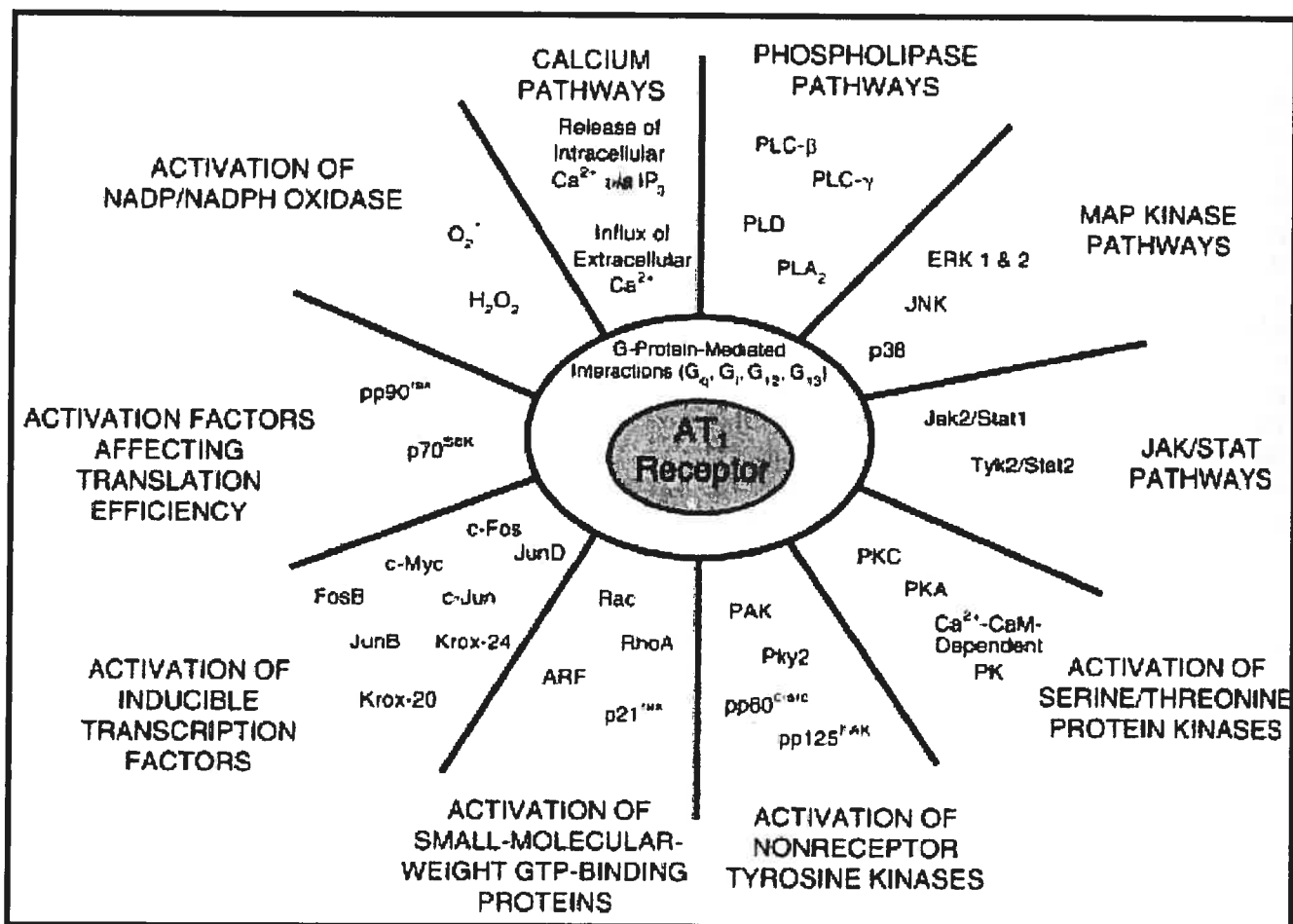


Figure 1.10 : Les effets de l'activation du récepteur AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II (Tirée de <sup>5</sup>)  
La stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> par l'Ang II entraîne l'activation de plusieurs cascades intracellulaires pour produire les nombreux effets de l'Ang II.

## 1.2.4 Le rôle de l'angiotensine II

### 1.2.4.1 Rôle physiologique et pathologique de l'angiotensine II

L'Ang II joue un rôle physiologique essentiel. Les voies de signalisation intracellulaires activées par l'Ang II amènent finalement plusieurs réponses cellulaires telles que la contraction des muscles lisses, la stéroïdogénèse, le transport ionique ainsi que la croissance et la prolifération cellulaires.<sup>31</sup> Toutes ces réponses cellulaires participent à plusieurs phénomènes

physiologiques tels le contrôle rapide de la pression artérielle par la vasoconstriction et le contrôle plus lent de la pression par la régulation de la balance électrolytique et hydrique, la sécrétion hormonale et la régulation de la fonction rénale. Des études faites sur des modèles de souris transgéniques ont montré qu'une diminution de l'action de l'Ang II par la délétion de gènes codant pour l'angiotensinogène, l'enzyme de conversion ou pour le récepteur AT1a amenait une diminution de la pression sanguine, une diminution de la réponse aux changements de pression et une diminution de la survie des animaux.<sup>58</sup> L'Ang II participe aussi à la modification de la structure vasculaire et cardiaque qui mène au remodelage (activation de facteurs de croissance, synthèse protéique, augmentation de la matrice extracellulaire).<sup>31</sup> En conditions normales, tous ces mécanismes ont des effets cardiovasculaires bénéfiques. En fait, ces mécanismes compensent pour des changements physiologiques ou pathologiques et tentent de maintenir la fonction normale du système cardiovasculaire. Toutefois, la stimulation du RAS sur de longues périodes ou de façon excessive amène le transfert du phénomène de compensation vers une diminution de l'efficacité des mécanismes adaptatifs cardiovasculaires et vers la décompensation cardiaque. D'ailleurs, l'Ang II est directement associée à divers troubles cardiovasculaires comme l'hypertension, l'hypertrophie, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque.<sup>59,60,61,62</sup> Une augmentation de l'action de l'Ang II par une augmentation de la production de ses précurseurs, de sa concentration ou par l'activation anormale des récepteurs AT1 est la cause de maladies cardiovasculaires. Par exemple, une augmentation de l'enzyme de conversion de l'Ang II est associée à différentes pathologies telles que l'hypertrophie ventriculaire, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque congestive.<sup>59,60,61</sup> De plus, le récepteur AT1 ainsi que l'enzyme de conversion de l'Ang II présentent des polymorphismes spécifiques associés à une ou l'autre de ces pathologies.<sup>5,31,37</sup> Ainsi, les effets pathologiques de l'Ang II sur les tissus cardiaques peuvent être la conséquence indirecte ou directe à la stimulation des récepteurs AT1.

#### **1.2.4.2 Effets pathologiques indirects de l'angiotensine II au niveau cardiaque**

D'un côté, une augmentation de l'action de l'Ang II au niveau systémique amène une vasoconstriction, ce qui conduit à une augmentation de la pression sanguine. Un accroissement soutenu de la pression menant à l'hypertension provoquera des changements adaptatifs dans divers organes entre autres au niveau des reins et du cœur. La surcharge pressive amenée au

cœur activera divers mécanismes compensatoires qui résulteront en une hypertrophie des cardiomyocytes et en un remodelage global du tissu. Ce remodelage est caractérisé par le dépôt de collagène, la prolifération des fibroblastes et la perte de cardiomyocytes qui diminuent la fonction cardiaque et mène à l'insuffisance cardiaque. Il a été montré qu'il est possible de prévenir l'hypertrophie ventriculaire gauche chez des rats hypertendus ou d'amener une régression de l'hypertrophie due à l'hypertension chronique chez l'humain en inhibant les effets de l'Ang II par l'administration d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou d'antagonistes spécifiques des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II (ARA).<sup>35</sup> De plus, ces agents sont reconnus pour avoir plusieurs effets bénéfiques dans l'insuffisance cardiaque, la fibrose et la réduction de la taille de l'infarctus lorsqu'ils sont administrés de façon systémique.<sup>62,63</sup>

#### **1.2.4.3 Effets pathologiques spécifiques de l'angiotensine II au niveau cardiaque**

Comme nous l'avons vu précédemment, le cœur possède un système local de production d'Ang II.<sup>31,35,36,37</sup> De plus, les cardiomyocytes expriment les récepteurs de l'Ang II, AT1 et AT2.<sup>31,40</sup> Plusieurs études ont démontré que l'action de l'Ang II via les récepteurs AT1 exprimés au niveau cardiaque serait responsable de plusieurs conditions pathologiques du myocarde. D'ailleurs, il a été rapporté qu'au niveau cellulaire, l'Ang II induit l'augmentation de la synthèse protéique et le grossissement des cellules (hypertrophie)<sup>64</sup> et entraîne l'augmentation du nombre de cellules (hyperplasie).<sup>31</sup> De plus, l'Ang II bloque l'activité de métalloprotéinases de type 1 (MMP-1) (impliquées dans la dégradation du collagène) ce qui favorise la prolifération de la matrice extracellulaire et l'accumulation de collagène.<sup>31</sup> L'Ang II peut donc agir directement sur les cellules cardiaques pour induire le remodelage.

D'un autre côté, il a aussi été démontré que les effets néfastes de l'Ang II sur les cardiomyocytes sont médiés par le récepteur AT1 puisque l'expression du récepteur AT1 est augmenté dans plusieurs modèles d'hypertrophie cardiaque.<sup>65,66</sup> De plus, des études faites sur des modèles de souris transgéniques ont montré qu'une expression accrue de l'angiotensinogène ou du récepteur AT1 spécifiquement au niveau cardiaque induit de l'hypertrophie et du remodelage cardiaque indépendamment de changements hémodynamiques.<sup>67,68</sup> Finalement, le traitement avec des séquences d'oligonucléotides complémentaires (anti-sens) à la séquence d'ARN du

récepteur AT1 protège les rats de l'apparition de l'hypertrophie et renverse même l'hypertrophie causée par une augmentation du RAS.<sup>69</sup> La stimulation du récepteur de type 1 de l'Ang II peut donc être directement responsable de l'apparition des troubles cardiaques.

En résumé, l'Ang II peut entraîner le remodelage du tissu cardiaque de façon indirecte ou directe. L'augmentation de la pression sanguine par l'Ang II cause des changements au niveau du tissu cardiaque. Ces transformations visent à compenser des modifications survenant au niveau du système cardiovasculaire mais ultimement, vont conduire à une perte de la fonction cardiaque (décompensation). De plus, l'activation des récepteurs AT1 au niveau des cardiomyocytes est également directement reliée à l'établissement de plusieurs pathologies cardiaques. Les traitements par des ARA ou des IECA ont montré des bénéfices chez les patients à haut risques cardiovasculaires via le contrôle de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque, associés à une augmentation de effets de l'Ang II. Il a également été rapporté que ces agents thérapeutiques améliorent aussi le pronostiques de ce type de patients et diminuent leurs risques d'événements cardiaques (incluant les arythmies) et de mort subite indépendamment du contrôle de l'une ou l'autre des pathologies cardiaques qui sont associées à la survenue d'arythmies.<sup>70,71,72</sup>

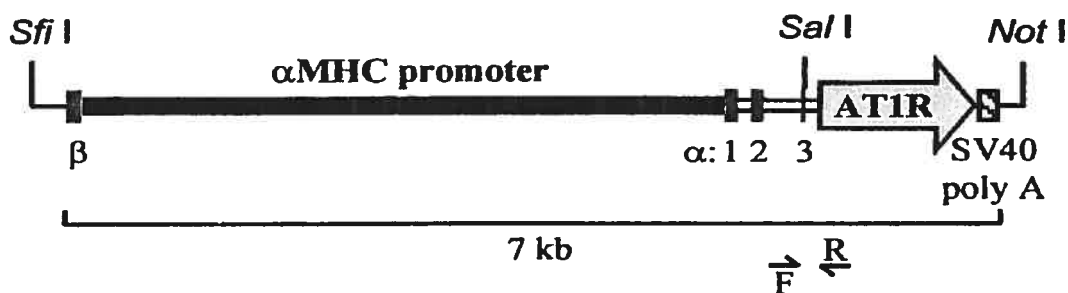
## **1.2.5 Le modèle de souris AT1R**

### **1.2.5.1 Généralités**

On sait que l'Ang II peut agir directement au niveau cardiaque via les récepteurs AT1 et qu'une trop grande stimulation de ces récepteurs est directement responsable de troubles cardiovasculaires. Afin d'étudier les effets spécifiques de l'Ang II via les récepteurs AT1 au niveau des cardiomyocytes, une souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'Ang II spécifiquement au niveau du tissu cardiaque (la souris AT1R) a été développée par le laboratoire du Dr Mona Nemer à l'institut de recherche clinique de Montréal.<sup>67</sup>

Afin de générer les souris AT1R, le gène du récepteur de type 1 de l'Ang II humaine a été inséré dans le génome de souris de la lignée C57BL/6. La séquence codante du récepteur AT1 a été placée de façon à se retrouver sous le contrôle du promoteur du gène de la chaîne lourde de myosine alpha ( $\alpha$ MHC).<sup>67</sup> Ce promoteur se situe de façon spécifique dans les cardiomyocytes et induit la transcription constante des gènes sous son contrôle. L'insertion du récepteur AT1 par

manipulation génétique au niveau de ce promoteur confère au récepteur AT1 une expression spécifique et constante au niveau des cardiomyocytes (Figure 1.11).



**Figure 1.11 : Représentation du transgène des souris AT1R (tiré de <sup>67</sup>)**  
Le gène du récepteur de type 1 de l'Ang II humaine a été inséré.

Chez les souris AT1R, le nombre de récepteurs AT1 exprimés à la membrane est plus grand, ce qui augmente les liaisons du ligand avec le récepteur au niveau du cœur et produit ainsi, une plus grande stimulation de ces récepteurs par l'Ang II dans ce tissu. La plus forte stimulation des récepteurs entraîne plusieurs effets au niveau cardiaque. D'ailleurs, il a été montré par un autre groupe travaillant avec ce modèle de souris que la plus grande stimulation du récepteur AT1 est responsable des effets observés dans ce modèle de souris transgénique.<sup>68</sup> D'un autre côté, le fait que le récepteur AT1 soit surexprimé au niveau des cardiomyocytes ne signifie pas nécessairement que ces récepteurs soient capables de médier leurs effets en activant les cascades intracellulaires associées normalement à ce récepteur. Toutefois, des études faites sur ce modèle de souris par différents groupes de recherche ont montré que l'Ang II produisait des effets via ces récepteurs. Par exemple, le groupe du Dr Mona Nemer a observé, lors d'études préliminaires, que l'administration d'Ang II pendant deux jours en concentrations inférieures aux doses causant une augmentation de la pression sanguine, était suffisante pour produire une augmentation de la masse ventriculaire et la mort subite chez les souris AT1R, alors que ce phénomène ne se produit pas chez les souris sauvages (contrôles) traités.<sup>67</sup> De plus, le groupe de Hein, qui travaille aussi sur un modèle de souris AT1R généré à partir du promoteur αMHC,<sup>68</sup> a également observé que la survie des nouveaux-nés transgéniques AT1R peut être améliorée par l'administration d'IECA ou



d'ARA. Ces études montrent que les récepteurs de type 1 surexprimés au niveau cardiaques chez les souris transgéniques AT1R sont fonctionnels. De plus, ces récepteurs augmentent les effets de l'Ang II spécifiquement au niveau cardiaque puisque l'augmentation de l'action de l'Ang II dans ce modèle produit des effets au delà de ceux observés chez les souris de type sauvage, alors que l'inhibition de l'action de l'Ang II au niveau des récepteurs AT1 prévient le phénotype pathologique dans ce modèle de souris transgénique.

#### **1.2.5.2 Profil cardiovasculaire des souris AT1R**

Les souris AT1R développent de l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque sans toutefois présenter de signe d'hypertension ou de changement hémodynamique.<sup>67</sup> Au stade avancé de la maladie, les souris AT1R présente une cardiomyopathie globale, où les quatre chambres cardiaques (ventricules gauche et droit, oreillettes gauche et droite) sont atteintes. De plus, le poids des poumons, corrigé en fonction du poids des souris, est plus élevé chez les souris transgéniques et plusieurs souris AT1R présentent de l'effusion pleurale. Ces caractéristiques sont des signes d'hypertension pulmonaire, secondaire à l'atteinte du ventricule gauche. Il a aussi été observé que les souris AT1R mouraient de façon prématurée (autour de 6 mois).

Des études préliminaires effectuées dans le laboratoire du Dre Céline Fiset ont également montré que les souris AT1R présentaient une incidence accrue d'arythmies cardiaques. Ces observations nous suggèrent que la stimulation excessive du récepteur AT1 de l'Ang II au niveau cardiaque pourrait être responsable de l'incidence accrue d'arythmies cardiaques et que celles-ci entraîneraient le décès soudain et prématuré de ces souris transgéniques.

## **1.3 Résumé des connaissances et buts de l'étude**

### **1.3.1 Connaissances sur le sujet**

- 1) La repolarisation ventriculaire est un paramètre important de l'excitabilité cardiaque. Ainsi, les troubles de repolarisation sont des facteurs de risque importants de la survenue d'arythmies cardiaques.
- 2) Les courants  $K^+$  sont responsables de la repolarisation et un retard de repolarisation peut être causé par une diminution de ces courants ioniques.
- 3) L'Ang II agit directement au niveau des cardiomyocytes via les récepteurs de type 1 pour produire la majorité de ses effets physiologiques et pathologiques connus.
- 4) Un modèle de souris transgéniques surexprimant le récepteur de type 1 de l'Ang II spécifiquement au niveau cardiaque a été développé afin d'étudier les effets directs de l'Ang II sur le cœur. Ces souris meurent de façon prématurée et présentent une incidence accrue d'arythmies cardiaques.

### **1.3.2 Hypothèses et objectifs de recherche**

Basée sur les diverses connaissances mentionnées au point 1.3.1, l'hypothèse de recherche de ce projet de maîtrise était : « La surexpression du récepteur de type 1 de l'Ang II au niveau cardiaque entraîne un retard de repolarisation qui représente un facteur de risque important pour la survenue d'arythmies cardiaques graves pouvant entraîner la mort ».

Les objectifs de ce projet étaient de :

- 1) Caractériser la repolarisation ventriculaire du modèle de souris AT1R afin d'établir s'il existe un lien entre l'Ang II, un retard de repolarisation ainsi que la survenue d'arythmies cardiaques.
- 2) Voir si les troubles de repolarisation présents chez les souris AT1R sont associés à des conditions pathologiques telles que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques, présentes chez ce modèle de souris transgénique.

**CARDIAC-SPECIFIC OVEREXPRESSION OF THE HUMAN TYPE 1 ANGIOTENSIN  
II RECEPTOR CAUSES DELAYED REPOLARIZATION**

Katy Rivard,<sup>1,2</sup> Pierre Paradis,<sup>3</sup> Mona Nemer<sup>3</sup> and Céline Fiset<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Research Centre, Montreal Heart Institute

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

<sup>3</sup>Clinical Research Institute of Montreal

Running title: Repolarization defect in mutant AT1R mice

Delayed repolarization in overexpressing  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor mice

† Corresponding author: Dr. Céline Fiset

Research Center, Montreal Heart Institute

5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

Phone : (514) 376-3330 (ext. 3025)

FAX : (514) 376-1355

E-mail : XXXXXXXXXX

### ABSTRACT

Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor (AT1R) in mice leads to ventricular hypertrophy and heart failure. Moreover, AT1R mice die prematurely of sudden cardiac death. The objective of this study was to characterize cardiac repolarization in AT1R mice to establish whether there is a relationship between angiotensin II, delayed repolarization and cardiac arrhythmias. Our results showed that compared to littermate controls AT1R mice present ventricular arrhythmias and had longer QTc interval (CTL:  $53.6 \pm 1.5$  ms, AT1R:  $64.2 \pm 1.4$  ms,  $p=0.0005$ ) and action potential duration (at 90% repolarization: CTL:  $19.0 \pm 1.8$  ms; AT1R:  $39.1 \pm 4.7$  ms,  $p=0.0001$ ). Measurement of ventricular  $K^+$  currents revealed a significant reduction of the  $Ca^{2+}$ -independent transient outward ( $I_{to}$ ), the ultrarapid delayed rectifier ( $I_{Kur}$ ) and the inward rectifier ( $I_{K1}$ )  $K^+$  currents in AT1R myocytes. However, the density of the steady-state outward  $K^+$  current ( $I_{ss}$ ) was similar in AT1R and wild-type myocytes. Protein expression of the following  $K^+$  channels, Kv4.2 (part of  $I_{to}$ ), Kv1.5 ( $I_{Kur}$ ) and Kir2.1 ( $I_{K1}$ ) were decreased in AT1R ventricles, whereas the expression of Kv4.3 (part of  $I_{to}$ ) and that of Kv2.1 ( $I_{ss}$ ) were similar in both groups. In addition, recovery from inactivation of  $I_{to}$  was significantly slower in the AT1R mice. These data strongly suggest that chronic stimulation of type 1 angiotensin II receptor is responsible for the delayed ventricular repolarization phenotype observed in the AT1R mice and may contribute to explain the increased incidence of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in these mice.

**Key words:** Angiotensin II,  $K^+$  currents, ventricular repolarization, arrhythmias, transgenic mice

## INTRODUCTION

Angiotensin II (ANG II), the active end product of the renin angiotensin system (RAS), has numerous physiological effects on diverse types of cells of the cardiovascular system (Guimaraes *et al.*, 2005). However, increased activity of ANG II contributes to the development of ventricular hypertrophy and remodeling (Flesch *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 1998; Akar *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). For instance, *in vitro* treatment with ANG II results in cardiac myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. Moreover, the demonstration of local synthesis and release of ANG II by cardiac myocytes also suggests that ANG II may serve as an autocrine/paracrine mediator of heart function. ANG II exerts its effects via receptors on the cell surface: classified into the ANG II type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors. AT1 receptors are members of the G-protein coupled family of receptors. Two AT1 receptor subtypes appear to exist, the AT1a and AT1b receptors (Guimaraes *et al.*, 2005). Infusion of ANG II in AT1a receptor knockout mice has neither pressor nor hypertrophic effects. These data implicate AT1a receptors as the primary subtype responsible for ANG II actions in mice (Ryan *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 1995). To date, most of the cardiac effects of ANG II appear to be mediated by the AT1 receptor (De Gasparo *et al.*, 2000).

ANG II is known to be involved in the initiation of cardiac remodeling, (Molkentin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Molkentin *et al.*, 2000) however, relatively little is known concerning the role of ANG II in the higher propensity of lethal cardiac arrhythmias observed in hypertrophy and heart failure (Zhang *et al.*, 2006; Rials *et al.*, 1997; Pitt *et al.*, 1997).

Transgenic mouse models with cardiac restricted overexpression of different components of the RAS have been instrumental in studying the role of ANG II in cardiac remodeling (Paradis *et al.*, 2000). However, no detailed characterization of cellular cardiac excitability has been realized using these transgenic mouse models. Thus far, only a small number of studies have documented an increased incidence of cardiac arrhythmias and sudden death using a transgenic approach (Xiao *et al.*, 2004; Zhai *et al.*, 2005; Donoghue *et al.*, 2003).

Transgenic mice overexpressing the human ANG II type 1 receptors (AT1R) specifically in cardiomyocytes has been shown to develop significant hypertrophy and heart failure in the absence of blood pressure changes (Paradis *et al.*, 2000). Of note, these AT1R mice died prematurely of sudden cardiac death. Since excessive QT prolongation, which reflects delayed repolarization, is a major risk factor for ventricular arrhythmias and sudden death, we hypothesized that overexpression of AT1 receptors might contribute to sudden cardiac death by promoting delayed repolarization and ventricular arrhythmias. Therefore, we realized the present study to determine whether there is a causal relationship between ANG II, delayed repolarization and ventricular arrhythmias. Findings presented here reveal that overexpression of the human ANG II type 1 receptor in the myocardium leads to an increased incidence of cardiac arrhythmia associated with delayed repolarization in these transgenic animals.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

The experiments were performed on 6-8 month old male AT1R mice. These transgenic mice overexpressed the human angiotensin type 1 receptor specifically in cardiomyocytes under the control of the murine  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ MHC) promoter (Paradis *et al.*, 2000). Transgenic (Tg, +/-) founder were mated with wild-type (Wt, -/-) C57Bl/6 mice. Wild-type male littermates were used as controls. Polymerase chain reaction (PCR) were performed to detect transgene (forward 5'-ACCATCTTCAGTAGAAGAGTTG-3' and reverse 5'-ACCCTTACCCCACATAGAC-3') and control (forward 5'-GCCTGCTGTCCCTTCAGCTC and reverse 5'-CCAGTCACGTTCCCTATCCT-3'). All experiments are conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines.

### *ECG recordings*

Mice were anesthetized by isoflurane inhalation and placed on heating pads to maintain their bodies temperature at 37°C. Platinum electrodes were positioned subcutaneous and lead I surface ECG was acquired using the Biopac System MP100 at a rate of 2 kHz. The signal was amplified, filtered at 100 Hz (low pass) and 60 Kz (notch filter). Recording were analyzed using ECG Auto data analyst (AcqKnowledge 3.7) software. QT intervals were corrected (QTc) for the heart rate using the formula for mice:  $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$  (Mitchell *et al.*, 1998).

### *Telemetry recordings*

OpenHeart® radiofrequency transmitter (Data Science International, Arden Hills, MN) was used to continuously monitor and record ECG of conscious and unrestrained control and transgenic mice (6 mice/group). Mice were anesthetized with isoflurane inhalation and kept on a warming pads. Individual transmitters were implanted into peritoneal cavity. All mice were allowed to recover for 1 week after surgery. ECG were continuously recorded for a period of 24 hours and saved onto disk for later analysis.

### ***Isolation of ventricular myocytes***

Mice were heparinized, anesthetized by isoflurane inhalation and then sacrificed by cervical dislocation. Single myocytes were isolated from the right ventricular free wall using the protocol described previously (Trépanier-Boulay *et al.*, 2001). Briefly, hearts were rapidly removed and retrogradely perfused through the aorta for 5 minutes with an HEPES-buffered Tyrode solution containing (mM) : 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0,3 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 HEPES, 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH). Next, the heart was perfused for 10 minutes with Tyrode calcium-free solution, followed by a 21 minutes perfusion with calcium-free solution containing 73.7 U/ml of collagenase type 2 (Worthington Co. Ltg, Freehold, NJ, USA), 0.1% bovine serum albumin (BSA), 20 mM taurine and 30  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. This was followed by perfusion for 3 minutes with a Kraft-Brühe (KB) solution (Isenberg *et al.*, 1982) (in mM: 100 K-glutamate, 10 K-aspartate, 25 KCl, 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 20 taurine, 5 creatine base, 0,5 EGTA, 5 HEPES, 20 glucose and 0,1% BSA (pH adjusted to 7.2 with KOH). The heart was then removed from the apparatus and the right ventricular free wall was triturated gently to isolated cardiac myocytes.

### ***Electrophysiological recordings***

The whole-cell voltage-clamp and current-clamp recording methods, data acquisition, and analysis methods have been described previously (Brouillette *et al.*, 2004). All experiments were carried out at room temperature (20-22 °C). Pipettes were filled with a solution including (mM) : 110 K<sup>+</sup>-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 4 K<sub>2</sub>ATP and 10 HEPES and had resistance between 1.5-4.0 M $\Omega$ . The myocytes were continuously superfused with oxygenated Tyrode Solution (see above isolation of ventricular myocytes).



### ***K<sup>+</sup> currents recording***

Membrane capacitance and series resistance were compensated (> 80 %). The description and validation of the pharmacological and biophysical methods to separated mouse ventricular K<sup>+</sup> currents has been recently published (Brouillette *et al.*, 2004). Briefly, all K<sup>+</sup> currents, the total K<sup>+</sup> current ( $I_{peak}$ ), the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current ( $I_{to}$ ), the ultra-rapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{Kur}$ ), the steady state outward K<sup>+</sup> current ( $I_{ss}$ ) and the inward rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ), were obtained by a 500 ms voltage step applied with 10 mV-increment from -110 to +50 mV. Specific properties of each K<sup>+</sup> current were used to separated each of them.  $I_{to}$  is rapidly inactivate by a pulse at -40 mV for 100ms period ( $I_{peak} - I_{to} = I_{Kslow}$ ). We then measured  $I_{to}$  by subtracting current with and without this inactivating prepulse ( $I_{peak} - I_{Kslow} = I_{to}$ ).  $I_{ss}$  is 4-aminopyridine (4-AP) resistant and is recorded in combination of the inactivating prepulse and perfusion of 100  $\mu$ M of 4-AP, which blocks  $I_{Kur}$ . Finally,  $I_{Kur}$  were measured by subtracting currents recorded in absence and presence of 4-AP ( $I_{Kslow} - I_{ss}$ ).

### ***Steady-state inactivation***

The voltage-dependence of steady-state inactivation for  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  were measured using two-step voltage-clamp protocol described previously (Brouillette *et al.*, 2004). The first step is an inactivating pulse to selected potential (from -110 to -20 mV) maintained for a period of 1 s or 5 s, for  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$ , respectively. This inactivating pulse is followed by a second voltage step to +30 mV during 1 s ( $I_{to}$ ) or 5 s ( $I_{Kur}$ ). (See figure inset in Figure 7 for voltage protocols). For the  $I_{Kur}$  recording, a pulse at -40 mV for 100 ms had been added between the inactivating and test pulse to inactivate  $I_{to}$ . Both  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  currents amplitude at each pulse potential were normalized to the maximum amplitude of each family of current ( $I/I_{max}$ ) and plotted as a function of the inactivating pre-pulse potential. Data were fit to a Boltzmann equation :  $I/I_{max} =$

$1 / [1 + \exp((V_m - V_{1/2})/S_{1/2})]$ , where  $V_{1/2}$  represents the membrane potential ( $V_m$ ) at which 50% of the channels are inactivated and  $S_{1/2}$ , is the mid-point slope factor (mV).

### ***Recovery from inactivation***

To measure the time and voltage dependence for reactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$ , an inactivating pulse (at +30 mV, maintain for 500 ms and 1.5 s period for  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  respectively) was followed at variable time intervals by a test pulse (at +30 mV for 500 ms for both types of current) (Protocols are shown in figure inset of Figure 7). The interpulse period varied between 10 and 600 ms for  $I_{to}$  recording and between 50 ms and 3 s for  $I_{Kur}$ . Specifically to  $I_{Kur}$ , both inactivating and test pulse were preceded by a pulse of 100 ms at -40 mV to inactivate  $I_{to}$ .  $I_{Kur}$  amplitude was measured by subtraction amplitude of outward current at the peak and 500 ms after the peak. For both families of current, the holding and interpulse potentials were -80 mV. Analysis of the recovery from inactivation was made using P2/P1 ratio plotted as a function of interpulse time and time constant was calculated (ms), where P2 represent current amplitude of the test pulse and P1 corresponds to the inactivating pulse.

### ***Western blots analysis***

Protocols used for protein and Western blots analysis were identical to those previously reported. (Lizotte *et al.*, 2005; Trépanier-Boulay *et al.*, 2001). Protein were prepared from CTL and AT1R mice ventricles (1 heart/sample). Each ventricle was homogenized in a solution of Tris-EDTA (TE) with protease inhibitors (PI) (leupeptin, aprotinin, benzamidine, phenylmethyl sulfonyl fluoride and  $Na_3VO_4$ ). The homogenate was centrifuged at 10,000 g and then the supernatant was ultracentrifuged at 200,000 g for 20 min. The pellet was resuspended in TE+PI containing 0,6 M KCl to dissolve contractile protein and ultracentrifugated. The pellet,

corresponding to the sarcolemmal-enriched proteins fraction, was washed by ultracentrifugation repeated two times. Protein measurements were done by Bradford Assay. Proteins were separated by electrophoresis (100  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) and transferred to PVDF membranes. Membranes were colored with Ponceau S to confirm uniformity of the protein loading and transfer. Membranes were then blotted with antibodies against  $\text{K}^+$  channels: anti-Kv4.3, anti-Kv4.2, anti-Kv1.5, anti-Kv2.1 and anti-Kir2.1. All antibodies were purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), with the exception of Kv1.5, which was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Bands were quantified by densitometry using Multi-Analyst program (Bio-Rad, CA, USA).

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Student's unpaired t-test was used to compare means. A P value  $< 0.05$  was considered significant.

## **RESULTS**

### ***AT1R mice present rhythm abnormalities***

Continuous ECG recording on conscious and unrestrained mice was obtained using a telemetry monitoring system. Figure 1A shows representative ECG trace recorded from 6-8 month old CTL and AT1R (n = 6 per group). Telemetry recording revealed spontaneous ventricular arrhythmias occurring in AT1R mice whereas none of the six age-matched littermate used as control present abnormalities during the continuous 24 hours recording period. Since QT interval prolongation represents an important risk factor of cardiac arrhythmias, surface ECG had also been recorded to measure QT interval duration. Figure 1B presents typical examples of lead I ECG recordings obtained from CTL and AT1R mice. As shown in the Table presented in Figure 1, both the QT interval and the QT interval corrected for heart rate (QTc) were significantly prolonged in AT1R compared to CTL mice (n = 7, p = 0.0005). Heart rate were comparable in both group (p = 0.4).

### ***Prolongation of the action potential duration in transgenic mice***

Action potentials were recorded using the whole-cell current-clamp protocol by injection of brief (2-5 ms) stimulus currents (0.4-0.7 nA) at rate of 1, 2, 3 and 4 Hz. Figure 2A shows representative action potential trace recorded at 4 Hz. Bar graph of mean action potential durations (APD) measured at 20%, 50% and 90% of the repolarisation was presented in Figure 2B. As for the QTc interval, APD were significantly greater in AT1R mice (n = 13) compared to age-matched control littermate (n = 14). (APD<sub>20</sub> (ms), CTL: 2.5 ± 0.2; AT1R: 4.3 ± 0.3; p = 0.00006) (APD<sub>50</sub> (ms), CTL: 5.2 ± 0.9; AT1R: 9.7 ± 1.2; p = 0.007) (APD<sub>90</sub> (ms), CTL: 19.0 ± 1.8; AT1R: 39.1 ± 4.7; p = 0.0005) Action potential recorded at frequency of 1 Hz were also significantly prolonged in AT1R for all APD studied (data not shown).

### ***K<sup>+</sup> currents in ventricular cardiac myocytes of CTL and AT1R mice***

Changes in densities contribution or properties of outward K<sup>+</sup> currents have dramatic effects on action potential duration (Fiset *et al.*, 1997). Thus, we studied whether a difference in outward K<sup>+</sup> currents between CTL and AT1R could account for prolongation of both QTc intervals and APD and for presence of spontaneous arrhythmias observed in AT1R mice. All currents were normalized to cell capacitance and expressed as densities (pA/pF). For each current family, representative trace (panel A) and mean I-V relationships (panel B) of CTL and transgenic mice were presented.

### ***Total K<sup>+</sup> current***

Figure 3 shows total K<sup>+</sup> current recorded in CTL and AT1R ventricular myocytes. The total K<sup>+</sup> current (I<sub>peak</sub>) was obtained by a series of test potentials applied in a 10 mV increment between -110 and 50 mV with 10 mV increments at a rate of 0.1 Hz. As shown in figure 3B, I<sub>peak</sub> was significantly decreased in AT1R mice compared to CTL (at +30 mV, CTL = 68.1 ± 9.2 pA/pF, n = 15 and AT1R = 28.2 ± 4.6 pA/pF, n = 11; p = 0.001). We then examined the individual contribution of all outward and inward K<sup>+</sup> currents responsible of I<sub>peak</sub> in mice ventricular tissue. These currents correspond to (1) the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current (I<sub>to</sub>), (2) the ultra-rapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>Kur</sub>), (3) the steady-state outward K<sup>+</sup> current (I<sub>ss</sub>) and (4) the inward rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) (Brouillette *et al.*, 2004).

### ***Separation and comparison of the outward $K^+$ currents between CTL and AT1R***

Figure 4A represents superimposed current recording of  $I_{to}$ , which was calculated by subtraction of current trace recorded with and without  $I_{to}$  inactivating prepulse at  $-40$  mV for 100 ms. Plot of the mean I-V relationship (4B) shows a significant decrease of this current in AT1R mice compared to CTL (at  $+30$  mV, CTL =  $31.9 \pm 3.9$  pA/pF,  $n = 12$  and AT1R =  $9.8 \pm 1.4$  pA/pF,  $n = 10$ ;  $p = 0,00004$ ). The current resulting from the subtraction of  $I_{to}$  corresponds to  $I_{Kslow}$  and is composed of  $I_{Kur}$  and  $I_{ss}$ .  $I_{Kur}$  was inhibited by  $100 \mu\text{M}$  of 4-AP and was calculated by subtraction of  $I_{Kslow}$  recording in absence and in presence of 4-AP. Figure 5A depicts example of  $I_{Kur}$  recorded from CTL and AT1R myocytes. As shown in panel B,  $I_{Kur}$  was decreased in AT1R mice compared to CTL (at  $+30$  mV, CTL =  $27.3 \pm 5.5$  pA/pF,  $n = 11$  and AT1R =  $9.8 \pm 1.4$  pA/pF,  $n = 8$ ;  $p = 0.04$ ). The third component of the outward  $K^+$  current,  $I_{ss}$ , (recorded in presence  $100 \mu\text{M}$  of 4AP and of the inactivating prepulse) was similar in both groups ( $n = 11$  (CTL) and  $n = 8$  (AT1R);  $p = 0.2$ ) (Figure 5A et 5B).

### ***Inward rectifier $K^+$ current: $I_{K1}$***

In figure 5, the inward  $K^+$  current portion corresponds to  $I_{K1}$ . As shown on the mean I-V curve, the inward rectifier  $K^+$  current was significantly smaller in AT1R cardiac myocytes compared to controls (at  $-110$  mV, CTL =  $-21.3 \pm 1.2$  pA/pF and AT1R =  $-11.9 \pm 1.1$  pA/pF,  $p = 0,00009$ ). The outward part of  $I_{K1}$  ( $-80$  to  $-40$  mV) was also significantly different in the two groups (at  $-60$  mV, CTL =  $1.6 \pm 0.2$  pA/pF and AT1R =  $0.9 \pm 0.1$  pA/pF,  $p = 0.003$ ).

### *Voltage-dependence of steady-state inactivation of $I_{to}$*

Figure 7A compares voltage-dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$  in both groups of ventricular myocytes. The figure inset of Figure 7A shows the two-step voltage protocol. The right panel shows Boltzmann functions fitted to mean data recorded in CTL and AT1R mice. The steady-state inactivation of  $I_{to}$  was similar in the two groups ( $V_{1/2}$ , CTL:  $-53.2 \pm 0.7$  mV; AT1R:  $-52.4 \pm 0.7$  mV,  $p = 0.3$ ; slope factor, CTL:  $5.9 \pm 0.5$  mV; AT1R:  $7.3 \pm 0.8$  mV,  $p = 0.2$ )

### *Recovery from inactivation of $I_{to}$*

A two-pulse protocol (see figure inset of Figure 7B) was used to compare the time dependence of  $I_{to}$  to recovered from inactivation in control and transgenic. Left panel of Figure 7B shows an example of  $I_{to}$  recorded in CTL and AT1R cardiac myocytes. Right panel of figure 7B presents mean data as best fitted with single exponential function of  $I_{to}$  reactivation used to calculate time constant. As shown in the graph,  $I_{to}$  in ventricular myocytes of AT1R mice recovered from inactivation more slowly than in CTL myocytes (time constant, CTL =  $34 \pm 2$  ms and AT1R =  $79 \pm 7$  ms for AT1R ( $p = 0.000001$ )).

### *Inactivation parameters of $I_{Kur}$*

The voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{Kur}$  was comparable in CTL and AT1R . Number of cell studied was 12 for CTL and 6 for AT1R group ( $V_{1/2}$ , CTL =  $-41.4 \pm 1.1$  mV and AT1R =  $-41.1 \pm 1.1$  mV,  $p = 0.9$ ; slope factor, CTL =  $6.0 \pm 0.4$  mV and AT1R =  $6.2 \pm 1.0$  mV,  $p = 0.9$ ). Recovery from inactivation of  $I_{Kur}$  was also comparable ( $p = 0.4$ ) in CTL and transgenic myocytes, with time constants of  $552 \pm 59$  ms in CTL ( $n = 12$ ) compared to  $490 \pm 33$  ms in AT1R ( $n = 9$ ). These results indicate that inactivating kinetic properties of  $I_{Kur}$  were not affected

in AT1R ventricular myocytes compared to CTL. The variation in  $I_{Kur}$  density observed in AT1R mice cannot be explain by changes in  $I_{Kur}$  kinetics parameters.

***K<sup>+</sup> channels protein expression in AT1R mouse ventricle***

In parallel studies, using Western blot analysis we compared the protein expression levels of the  $K^+$  channels (Kv4.2/Kv4.3, Kv1.5, Kv2.1 and Kir2.1) corresponding to the murine ventricular  $K^+$  currents ( $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$ , respectively) (Brouillette *et al.*, 2004). In line with the electrophysiological data, protein expression of Kv1.5 and Kir2.1 were lower in AT1R ventricle compared with CTL ventricle (Figure 8). Of the two isoforms responsible for  $I_{to}$ , only the protein expression of Kv4.2 was reduced in the AT1R mice; Kv4.3 being similar between the two groups. Finally, as for the current density of  $I_{ss}$ , the protein expression of Kv2.1 was not altered in AT1R mice (the number of ventricles studied was 5 in both groups).



## DISCUSSION

A detailed analysis of cardiac electrophysiological function was undertaken in the AT1R mice. The use of telemetry to continuously monitor ECG in conscious 6-8 month old male AT1R mice reveals spontaneous arrhythmias and longer QTc intervals. Current- and voltage-clamp studies in single right ventricular myocytes demonstrated that action potential duration and K<sup>+</sup> currents (I<sub>to</sub>, I<sub>Kur</sub> and I<sub>K1</sub>) were altered in AT1R mice. These alterations were primarily due to a reduction in the protein expression levels of corresponding K<sup>+</sup> channels (Kv4.2, Kv1.5, Kir2.1) and changes in the inactivation kinetic properties of I<sub>to</sub>. Overall, these results strongly suggest that the increased arrhythmic risk observed in presence of chronic AT1 receptor stimulation may be due to alterations in ventricular repolarization properties.

The increased incidence of cardiovascular mortality associated with hypertrophy and heart failure is largely due to the high prevalence of lethal ventricular arrhythmias. In fact, a common electrical alteration usually present in these heart diseases is the prolongation of action potential duration, (Beuckelmann *et al.*, 1993; Kaab *et al.*, 1996) most likely due to downregulation of K<sup>+</sup> channel expression and subsequent decrease of K<sup>+</sup> currents. (Hart, 1994; Tomita *et al.*, 1994; Bénitah *et al.*, 1993; Lebeche *et al.*, 2004) Although considerable development has been made in elucidating the role of ANG II in ventricular remodelling, (Molkentin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Molkentin *et al.*, 2000) the causal relationship between Ang II and the electrophysiological abnormalities usually associated with ventricular hypertrophy and remodelling has not been directly examined. Blockade of Ang II type 1 receptor (with an Ang II type 1 receptor antagonist, ARA) has been shown to improve the arrhythmia morbidity in mice with ventricular hypertrophy (Zhang *et al.*, 2006). In addition, the regression of ventricular hypertrophy by an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) restored normal ventricular action potential duration,

refractoriness and susceptibility to ventricular fibrillation (Rials *et al.*, 1997) Although, no detailed characterization of cellular cardiac excitability has been completed using genetically engineered mouse models, some studies had reported a relationship between ANG II and ionic currents. In vascular smooth muscle cells, ANG II has been shown to inhibit several  $K^+$  channels, including  $K_{ATP}$ ,  $B_{Kca}$ , and  $K_v$  channels (Hayabuchi *et al.*, 2001; Toro *et al.*, 1990; Clement-Chomienne *et al.*, 1996; Kubo *et al.*, 1997; Minami *et al.*, 1995). Similarly, different groups have reported that cardiac  $K^+$  currents are attenuated after application of ANG II (Zhang *et al.*, 2001; {Yu *et al.*, 2000; {Shimoni *et al.*, 2006, {Shimoni *et al.*, 2005; {Shimoni *et al.*, 2004a; Shimoni *et al.*, 2004b; Shimoni *et al.*, 2003a; Shimoni *et al.*, 2003b; {Shimoni, 2001). Furthermore, in some studies, the effects of ANG II could be reversed when the effects of Ang II was blocked with angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) or angiotensin receptor antagonist (ARA)(Shimoni, 2001).

In a separate study, we demonstrated that cardiac-specific overexpression of the wild-type  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors ( $\alpha_{1B}$ -AR) leads to repolarization defects, ventricular arrhythmias and sudden death (under review at *Circulation*, July 2006). Since ANG II and norepinephrine, which activate AT1 and  $\alpha_1$ -AR, respectively are known to be involved in the initiation of cardiac remodelling, the idea that both biological factors may also be involved in electrical remodelling under pathological conditions would not seem surprising. Moreover, the delayed repolarization phenotypes described in the  $\alpha_{1B}$ -AR and AT1R mice share some similarities. In both transgenic models, the mice were experiencing spontaneous ventricular arrhythmias and the QTc interval and action potential duration were prolonged. However, the individual  $K^+$  currents/channels affected were not identical in both models. AT1 and  $\alpha_1$ -AR are coupled to similar downstream

signalling pathways. However, evidence suggests that these receptors may use different mechanisms to decrease  $K^+$  channel gene expression (Zhang *et al.*, 2001). For instance, Po *et al.* demonstrated a role for PKC in the  $\alpha$ -adrenergic regulation of Kv4.3, (Po *et al.*, 2001) whereas in vascular smooth muscle cells, ANG II reduces the density of the current produced by Kv channels and  $K_{ATP}$  through both activation of PKC and inhibition of PKA (Hayabuchi *et al.*, 2001). Thus, it is a likely possibility that the downregulation of cardiac  $K^+$  channels by AT1R and  $\alpha_{1B}$ -AR stimulation would be mediated through different signalling pathways. Additional studies will be required to address this question.

In summary, we found that cardiac-specific overexpression of the human type 1 ANG II receptor is associated with delayed ventricular repolarization phenotype in mice. These findings could explain the higher incidence of ventricular arrhythmia observed in presence of chronic AT1 receptor activation. Moreover, results presented here could contribute to explain the reduction of arrhythmic mortality observed in patients treated with angiotensin converting enzyme inhibitors or ANG II type 1 receptor antagonists (Zhang *et al.*, 2006, Pitt *et al.*, 1997).

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR to CF). C. Fiset is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The authors are thankful to M.A. Lupien, M.A. Gillis and M. Laprise for skilled technical assistance.

### FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Comparison of ventricular repolarization between 6-8 month old CTL and AT1R mice**

A. Representative lead I ECG recording obtained with a continuous 24-hour telemetry monitoring in conscious and unrestrained CTL and AT1R mice (n = 6/group). AT1R mice present monomorphic ventricular tachycardia (bottom trace). Example of normal sinus rhythm recorded in CTL mouse (top trace) and do not present rhythm abnormalities for the same recording period. B. Comparison of the QT interval between the two groups. Typical example of lead I surface ECG recording from CTL and AT1R. Table comparing means values of QT, QTc and heart rate between CTL (n = 7) and AT1R (n = 7) mice (\* P < 0.05) obtained with surface ECG recording.

**Figure 2. Comparison of the action potential duration (APD) between AT1R and there CTL littermate mice.**

A. Presents typical example of action potential recorded at 4 Hz of frequency in CTL and AT1R ventricular myocytes. B. Bar graph presenting mean APD ( $\pm$  SEM) at 20%, 50% and 90% of repolarization in CTL (n = 13) and AT1R (n = 14) ventricular myocytes (\*p < 0.05).

**Figure 3. Total K<sup>+</sup> current (I<sub>peak</sub>) recorded in CTL and AT1R ventricular myocytes**

A. Typical example of total K<sup>+</sup> current (I<sub>peak</sub>) recorded in CTL and AT1R ventricular myocytes. Voltage protocol is presented in inset. B. Mean current-voltage (I-V) relationship presented as a mean I-V curve for I<sub>peak</sub> CTL and AT1R myocytes. Results correspond to 15 CTL and 11 AT1R myocytes (\*p < 0.05).

**Figure 4. Comparison of the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current (I<sub>to</sub>) between CTL and AT1R ventricular myocytes**

A. Typical example of I<sub>to</sub> current family (A) and corresponding mean I-V curve (B) for this current were presented. I<sub>to</sub> was calculated by subtracting family trace recorded with and without inactivating prepulse at -40 mV for 100 ms. Each current was normalized for corresponding cell capacitance. I<sub>to</sub> was decreased in AT1R cells (n = 12) compared to CTL (n = 10), \*p < 0.05.

**Figure 5. Comparison of the ultra-rapid delayed rectifier  $K^+$  current ( $I_{Kur}$ ) between CTL and AT1R myocytes**

A. Superimposed current records corresponding to  $I_{Kur}$  B. Corresponding mean I-V relationship for  $I_{Kur}$  Data were pooled from 11 CTL and 8 AT1R cells. Density of  $I_{Kur}$  was significantly smaller in AT1R compared to CTL, \* $p < 0.05$ .

**Figure 6. Comparison of the steady-state outward  $K^+$  current ( $I_{ss}$ ) and the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) between CTL and AT1R mouse ventricular myocytes.**

A. Representative examples of  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$  from CTL and AT1R myocytes. B. Corresponding mean I-V curves for  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$ . Outward  $K^+$  current ( $I_{ss}$ ) was similar in CTL and AT1R (CTL  $n = 11$ ; AT1R  $n = 8$ , NS). However, current density of  $I_{K1}$ , which was activated by voltage steps ranging from  $-110$  mV to  $-40$  mV, was different in the two groups. (CTL  $n = 14$ ; AT1R  $n = 11$  \* $p < 0.05$ )

**Figure 7. Steady-state inactivation and reactivation of  $I_{to}$  in CTL and AT1R mouse ventricular myocytes.**

A. Voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$ . Left- Typical example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol. The 100 ms inactivating prepulse potential was varied from  $-110$  to  $-10$  mV; the 1-sec test pulse potential was  $+30$  mV (protocol shown in inset). Right- Plot of voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$ . The amplitude of  $I_{to}$  for each prepulse membrane potential was determined by subtracting each test pulse current with that obtained with the  $-40$  mV prepulse. The  $I_{to}$  test pulse amplitude was normalized to the amplitude at the most negative prepulse potential. Data were pooled from 12 CTL and 8 AT1R cells. B. Reactivation of  $I_{to}$  in CTL and AT1R mouse ventricular myocytes. Right- Example of family of membrane currents produced by a two pulse voltage-clamp protocol, showing the time-course of recovery of  $I_{to}$  from inactivation. A 500 ms inactivating pulse ( $+50$  mV) was followed at intervals of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 400, and 600 ms by an identical 500 ms test pulse. Left- Membrane potential dependence of recovery from inactivation of  $I_{to}$ . Data were pooled from 12 CTL and 8 AT1R cells.  $P_2/P_1$  is the ratio of test pulse current/prepulse current amplitudes.  $I_{to}$  amplitude was measured as the difference between peak

outward current and the current 150 ms after the peak. The holding and interpulse potential were  $-80$  mV. The smooth lines are best-fit single exponential functions.

**Figure 8. Comparison of  $K^+$  channel protein expression in CTL and AT1R ventricles.**

**A.** Western blot analysis of Kv4.2 (1:1000, 70kDa), Kv4.3 (1:5000, 70 kDa), Kv1.5 (1:500, 75 kDa), Kv2.1 (1:500, 118 kDa) and Kir2.1 (1:500, 60 kDa) on sarcolemmal-enriched fraction (100 ug/lane, 1 ventricle/sample) isolated from CTL and AT1R ventricle. Equal protein loading was confirmed by ponceau-S stained membranes. All antibodies used were from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), excepted for Kv1.5, which was purchase from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Compared with their age-matched controls, protein expression of Kv4.2, Kv1.5 and Kir2.1 were decreased in AT1R, whereas Kv4.3 and Kv2.1 were unchanged (n = 5 for each group).

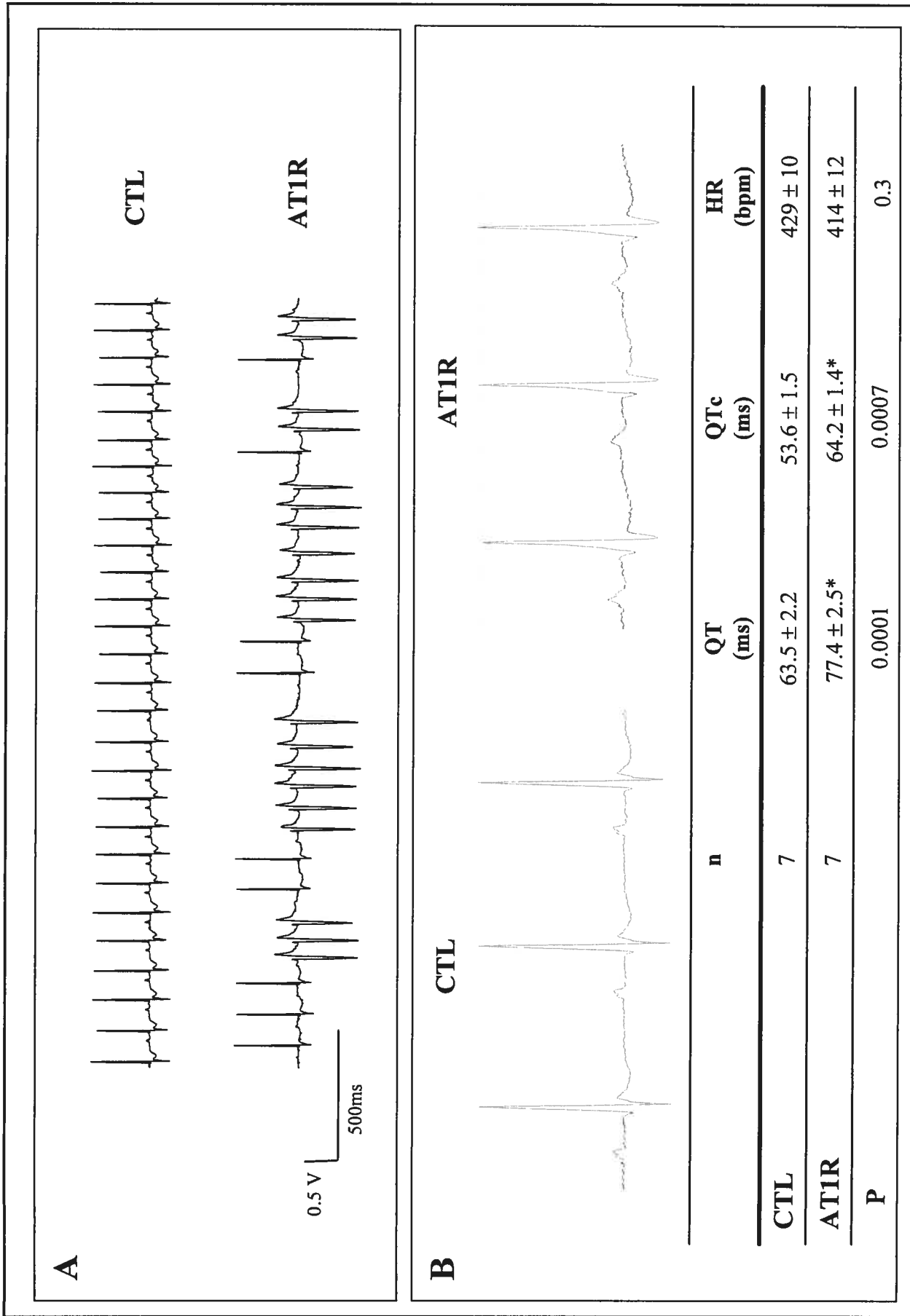


Figure 1



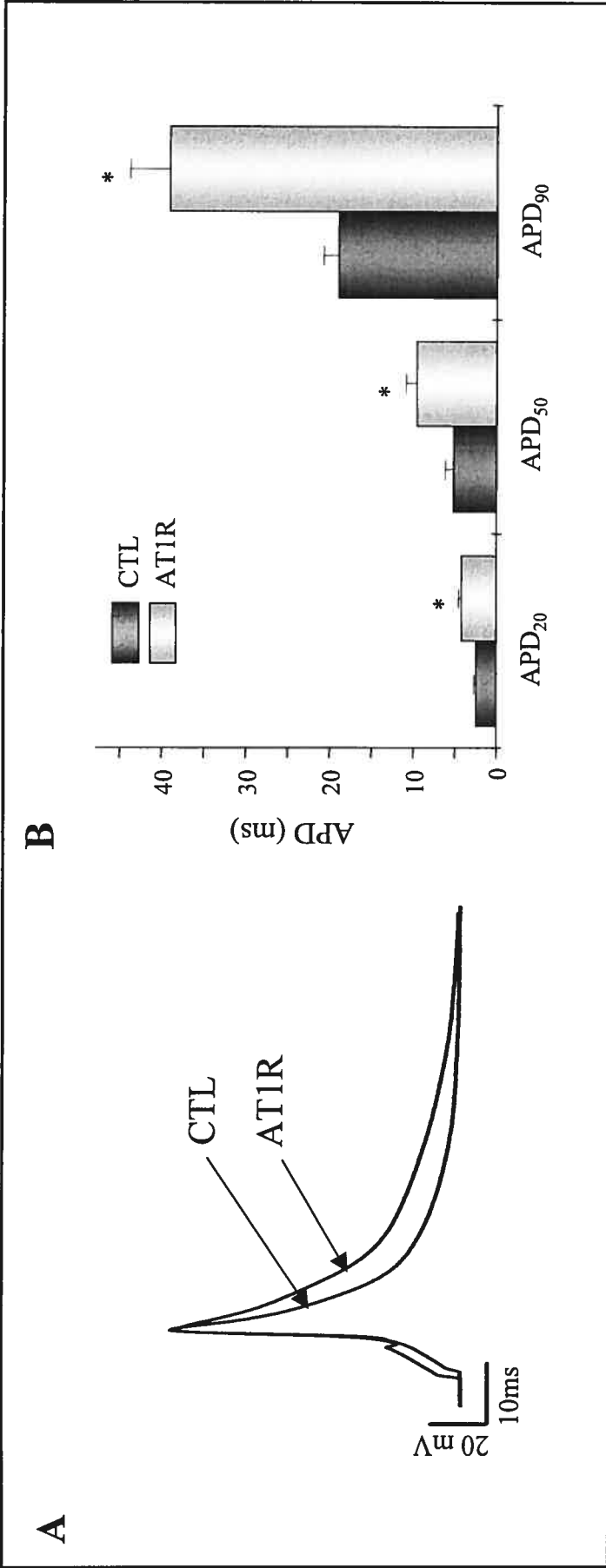


Figure 2

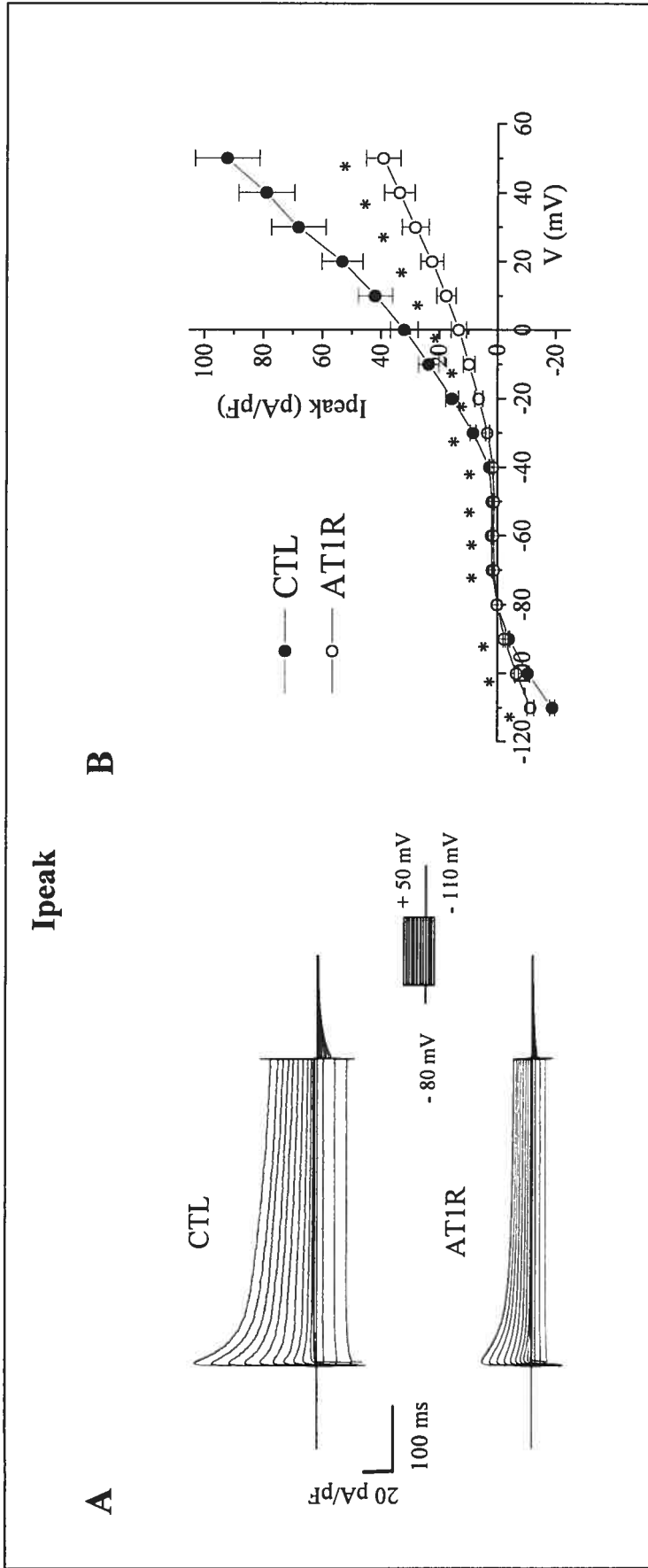


Figure 3

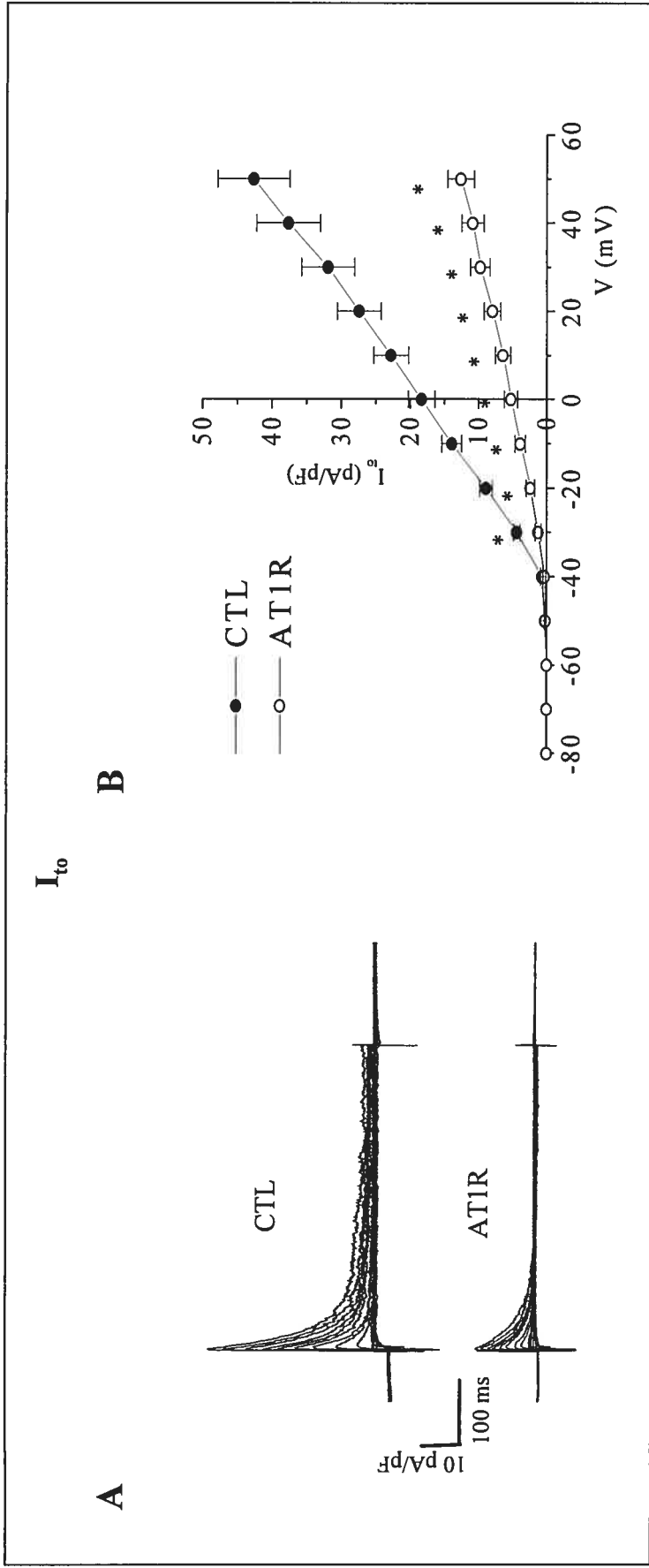


Figure 4

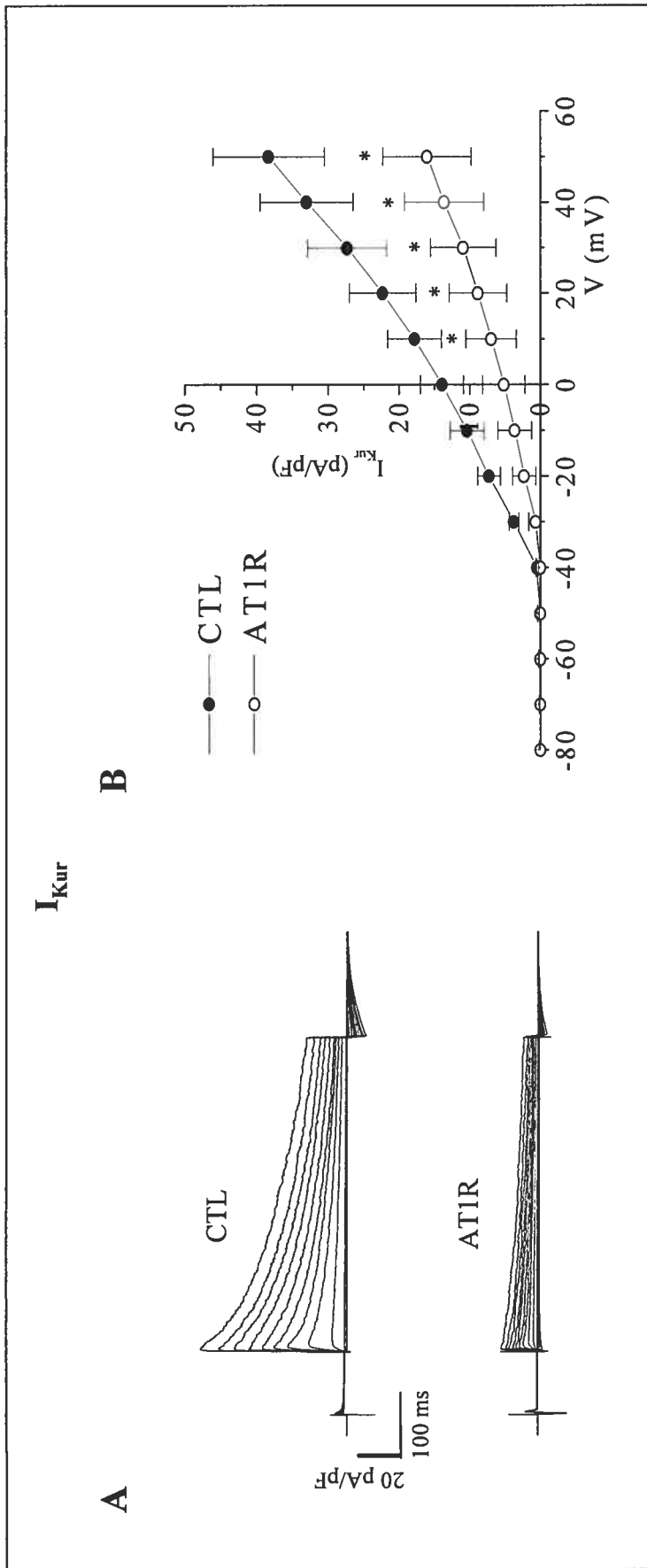


Figure 5

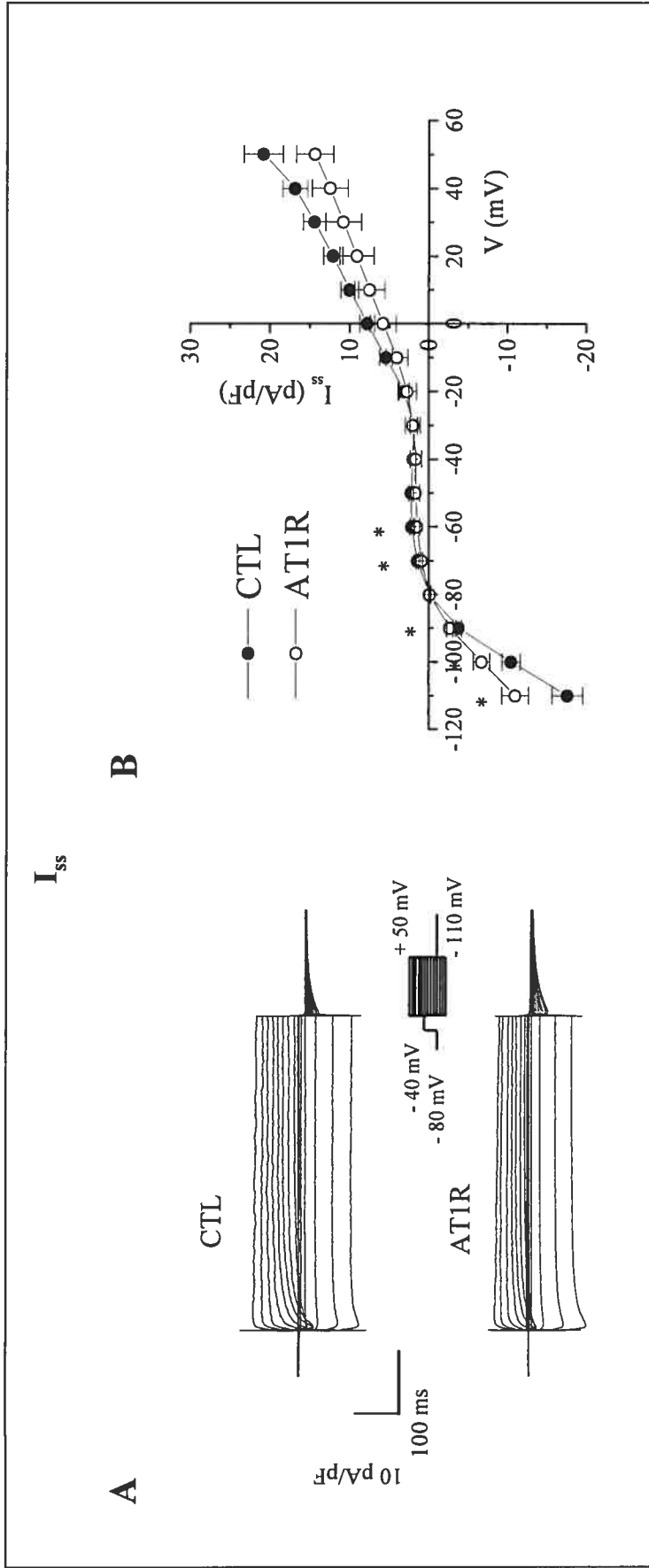


Figure 6

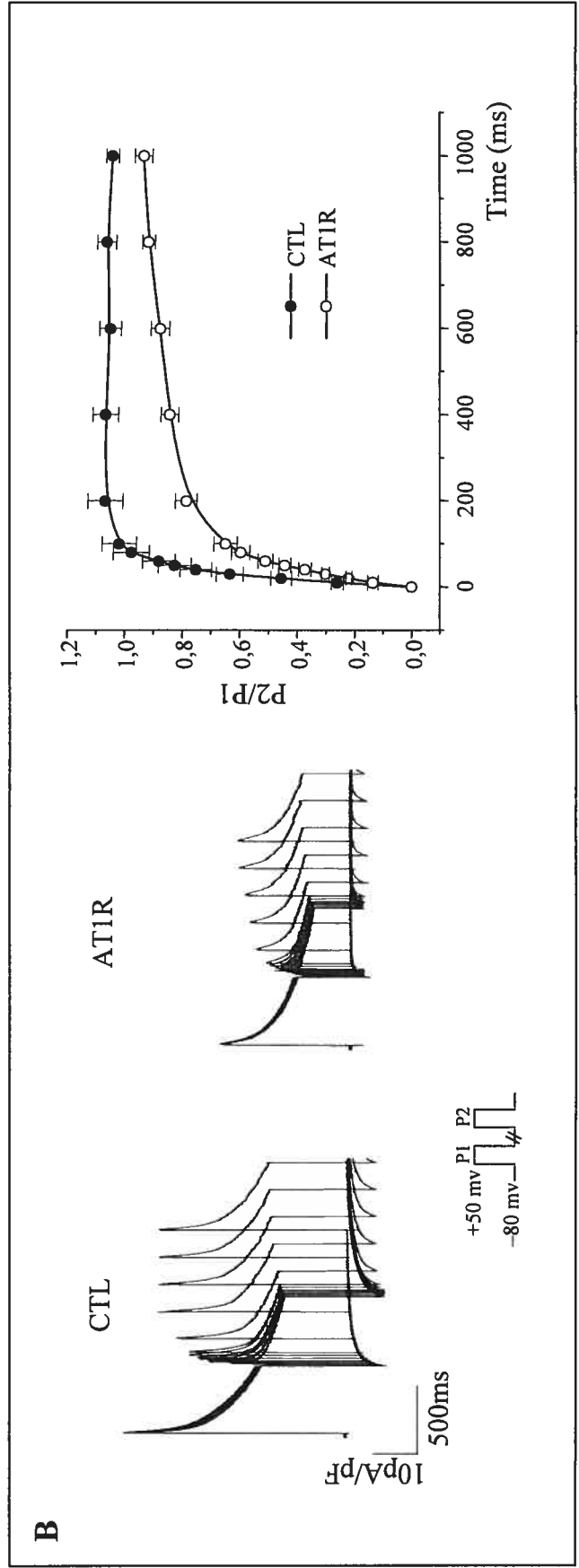
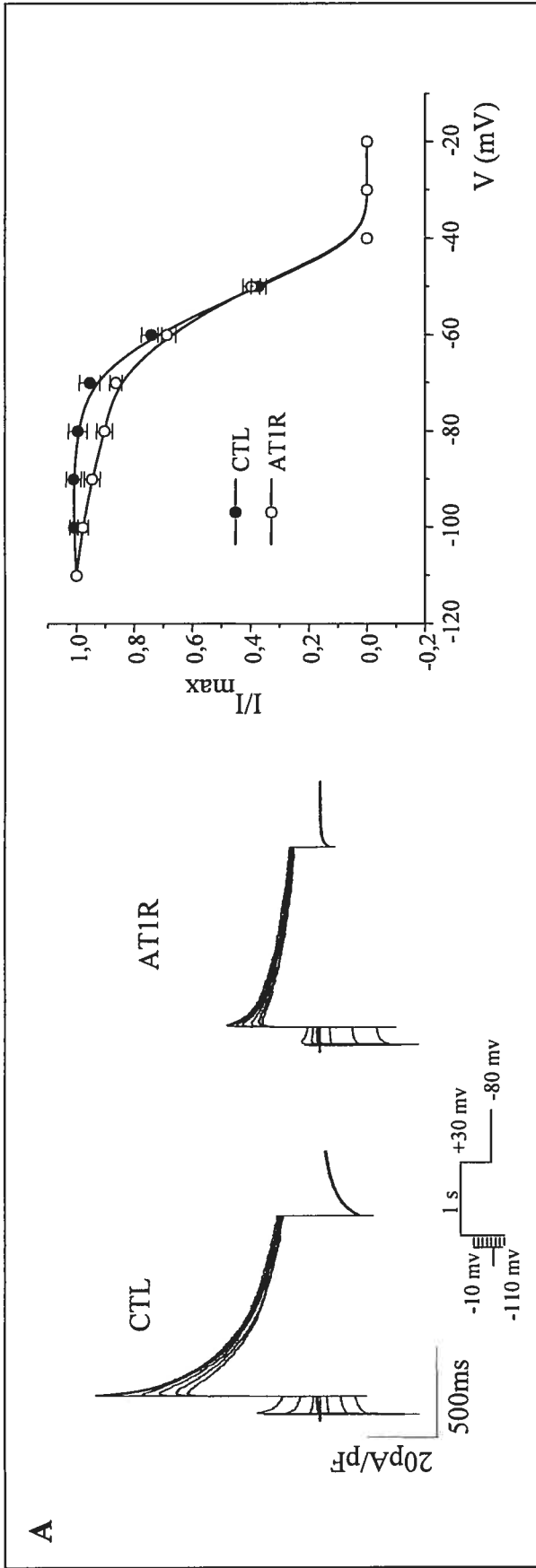


Figure 7

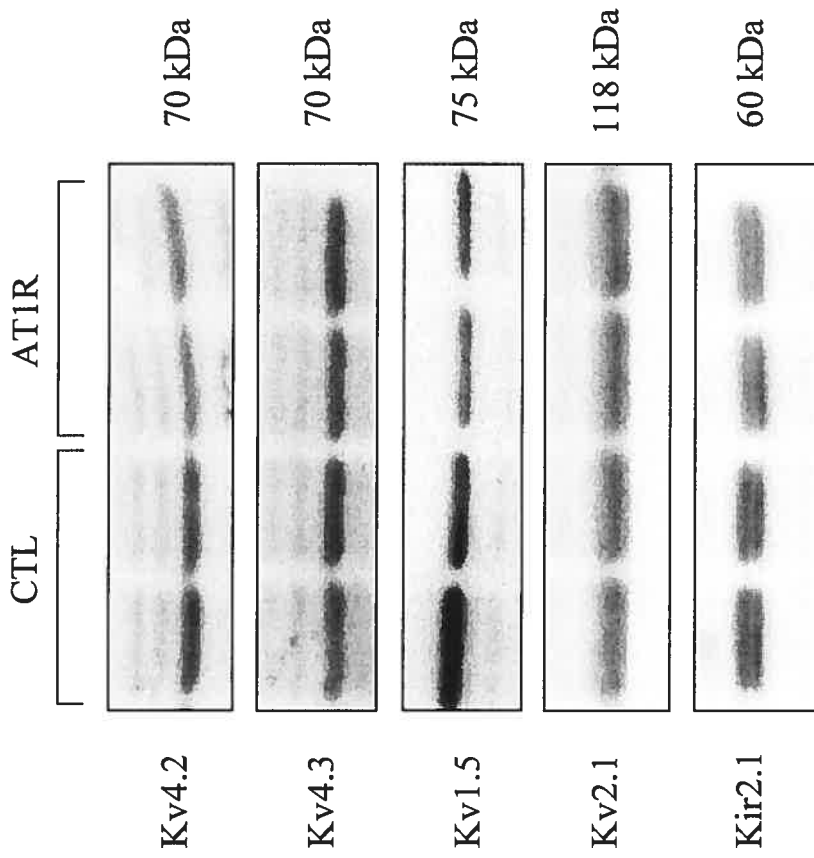


Figure 8

## REFERENCES

- Akar, FG., Spragg, DD., Tunin, RS., Kass, DA. & Tomaselli, GF., Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonschemic dilated cardiomyopathy. *Circulation Research*, 2004; 95: 717-25.
- Benitah, JP., Gomez, AM., Bailly, P., Da Ponte, JP., Berson, G., Delgado, C. & Lorente, P., Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *Journal of Physiology*; 469: 111-138.
- Beuckelmann, DJ., Nabauer, M. & Erdmann, E., Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure, *Circulation research*, 1993; 73(2): 379-85.
- Brouillette, J., Clark, RB., Giles, WR & Fiset, C., Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *Journal of physiology*, 2004; 559(3): 777-98.
- Clement-Chomienne, O. Walsh, MP & Cole WC, Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular myocytes, *Journal of physiology*, 1996; 495(3) : 689-700.
- Flesch, M., Hoper, A., Dell'Italia, L., Evans, K., Bond, R., Peschck, R., Diwan, A., Brinsa, TA., Wei, CC., Sivasubramanian, N., Spinale FG. & Mann, DL., Activation and functional significance of the rennin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor, *Circulation*, 2003; 108(5):598-604.
- De Gasparo, M., Catt, KJ., Inagami, T., Wright JW. & Under, TH., International union of pharmacology: XXIII: The Angiotensin II receptor, *Pharmacological reviews*, 2000; 52: 415-72.
- Donoghue, M., Wakimoto, H., Maguire, CT., Acton, S., Hales, P., Stagliano, N., Fairchild-Huntress, V., Xu, J., Lorenz, JN., Kadambi, V., Berul, CI & Breitbart, RE., Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins., *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2003; 35(9): 1009-10.
- Fiset, C. Clark, RB., Larsen TS. & Giles, WR., A rapidly activating sustained K<sup>+</sup> current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *Journal of Physiology*, 1997; 504(3): 557-63.
- Guimaraes, S. & Pinheiro, Functional evidence that in the cardiovascular system AT1 angiotensin II receptors are AT1B prejunctionally and AT1A postjunctionally, *Cardiovascular research*, 2002;67: 208-215.
- Hart, G., Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure, *Cardiovascular research*, 1994; 28(7): 933-46.



Hayabuchi, Y. Standen, N.B., & Davies, N.W., Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K<sup>+</sup> channels of rat arterial smooth muscle, *American journal of physiology, heart and circulation physiology*, 2001; 281(6): H2480-89.

Ito, M., Oliverio, M.I., Best, C.F., Meada, N., Smithies, O. & Coffman, T.M., Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene., *Proceeding of the national Academy of science(PNAS)*, 1995; 92(8): 3521-5.

Kaab, S., Nuss, H.B., Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Pak, P.H., Kass, D.A., Marban, E. & Tomaselli G.F. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation Research*, 1996; 78(2): 262-73.

30) (1305) Lebeche, D., Kaprielian R., del Monte, F., Tomaselli, G., Gwathmey, J.K., Schwartz, A. & Hajjar, R.J., In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis. *Circulation*, 2004; 110(22): 3435-43.

Kubo, M., Quayle, J.M. & Standen, N.B., Angiotensin II inhibition of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in rat arterial smooth muscle cells through protein kinase C, *Journal of physiology*, 1997; 503(3): 489-96.

Lizotte, E., Tremblay, A., Allen, B. & Fiset, C., Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical biochemistry*, 2005; 345(1): 47-54.

Minami, K., Hirata, Y., Tokumura, A., Nakaya, Y. & Fukuzama, K., Protein kinase C-independent inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel by angiotensin II and endothelin-1, *Biochem Pharmacol.* 1995; 49(8):1051-6.

Mitchell, G., Jeron, A. & Koren, G., Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse, *American journal of physiology*, 1998; 274(43): H747-51.

Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R. & Olson E.N., A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy, *Cell*, 1998; 93(2): 215-28.

Molkentin, J.D., Calcineurin and Beyond: cardiac hypertrophy signalling., *Circulation Research*, 2000; 87(9): 731-8.

Nakamura, K., Fushimi, K., Mihara, K., Miyazaka, M., Ohe, T. & Namba, M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II., *Circulation*, 1998; 98(8): 794-9.

Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F.W., Thibault, G., Nemer, M., Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodelling, *Proceeding of the national Academy of science(PNAS)*, 2000; 97(2): 931-6.

Pitt, B., Segal, R., Martinez, F.A., Merers, G., Cowley, A.J., Thomas, I., Deedwania, P.C., Ney, D.E., Snavely, D.B. & Chang, P.I., Randomized trial of losartan versus captopril in patients over 65

with heart failure (Evaluation of losartan in the Elderly Study, ELITE), *Lancet*, 1997, 349(9054): 747-52.,

Po, SS., Wu, RC., Juang, GJ., Kong, W. & Tomaselli, GF., Mechanism of  $\alpha$ -adrenergic regulation of expressed hKv4.3 currents. *American journal of physiology*, 2001; 281(6): H2518-27.

Rials, SJ., Wu, Y., Xu, X., Filart, RA., Marinchak, RA. & Kowey PR., Regression of left ventricular hypertrophy with captopril restores normal ventricular action potential duration, dispersion of refractoriness, and vulnerability to inducible ventricular fibrillation., *Circulation*, 1997; 96(4):1330-6.

Ryan, MJ., Didion, SP., Mathur, S., Faraci, FM. & Sigmund, CD., Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice., *Hypertension*, 2004; 43(5): 1074-9.

Shimoni, Y. Inhibition of the formation action of angiotensine II reverses attenuated K<sup>+</sup> currents in type 1 and type 2 diabetes. *Journal of physiology*, 2001; 537(1): 83-92.

Shimoni, Y. & Liu, X-F. Sex differences in the modulation of K<sup>+</sup> currents in diabetic rat cardiac myocytes. *Journal of physiology*, 2003a; 550(2): 401-412.

Shimoni, Y. & Liu, X-F., Role of PKC in autocrine regulation of ventricular K<sup>+</sup> currents by angiotensin and endothelin. *American journal of physiology*, 2003b; 284: H1168-81.

Shimoni, Y., Liu X-F. Gender differences in AngII levels and action on multiple K<sup>+</sup> current modulation pathways in diabetic rats. *American journal of Physiology*, 2004a; 287: H311-H319.

Shimoni, Y., Chuang, M., Abel, ED. & Severson, DL., Gender-dependant attenuation of cardiac potassium current in type 2 diabetic db/db mice. *Journal of Physiology*, 2004b; 555(2): 345-54.

Shimoni, Y., Hunt, D., Chuang, M., Chen, KY., Kargacin, G. & Severson, DL., Modulation of potassium currents by angiotensin and oxidative stress in cardiac cells from the diabetic rat., *Journal of physiology*, 2005; 567(1): 177-90.

Shimoni, Y., Hunt, D., Chen, K., Emmet, T. & Kargacin, G., Differential autocrine modulation of atrial and ventricular potassium currents and of oxidative stress in diabetic rat., *American journal of physiology, heart and circulation physiology*, 2006; 290(5): H1579-88.

Tomita, F., Basset, AL., Myerburg RJ. & Kimura, S., Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes, *Circulation Research*, 1994; 75(2): 296-303.

Toro, L., Amador, M. & Stefani, E, Ang II inhibits calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle in lipid bilayers, *American journal of physiology*, 1990; 258(3pt2): H912-5.

Trépanier-Boulay, V., St-Michel, C., Tremblay, A. & Fiset C., Gender-based differences in cardiac repolarisation in mouse ventricle, *Circulation Research*, 2001; 89: 437-44.

Wang, Z., Kutschke, W., Richardson KE., Karimi, M. & Hill, JA., Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin., *Circulation*, 2001; 104(14): 1657-63.

Xiao, HD., Fuchs, S., Campbell, DJ., Lewis, W., Dudley, SC., Kasi, VS., Hoit, BD, Keshelava, G., Zhao, H., Capecchi, MR. & Bernstein, KE. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death., *American journal of Physiology*, 2004; 165(3): 1019-32.

Yu, H., Gao, J., Wang, H., Wymore, R., Steinberg, S., McKinnon, D., Rosen, M. & Cohen, IS., Effects of the renin-angiotensin system on the current  $I_{to}$  in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circulation Research*, 2000; 86: 1062-8.

Zhai, P., Yamamoto, M., Galeotti, J., Liu, J., Masurekar, M., Thaisz, J., Irie, K., Holle, E., Yu, X., Kupersmidt, S., Roden, DM., Wagner, T., Yatani, A., Vatner, DE., Vatner, SF. & Sadoshima, J., Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutat lacking G alpha q/G alpha I coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice., *Journal of Clinical investigation*, 2005; 115(11): 2971-4.

Zhang, TT., Takimoto, K., Stewart, AFR., Zhu, C. & Levitan, ES., Independent regulation of cardiac Kv4.3 potassium channel expression by angiotensin II and phenylephrine. *Circulation research*, 2001; 88:476-82.

Zhang, C., Yasuno, S., Kuwahara, K., Zankov, D.P., Kobori, A., Makiyama, t. & Horie, M. Blockade of angiotensin II type 1 receptor improves the arrhythmias morbidity in mice with left ventricular hypertrophy, *Circulation journal*, 2006; 70: 335-41.

## Chapitre 3 : Discussion et conclusion

### 3.1 Étude de la repolarisation ventriculaire chez les mâles AT1R de plus de six mois

#### 3.1.1 Résumé des principaux résultats

L'étude de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II spécifiquement au niveau cardiaque a montré que la stimulation chronique du récepteur AT1 au niveau des cardiomyocytes entraîne un retard de repolarisation (prolongation de l'intervalle QT et de la durée du potentiel d'action). Ce retard de repolarisation pourrait être responsable d'arythmies cardiaques survenant de façon spontanée dans ce modèle de souris transgéniques. Par des techniques de patch-clamp, nous avons vu que le retard de repolarisation cardiaque des souris AT1R est dû à une diminution de courants potassiques impliqués dans la repolarisation ventriculaire chez la souris,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{K1}$ . La diminution des courants  $K^+$  est causée par une diminution de l'expression protéique des canaux Kv4.2, Kv1.5 et Kir2.1 au niveau membranaire ainsi qu'à la réactivation plus lente du courant  $I_{to}$  chez les AT1R comparativement aux souris témoins de type sauvage (contrôles). L'expression des protéines des canaux Kv4.3 (deuxième sous-unité de  $I_{to}$ ) et Kv2.1 ( $I_{ss}$ ) est semblable entre les deux groupes de souris. Selon les résultats de l'étude de la repolarisation ventriculaire des mâles AT1R de 6 mois, la stimulation chronique du récepteur de type 1 de l'Ang II au niveau des cellules cardiaques affecte les courants  $K^+$  et favorise ainsi l'apparition d'arythmies cardiaques.

#### 3.1.2 Effets de l'angiotensine II sur les courants $K^+$ dans la littérature

D'autres groupes ont aussi tenté de voir les effets de l'Ang II sur les courants potassiques. Cependant, dépendamment des groupes d'études, des courants étudiés, des techniques employées ou du modèle animal utilisé, les effets rapportés sont variables d'une étude à l'autre.

##### 3.1.2.1 Le courant $K^+$ transitoire sortant, $I_{to}$

Une observation majeure ressortant des études portant sur les effets de l'Ang II sur les courants  $K^+$ , est la diminution de  $I_{to}$ . De façon générale, ce courant est sûrement le plus étudié à cause de son rôle majeur dans le potentiel d'action et aussi à cause de sa présence dans bon

nombre d'espèces animales. Généralement, toutes les études portant sur les effets de l'Ang II au niveau de ce courant  $K^+$  ont rapporté une diminution marquée de la densité du courant transitoire ou de l'expression des protéines formant son canal.<sup>73,74,75,76,77,78,79,80</sup>

### 3.1.2.2 Les courants $K^+$ à rectification retardée sortante

Contrairement à  $I_{to}$ , peu d'études ont été faites sur les effets de l'Ang II sur les autres courants  $K^+$  sortants dépendants du voltage. De plus, la plupart des études ne rapportent pas toutes les mêmes effets du peptide vasoactif sur ce type de courant. Par exemple, Daleau et coll. ont vu chez le cobaye que l'Ang II augmente le courant  $I_{Kr}$  mais diminue le courant  $I_{Ks}$ , ce qui résulte globalement en une prolongation de la phase plateau du potentiel d'action et retarde la repolarisation.<sup>81</sup> Alors que le groupe de Shimoni a rapporté que l'Ang II diminuait le courant  $I_{sus}$ .<sup>82,83</sup> Plus récemment, une étude réalisée par Zankov et coll. a montré que l'administration aiguë d'Ang II augmentait la densité du courant  $I_{Ks}$  dans des cellules d'oreillettes chez le cobaye.<sup>84</sup>

### 3.1.2.3 Le courant à rectification entrante $I_{K1}$

Le lien entre l'Ang II et le courant entrant  $I_{K1}$  a également fait l'objet de quelques études. Comme pour les courants à rectification sortante retardée, ce courant ne semble pas toujours modulé de la même façon dépendamment du type de cellules étudiées. Par exemple, l'incubation de 1  $\mu$ M d'Ang II augmente  $I_{K1}$  dans les myocytes ventriculaires de lapin,<sup>79,85</sup> alors que Caballero et coll. n'ont vu aucun changement dans l'amplitude de ce courant par l'ajout d'Ang II dans les cardiomyocytes de rats<sup>73</sup>, et que Park et coll. ont vu une inhibition de  $I_{K1}$  dans les cellules musculaires lisses de l'artère coronarienne par l'augmentation de l'action de l'Ang II.<sup>86</sup>

### 3.1.2.4 Mécanismes d'action des effets de l'angiotensine II sur les courants $K^+$

Le fait que plusieurs études ont montré qu'une augmentation de l'action de l'Ang II est reliée à des changements de densité des courants ioniques (entre autres à une diminution de  $I_{to}$ ), les mécanismes d'action ainsi que les voies de signalisation intracellulaires responsables de ces effets ne sont pas encore compris et bien caractérisés. Dans certains modèles, l'Ang II semble agir sur l'expression des canaux à la membrane cellulaire, tel qu'observé par Zhang et ses collaborateurs qui ont rapporté une diminution de l'expression de Kv4.3 après l'incubation d'Ang

II dans des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés.<sup>75</sup> Même s'il est connu que l'activation du récepteur AT1 puisse agir au niveau de la transcription des gènes, la diminution de l'expression protéique de Kv4.3 à la membrane cellulaire pourrait ne pas être causée par des effets au niveau de la transcription du gène mais plutôt par l'interaction plus directe entre le récepteur AT1 et le canal. Ainsi, l'activation de cascades intracellulaires via la liaison de l'Ang II au récepteur AT1 pourrait par exemple moduler directement l'ouverture du canal potassique ou sa localisation (cytosolique ou membranaire). Cette possibilité a été confirmée par le groupe de Cohen qui a montré qu'il y aurait une interaction entre le récepteur de l'Ang II et Kv4.3 par immunoprécipitation du canal avec le récepteur AT1 suite à la liaison de l'Ang II avec son récepteur.<sup>74</sup> Yu et ses collaborateurs ont également observé que l'Ang II n'agirait pas sur l'expression du canal mais plutôt sur ses propriétés cinétiques.<sup>76</sup>

### 3.1.2.5 Récepteurs et signalisation intracellulaire

Comme on l'a vu précédemment, l'Ang II peut produire ses effets via les récepteurs AT1 ou AT2. Malgré que le groupe de Delpon<sup>73</sup> a vu que la stimulation du récepteur de type 2 pouvait être impliquée dans les effets de l'Ang II sur le courant  $I_{to}$  (sans toutefois avoir d'effet sur  $I_{K1}$ ), il a été montré que les changements de courants observés par l'augmentation de l'activité de l'Ang II pouvaient être bloqués ou renversés par l'administration d'antagonistes spécifiques des récepteurs de type 1 de l'Ang II.<sup>80</sup> Tel que présenté dans le chapitre 1, le récepteur AT1 est couplé à une multitude de cascades intracellulaires, liées ou non aux protéines G. Plusieurs groupes ont tenté d'identifier la voie d'activation reliant le récepteur AT1 aux effets sur les courants ioniques. Malgré tout, cette voie n'a pas encore été clairement élucidée. Dans certains cas, l'activation des PLC et PKC jouerait un rôle important puisque l'inhibition de cette voie amène une augmentation des courants affectés par l'Ang II. Par ailleurs, l'activation de cette même voie prévient cette augmentation ou amène une diminution des courants dans les cardiomyocytes<sup>77</sup> ainsi que dans les cellules musculaires lisses de l'artère coronaire.<sup>86</sup> De plus, Hayabuchi et coll. ont montré que l'inhibition de l'activité des PKA (associée à Gi) ferait aussi partie des voies empruntées agissant sur les courants ioniques lors de l'activation du récepteur AT1 dans les cellules musculaires lisses artérielles chez le rat.<sup>87</sup> Ainsi, les cascades activées par les deux types de protéines G associées au récepteur AT1 (Gq et Gi) pourraient être impliquées

dans les effets observés sur les courants  $K^+$ . La voie empruntée pourrait toutefois être variable selon le type de cellules et de tissus touchés.

### **3.1.2.6 Lien entre la littérature et les résultats obtenus chez les souris AT1R**

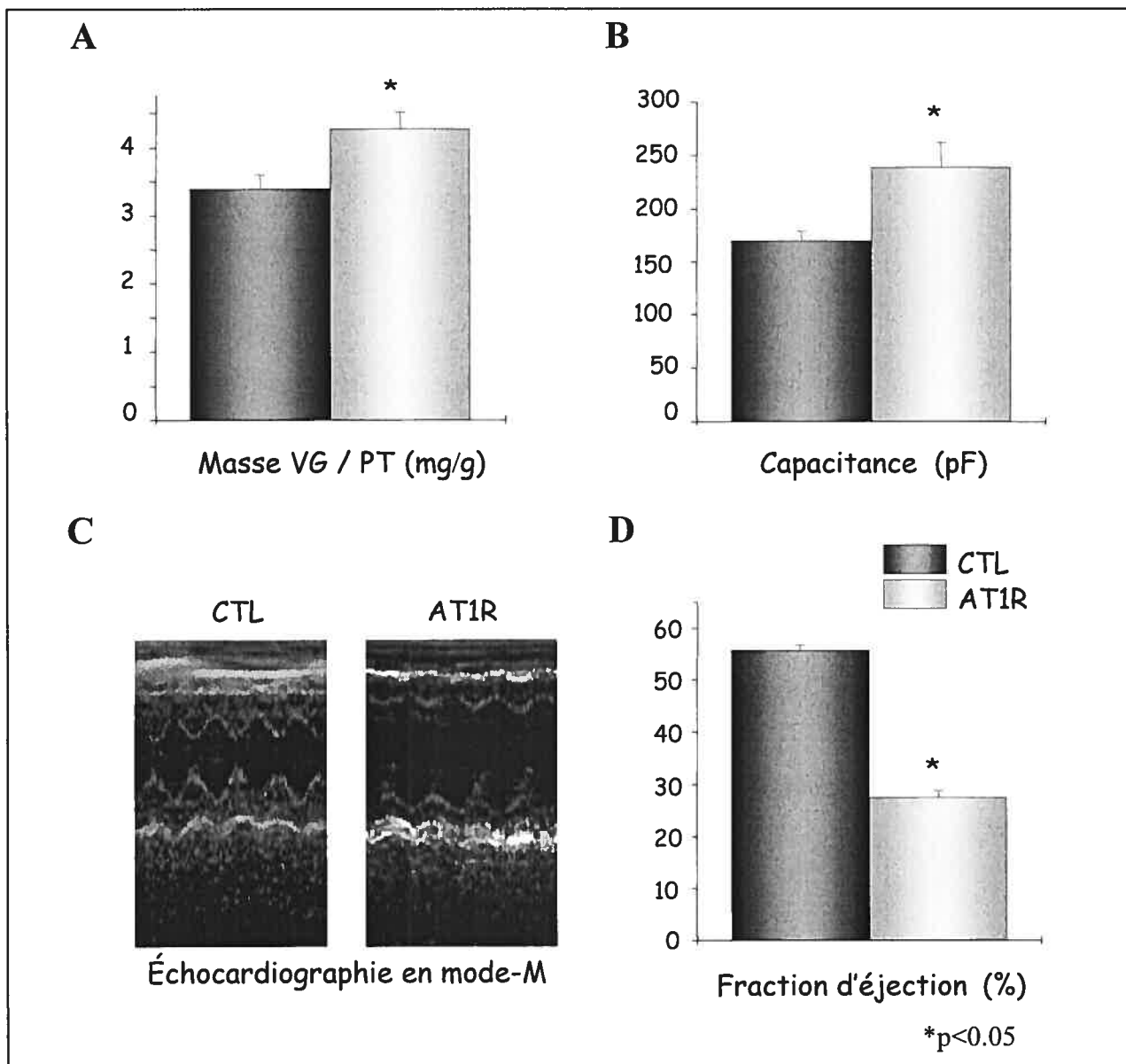
Les résultats obtenus au cours de l'étude de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R de 6 mois nous a montré que la stimulation excessive des récepteurs AT1 au niveau du cœur entraîne une diminution des courants  $K^+$   $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{K1}$ . Cette réduction des courants est causée par une diminution de l'expression des canaux ioniques correspondants ainsi qu'à des changements dans la cinétique d'activation de  $I_{to}$ . Ces résultats concordent en partie avec ceux de la littérature, entre autres pour la diminution de  $I_{to}$ . Le manque de consensus quant aux effets de l'Ang II sur les autres courants  $K^+$  pourrait être expliqué par les différents modèles et techniques expérimentales utilisés par les différents groupes de recherche.

### **3.1.3 Caractérisation du phénotype pathologique cardiaque des souris AT1R âgées de 6-8 mois.**

Nous avons caractérisé le phénotype cardiaque des souris AT1R de plus de six mois. Par échocardiographie nous avons premièrement vu que les ventricules des souris transgéniques étaient plus gros que ceux des souris de types sauvages (contrôles) puisque la masse du ventricule gauche corrigée en fonction du poids total de la souris était plus grande chez les souris AT1R comparée aux souris contrôles (Figure 3.1A). De plus, la mesure de la capacitance (Figure 3.1B) qui est un reflet du volume de la cellule et donc un indice de la grosseur de celle-ci, nous indiquait aussi que les cardiomyocytes provenant des souris AT1R étaient plus gros que ceux des contrôles. Nous avons également vu que la fonction cardiaque des souris AT1R était diminuée puisque la fraction d'éjection du ventricule gauche (calculée selon les dimensions internes du ventricule gauche en diastole et en systole, obtenues par échocardiographie, voir Figure 3.1C) était plus petite chez les souris surexprimant le récepteur à l'Ang II comparativement aux contrôles (Figure 3.1D). Ainsi, nous avons vu que les souris AT1R de six mois présentaient un phénotype pathologique cardiaque qui se manifeste par la présence d'hypertrophie ainsi que par une diminution de la fonction cardiaque.

Plusieurs études ont montré que l'hypertrophie ainsi que l'insuffisance cardiaque sont associés (indépendamment du mécanisme sous-jacent ou de la sévérité de la maladie) à des troubles de repolarisation causés par l'inhibition de courants ioniques.<sup>88, 89,90,91</sup> Nous ne pouvons ainsi conclure que le retard de repolarisation observé chez les souris AT1R était lié directement à l'effet de l'Ang II plutôt qu'à l'une ou l'autre de ces pathologies. Nous avons ainsi étudié la repolarisation ventriculaire chez d'autres groupes de souris transgéniques qui ne présentent pas ce phénotype pathologique cardiaque.





**Figure 3.1** Caractérisation du phénotype pathologique cardiaque des souris AT1R de 6-8 mois

- A)** La masse du ventricule gauche (VG) corrigée en fonction du poids total des souris (PT). Les enregistrements de 7 souris contrôles et de 7 AT1R ont été combinés pour l'analyse par échocardiographie.
- B)** La capacitance des cardiomyocytes ventriculaires de souris CTL et AT1R a été mesurée par la technique de patch-clamp. La capacitance est un indice du volume de la cellule donc de la grosseur de celle-ci. (n, CTL=18 et AT1R=10)
- C)** Exemple d'enregistrements d'échocardiographie en mode-M faits chez les CTL et les AT1R qui ont servi à mesurer les dimensions internes du ventricule gauche en systole et en diastole
- D)** La fraction d'éjection est un indice de la fonction cardiaque. Elle a été calculée à partir des enregistrements d'échocardiographie. Fraction d'éjection du VG (%) =  $(LVIDd - LVIDs / LVIDd) \times 100$  (où LVIDd/s correspond aux dimensions internes du ventricule gauche en diastole et en systole).

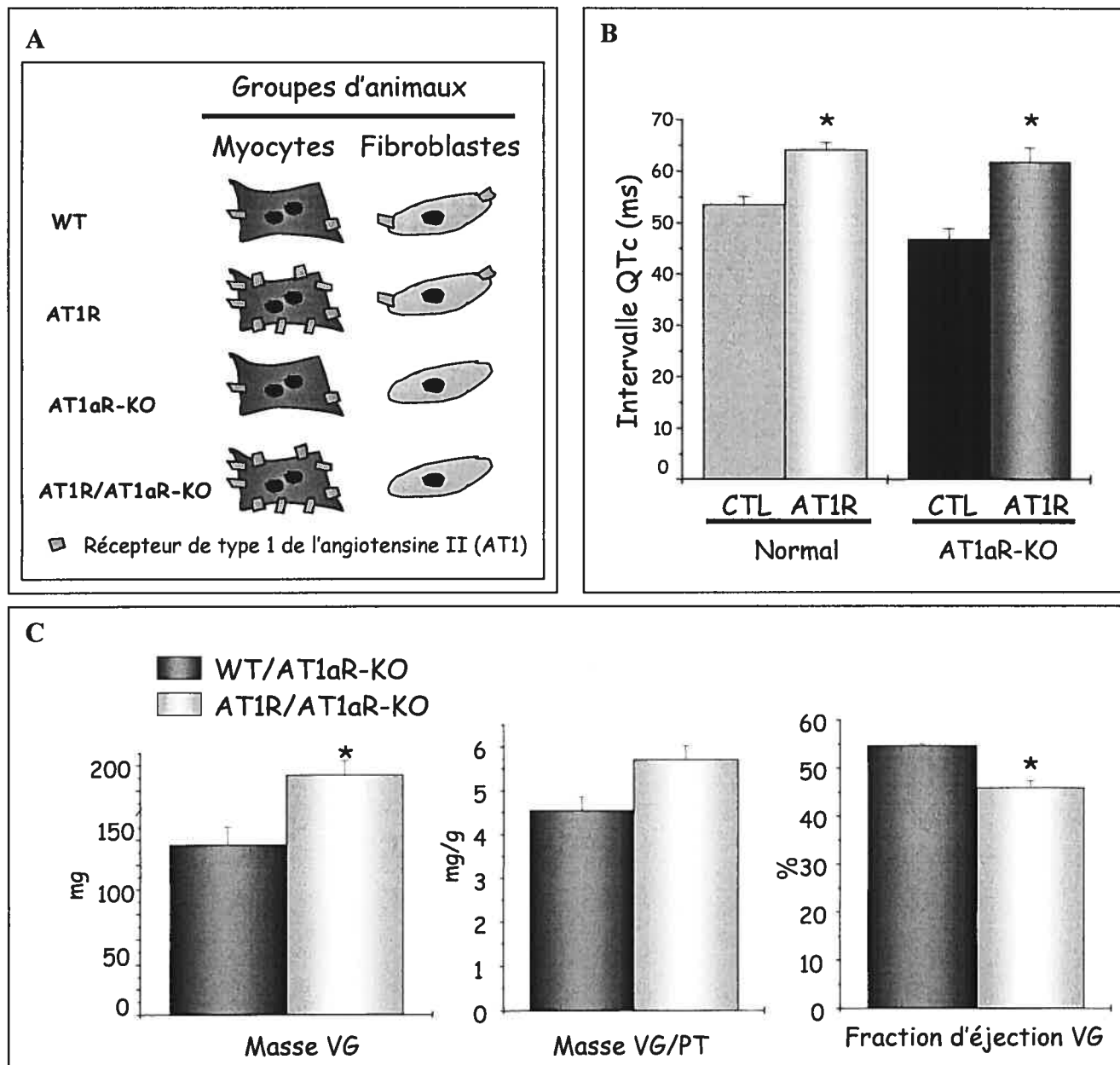
## **3.2 Les souris mâles AT1R/AT1aR-KO**

### **3.2.1 Le modèle de souris AT1R/AT1aR-KO**

Le premier modèle que nous avons utilisé afin de démontrer que l'hypertrophie ou l'insuffisance cardiaque n'étaient pas responsables des troubles de repolarisation observés chez les mâles AT1R de six mois, est le modèle de souris AT1R/AT1aR-KO. Ce modèle de souris a été créé à partir de souris transgéniques n'exprimant pas le sous-type a du récepteur de type 1 (AT1a) de l'Ang II, les souris AT1aR-KO. Ces souris, générées dans le laboratoire du Dr T.M. Coffman<sup>92</sup>, ont été croisées avec le modèle de souris AT1R que nous utilisons dans le projet afin de créer les souris AT1R / AT1aR-KO qui n'expriment pas le sous-type a du récepteur AT1 mais surexprime de façon marquée AT1 au niveau cardiaque (Figure 3.2A). Le groupe du Dr Nemer avait observé que les souris AT1R/AT1aR-KO ne présentaient pas d'hypertrophie ou d'insuffisance comparé aux contrôles (WT/AT1aR-KO) du même âge.

### **3.2.2 Étude de repolarisation ventriculaire de souris AT1R/AT1aR-KO**

Nous avons fait des enregistrements d'ECG de surface afin de mesurer l'intervalle QT ainsi que des échocardiographies pour évaluer la fonction cardiaque des souris AT1R/AT1aR-KO du même âge que les AT1R, soit à 6-8 mois (n, CTL = 3 et AT1R = 8). Tel qu'observé chez les souris AT1R, l'intervalle QTc était significativement plus long chez les souris surexprimant le récepteur AT1 dans ce nouveau groupe de souris transgéniques (Figure 3.2B). Toutefois, les enregistrements d'échocardiographie nous ont montré que la masse du ventricule gauche était plus grande et que la fraction d'éjection du ventricule gauche était plus petite chez les souris surexprimant le récepteur AT1 comparées aux souris AT1R-KO (Figure 3.2C). Ces résultats signifiaient qu'à 6-8 mois, les souris AT1R/AT1aR-KO présentaient certains signes d'hypertrophie et que leur fonction cardiaque était diminuée. Contrairement à ce que les résultats du groupe du Dr. Nemer laissaient présager chez les souris AT1R/AT1aR-KO plus jeunes, ces souris finissent par développer de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque, tout comme le modèle de souris AT1R, mais ce phénotype apparaît de façon plus tardive et moins sévère. Ce modèle ne pouvait donc pas servir à prouver hors de tout doute le lien direct entre l'Ang II et la diminution des courants K<sup>+</sup> causant le retard de repolarisation et la survenue d'arythmies.



**Figure 3.2 Étude de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R/AT1aR-KO de 6-8 mois**

- A) Le modèle AT1R/AT1aR-KO a été créé à partir du en croisant les souris AT1R, surexprimant le récepteur de type de l'angiotensine II spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, avec les souris AT1aR-KO qui n'expriment pas le récepteur le sous-type a du récepteur AT1 dans tout le corps.
- B) **Retard de repolarisation** Les souris AT1R/AT1aR-KO présentent une prolongation de l'intervalle QTc (tout comme les souris AT1R).
- C) **Profil pathologique cardiaque des souris AT1R/AT1aR-KO.** VG: ventricule gauche, PT: poids total des souris, Fraction d'éjection (fractional shortening) du ventricule gauche =  $(LVIDd - LVIDs / LVIDd) \times 100$  (où LVIDd/s correspond aux dimension interne du ventricule gauche en diastole et en systole).

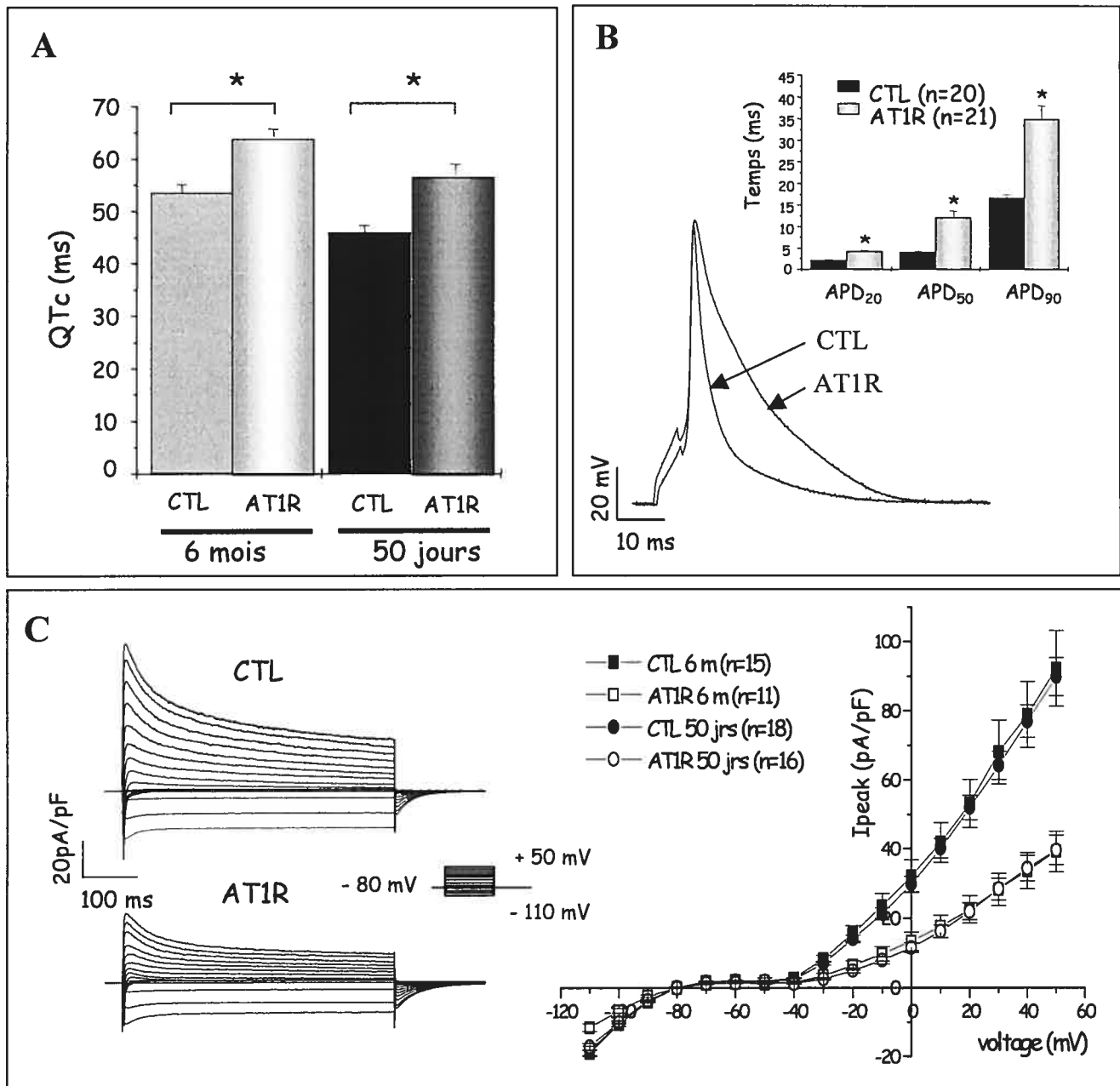
### **3.3 Les souris AT1R de 50 jours**

#### **3.3.1 Le modèle de souris AT1R à 50 jours**

Nous avons ainsi étudié un troisième groupe de souris transgéniques, les mâles AT1R âgés de 50 jours. Selon des résultats obtenus dans le laboratoire du Dr. Nemer, les souris AT1R de 50 jours ne présentent pas d'hypertrophie ni d'insuffisance. De notre côté, nous avons également vu que les mesures de capacitance des cardiomyocytes ventriculaires des souris de 50 jours sont semblables entre les deux groupes (capacitance, Ctl =  $149.2 \pm 6.9$  pF (n = 20) et AT1R =  $139.5 \pm 8.0$  pF (n = 19), p = 0.3). Ce qui nous confirmait qu'à 50 jours, les cardiomyocytes des souris transgéniques ne sont pas hypertrophiés (contrairement à ce qui avait été observé chez le groupe de 6 mois). Nous avons choisi d'étudier ces souris à l'âge de 50 jours puisqu'à cet âge, les souris ont atteint leur maturité sexuelle, ce qui nous permettra d'étudier les différences mâle/femelle dans le futur.

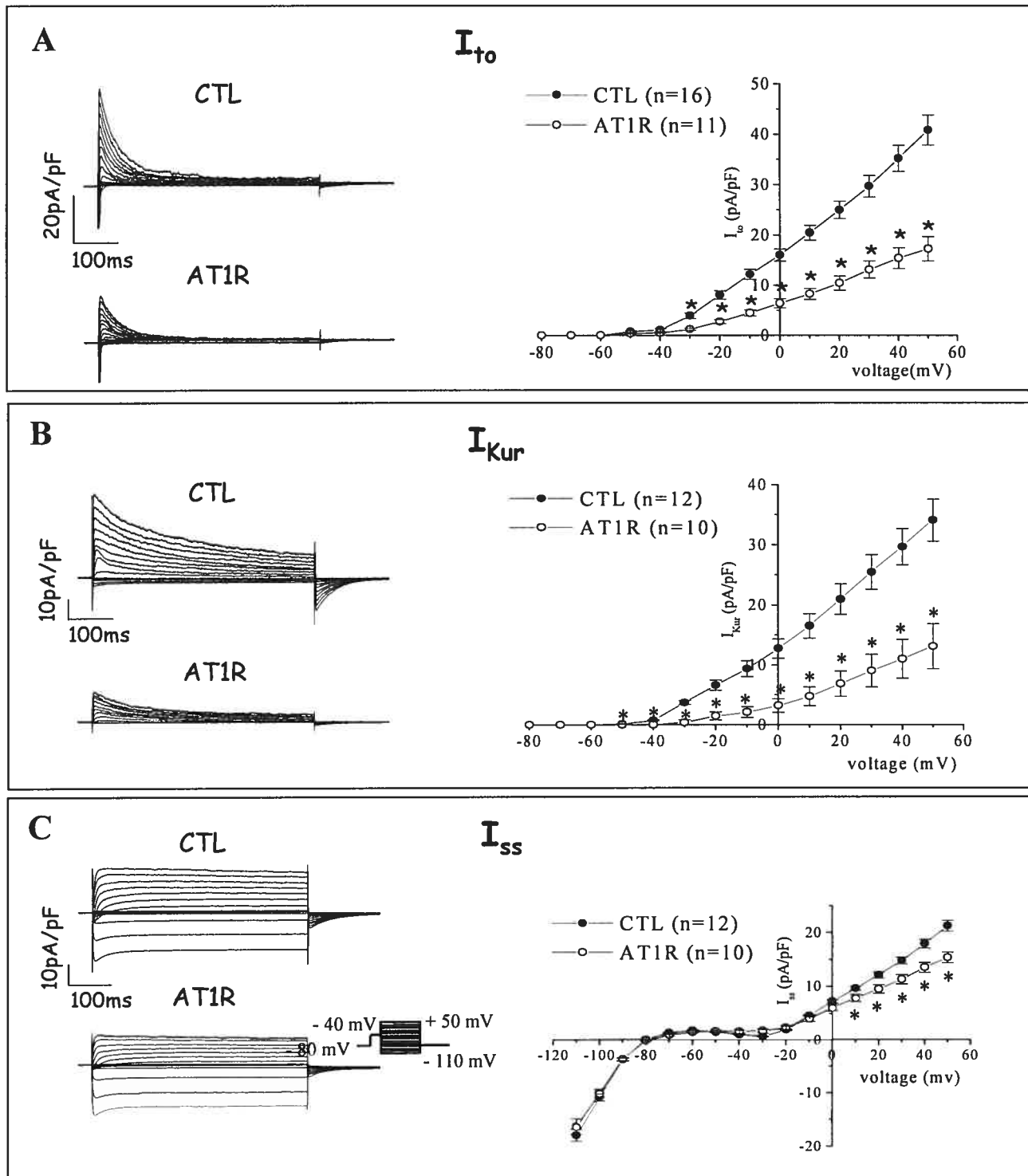
#### **3.3.2 Étude de la repolarisation ventriculaire des mâles AT1R de cinquante jours**

Les données préliminaires obtenues pour l'étude de la repolarisation ventriculaire des souris mâles AT1R de 50 jours nous ont montré que, tout comme ce qui avait été observé chez les mâles de six mois, les souris surexprimant le récepteur AT1 présentaient un retard de repolarisation par la prolongation de l'intervalle QTc ainsi que de la durée du potentiel d'action (Figure 3.3 A et B). De plus, ces troubles de repolarisation sont dus à une diminution des courants  $K^+$  et plus particulièrement de  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{ss}$ . Toutefois, contrairement à ce que nous avons observé chez les souris de 6-8 mois, le courant  $I_{K1}$  ne semble pas diminué chez les AT1R plus jeunes. La comparaison des résultats obtenus chez les deux groupes d'âge de mâles AT1R (ayant ou non de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque) nous fournirons quelques réponses sur les effets spécifiques de l'Ang II et des conditions pathologiques cardiaques induites par celle-ci au niveau des courants  $K^+$  ventriculaires.



**Figure 3.3 Comparaison de la repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R âgées de 50 jours et 6-8 mois**

- **Durée de l'intervalle QTc.** Comparaison de la prolongation de l'intervalle QTc chez les souris AT1R à 6 - 8 mois et à 50 jours.
- **Durée du potentiel d'action.** APD des cardiomyocytes ventriculaire de souris AT1R et CTL de 50 jours. Comme pour les mâles de 6 mois, la durée du potentiel d'action est significativement plus longue à 20, 50 et 90% de la repolarisation.
- **Le courant K<sup>+</sup> total I<sub>peak</sub>** dans les cardiomyocytes des souris AT1R à 6-8 mois et 50 jours. À gauche: exemple d'enregistrement des courant K<sup>+</sup> totaux dans les cardiomyocytes des 2 groupes de mâles de 50 jours. À droite: comparaison des courbes moyennes du courant enregistré en fonction du voltage imposé.



**Figure 3.4 Séparation des courants  $K^+$  ventriculaires chez les souris AT1R de 50 jours**

- A) Le courant  $K^+$  transitoire sortant,  $I_{to}$
- B) Le courant  $K^+$  à rectification retardée ultrarapide sensible au  $Ca^{2+}$ ,  $I_{Kur}$
- C) Le courant  $K^+$  sortant  $I_{ss}$  et le courant à rectification entrante  $I_{K1}$

### 3.4 Comparaison de la repolarisation ventriculaire chez les groupes de mâles AT1R de 6-8 mois et de 50 jours

#### 3.4.1 Les courants $I_{to}$ et $I_{Kur}$

Nous avons vu que les cardiomyocytes ventriculaires des souris AT1R de 50 jours ne sont pas hypertrophiés comparés à ceux des souris contrôles. Ainsi, la diminution des courants  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$  présente chez les deux groupes d'âges de mâles AT1R, présentant ou non de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque, suggère que l'inhibition de ces courants  $K^+$  est due à la stimulation chronique du récepteur AT1 et non causée par l'apparition d'une ou l'autre des pathologies cardiaques présentes dans ce modèle de souris. De plus, il semble que la réduction de ces courants soit la même à six mois qu'à cinquante jours, ce qui suggère certaines hypothèses. À première vue, on peut penser que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque n'ont pas d'effet (direct ou indirect) sur ces deux courants. Toutefois, le fait que l'inhibition de  $I_{to}$  et de  $I_{Kur}$  n'est pas plus importante lors de l'apparition de l'une ou l'autre des pathologies cardiaques peut aussi signifier que les effets produits par ces deux conditions pathologiques sont médiés par les mêmes voies de signalisation que celles utilisées par la stimulation du récepteur AT1 pour diminuer les courants  $K^+$ . De cette façon, l'effet ne serait pas additif et on ne pourrait voir les conséquences de l'hypertrophie qui surviennent après celles de l'activation du récepteur AT1.

##### 3.4.1.1 Effets de l'hypertrophie sur $I_{to}$ dans la littérature

Plusieurs évidences ont montré que  $I_{to}$  est diminué autant dans l'hypertrophie que dans l'insuffisance cardiaque. Cette diminution est présente dans de nombreuses espèces et ce, indépendamment de la sévérité de la maladie ou du mécanisme responsable de la pathologie. Par exemple,  $I_{to}$  est diminué chez des patients et des chiens souffrant d'insuffisance cardiaque ainsi que chez des rats spontanément hypertendus (SHR).<sup>91,93,94,95</sup> De plus,  $I_{to}$  est diminué dans l'hypertrophie induite par différents mécanismes, entre autres, par des catécholamines, par la ligature de l'artère pulmonaire ou par l'hormone de croissance.<sup>96,97,98</sup> Malgré que la diminution de ce courant dans les deux types de conditions pathologiques cardiaques présentes chez les AT1R soit la plus rapportée et la mieux documentée, le mécanisme responsable de cette diminution est toutefois moins évident. Certaines études rapportent une diminution de

l'expression des canaux Kv4.2 et Kv4.3<sup>88,89</sup>, alors que d'autres ont observé des changements des propriétés cinétiques du canal.<sup>99</sup> En ce qui nous concerne, nous avons vu que les deux types de mécanisme sont présents chez les mâles AT1R de six mois : c'est-à-dire, une diminution de l'expression du canal Kv4.2 ainsi que des effets directs sur la cinétique du canal.

#### **3.4.1.2 Effets de l'hypertrophie sur les courants $K^+$ à rectification sortante retardée ( $I_K$ ) dans la littérature**

En ce qui concerne les effets de l'hypertrophie ou de l'insuffisance cardiaque sur les autres courants  $K^+$  sortants rapportés dans la littérature, il n'existe pas de réel consensus. Souvent, les études ne font pas la différence entre les multiples composantes de ce courant. Malgré tout, certains ont vu que l'hypertrophie amène une diminution de courants à rectification sortante retardée entre autres chez le chat<sup>100</sup> alors que d'autres n'ont pas remarqué de changement de densité par exemple chez le cobaye et le chien.<sup>92,101</sup>

À partir des résultats de notre étude et de ceux rapportés dans la littérature, il est évident que les conditions pathologiques apparaissant chez les mâles AT1R de 6-8 mois sont associées à des changements dans la densité des courants  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$ . Toutefois, comme ces deux courants  $K^+$  sont diminués avant que n'apparaissent le phénotype pathologique cardiaque chez ces souris transgéniques, il est possible que la voie intracellulaire affectant les courants  $K^+$  via la stimulation du récepteur AT1 soit aussi celle associée aux conditions d'hypertrophie ou d'insuffisance cardiaque. Ceci expliquerait que la densité des courants  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$  soit semblable chez les AT1R de 6-8 mois et de 50 jours. Toutefois, comme la diminution des courants  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$  survient avant que n'apparaisse le phénotype pathologique, on peut dire que l'altération de ces courants est directement associée à la liaison de l'Ang II à son récepteur et non secondaire à l'atteinte des ventricules. De plus, il est plausible que cette diminution des courants  $K^+$  fasse même partie des mécanismes menant à l'apparition de ces conditions pathologiques. C'est-à-dire que la prolongation de la repolarisation induite par la diminution des courants  $K^+$  de repolarisation entraîne globalement une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium due au prolongement de la phase 2 (plateau) du potentiel d'action. Cette augmentation de calcium favorise à son tour l'activation des voies de signalisation dépendantes de celui-ci par exemple, la calmoduline et la calcineurine. Plusieurs de ces voies sont reconnues pour être impliquées dans



le remodelage tissulaire menant à l'hypertrophie et à l'insuffisance cardiaque. Ainsi, la diminution des courants  $K^+$  pourrait être la cause du phénotype et non sa conséquence. Cette hypothèse pourrait expliquer que la diminution de  $I_{to}$  soit présente dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque indépendamment de la sévérité de la maladie.

### 3.4.2 Le courant à rectification sortante $I_{K1}$

À 50 jours, il ne semble pas avoir de variation dans la densité du courant entrant  $I_{K1}$  alors que ce celui-ci était diminué chez les souris AT1R de six mois. Ainsi,  $I_{K1}$  ne serait pas directement affecté par l'Ang II mais le serait plutôt par l'hypertrophie ou l'insuffisance cardiaque. D'autres études ont également observé que ces pathologies sont associées à des variations du courant  $K^+$  à rectification entrante. Toutefois, il existe plusieurs contradictions. Tout comme nous, certains groupes ont rapporté que l'insuffisance et l'hypertrophie cardiaques sont associés à une diminution de  $I_{K1}$ , entre autres, chez des patients insuffisants cardiaques<sup>93,94</sup>, des chiens souffrant d'insuffisance induite par tachycardie<sup>89,92</sup> ou des rats spontanément hypertendus (SHR).<sup>31</sup> Toutefois, d'autres études ont montré que  $I_{K1}$  pourrait être augmenté entre autre chez le chat<sup>100</sup>, alors que d'autres ont vu qu'il n'y aurait aucune variation de densité de ce courant chez les rats SHR et le cobaye.<sup>91,101</sup> Cette variabilité des changements de densité de  $I_{K1}$  associés à l'hypertrophie ou à l'insuffisance pourrait être dépendante de l'espèce et de la sévérité de la maladie. Ceci irait dans le même sens que des observations générales faites sur les troubles de repolarisation associés à ces pathologies où on conclut que le retard de repolarisation serait en fait proportionnel à la sévérité de la maladie cardiaque.<sup>91</sup> Concrètement, cela signifie que plus l'hypertrophie et l'insuffisance sont sévères ou avancés, plus les troubles électrophysiologiques seraient présents ou importants. Contrairement aux effets de ces pathologies au niveau du courant  $I_{to}$ , les effets de celles-ci sur le courant  $I_{K1}$  seraient dépendants de plusieurs facteurs. À l'âge de six mois, notre modèle de souris AT1R présente un phénotype pathologique cardiaque très avancé ainsi qu'une fonction cardiaque très diminuée qui sont causés spécifiquement par la stimulation accrue du récepteur AT1. La sévérité de la maladie ainsi que le mécanisme spécifique responsable de celle-ci pourrait expliquer que certains groupes ne voient pas les mêmes variations que celles que nous avons observées.

### 3.4.3 Particularité du courant $I_{ss}$

Chez le groupe de 50 jours, nous avons vu que le courant  $I_{ss}$  était significativement diminué. Cette réduction de la densité du courant  $I_{ss}$  à 50 jours nous indique que ce courant serait touché par l'Ang II. Par contre, à six mois, l'amplitude du courant  $I_{ss}$  n'est plus significativement différente entre les contrôles et les transgéniques. Chez la souris,  $I_{ss}$  aurait peu d'implication physiologique dans la repolarisation ventriculaire puisque sa contribution au courant  $K^+$  total est minime à cause de ses propriétés cinétiques plus lente qui lui permettent peu d'agir de façon efficace dans le potentiel d'action très rapide de la souris. Toutefois, en conditions pathologiques, par exemple lorsque qu'il y a une diminution importante du courant  $I_{Kur}$  qui mène à une prolongation de la durée du potentiel d'action, le courant  $I_{ss}$  pourrait être augmenté afin de compenser partiellement les effets d'une trop grande inhibition des courants  $K^+$  totaux<sup>102,103</sup>. Ce phénomène est surtout observé lors d'une diminution marquée du courant  $I_{Kur}$  (principalement par une diminution de l'expression du canal  $Kv1.5$ ) qui, avec  $I_{ss}$ , compose le courant  $I_{Kslow}$  chez la souris. Le courant  $I_{ss}$  pourrait donc servir de courant de réserve. Ce phénomène pourrait expliquer qu'il y ait une diminution significative de la densité de ce courant à 50 jours, mais que cette différence ne soit plus présente entre les transgéniques et les contrôles de 6 mois. De plus, à cause de son implication moins importante dans l'amplitude du courant  $K^+$  total, le changement de densité de  $I_{ss}$  ne cause pas de variation sur la durée du potentiel d'action.

### 3.4.4 Comparaison des troubles de repolarisation à 6-8 mois et à 50 jours

Plusieurs études s'entendent pour dire que la prolongation du potentiel d'action est caractéristique des cas d'hypertrophie ou d'insuffisance cardiaque.<sup>14,15</sup> D'un autre côté, les résultats obtenus dans l'étude sur la repolarisation ventriculaire des souris AT1R montrent que la stimulation excessive du récepteur AT1 au niveau cardiaque par l'Ang II est aussi responsable de causer les troubles de repolarisation et ce, avant que la fonction ou la structure du cœur ne soit affectée. Ainsi, chez les souris AT1R des deux groupes d'âge, deux courants  $K^+$  majeurs de repolarisation ventriculaire sont diminués. Cette diminution des courants prolonge la durée de la repolarisation, caractérisé par une prolongation de l'intervalle QTc et de la durée du potentiel d'action chez les souris transgéniques. Une des différences entre les deux groupes d'âge de souris AT1R est que la densité du courant  $I_{ss}$  est partiellement rétablie chez les mâles de 6 mois

comparativement à la diminution significative de ce courant chez les 50 jours. Toutefois, à cause des propriétés trop lentes de  $I_{ss}$  pour le rythme cardiaque très rapide des souris, ce courant  $K^+$  sortant n'a pas de rôle physiologique majeur en conditions contrôles. La différence majeure retrouvée entre les transgéniques de 50 jours et ceux de 6 mois est la diminution de  $I_{K1}$  associée à l'apparition du phénotype pathologique des mâles plus âgés. Comme nous l'avons vu précédemment, le courant  $I_{K1}$  contribue à la repolarisation terminale ainsi qu'au maintien stable du potentiel de repos de la membrane cellulaire. Une diminution de ce courant entraîne donc un prolongement de la repolarisation et contribue à déstabiliser le potentiel de repos des cardiomyocytes. On sait aussi qu'un prolongement excessif de la repolarisation est un facteur de risque important pour le développement d'arythmies ventriculaires telles que les Torsades de pointe.<sup>16,104,105</sup> Ainsi, la diminution du courant  $I_{K1}$ , supplémentaire à celles des autres courants  $K^+$  au niveau des ventricules, représente un facteur de risque additionnel à la survenue d'arythmies chez les souris de plus de six mois comparé aux plus jeunes qui présentent déjà des troubles de repolarisation importants. La diminution du courant  $I_{K1}$  en combinaison à celle des courants  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$  pourrait ainsi expliquer la survenue spontanée d'arythmies cardiaques et de mort subite chez les mâles AT1R de 6-8 mois.

### **3.4.5 Variabilité des effets observés sur les courants $K^+$ par les différents groupes de recherche**

Comme nous, plusieurs groupes ont vu un lien entre l'Ang II et les courants  $K^+$ . La diminution de  $I_{to}$  semble être la plus évidente. La diminution des autres courants  $K^+$  a également été observée. Toutefois, certains ont vu des effets différents de ceux que nous avons observés dans le modèle de souris AT1R. Cette variabilité des effets de l'Ang II sur les courants  $K^+$  est également observée quant aux effets de l'hypertrophie et de l'insuffisance. Cette différence dans les effets de l'Ang II sur les courants  $K^+$  pourrait être attribuable aux différents types de cellules, de tissus ou d'espèces étudiés. De plus, dépendamment des conditions expérimentales ou du modèle choisi, des facteurs confondants peuvent faire varier les résultats ou créer des données erronées, par exemple lorsque des groupes choisissent d'utiliser les animaux malades comme les rats traités avec la streptozotocine dans le but de les rendre diabétiques.<sup>82,83</sup> Quoiqu'il en soit, selon l'ensemble des données recueillies, plusieurs éléments manquent encore pour bien

caractériser l'ensemble des mécanismes et des voies de signalisation intracellulaires qui médient les effets de l'Ang II sur les courants de repolarisation.

### **3.5 Limitation de l'étude et extrapolation des résultats obtenus à partir du modèle de souris transgénique AT1R**

#### **3.5.1 La souris comme modèle d'étude**

En recherche, différents modèles d'animaux sont utilisés pour étudier la repolarisation ventriculaire chez l'homme, tels que la souris, le rat, le cobaye, le chien ou le lapin. Chacun de ces modèles offre des particularités intéressantes quant à la possibilité d'extrapoler les résultats chez l'homme. Toutefois, aucun d'entre eux ne donne un portrait physiologique parfait de la repolarisation ventriculaire de l'homme ou des pathologies qui y sont associées. Chez la souris, les courants  $K^+$  ventriculaires sont  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$  et  $I_{K1}$ , alors que chez l'homme, on retrouve les courants  $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  et  $I_{K1}$ . Ainsi, au niveau ventriculaire, seulement  $I_{to}$  et  $I_{K1}$  sont communs aux deux espèces. Toutefois, le courant  $I_{Kur}$ , formé par le canal  $Kv1.5$ , est présent au niveau des oreillettes chez l'homme.<sup>7,11,16,106</sup> Le récepteur AT1 a également été retrouvé au niveau de ce tissu<sup>107</sup>, ce qui nous laisse croire qu'en conditions pathologiques, l'activation du récepteur AT1 dans les oreillettes pourrait aussi toucher le courant  $I_{Kur}$  chez l'homme. Ainsi, il est possible que les courants  $I_{to}$ ,  $I_{K1}$  et  $I_{Kur}$  puissent être modulés de la même façon par l'Ang II ou par l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque chez l'homme que ce qui est observé chez la souris.

#### **3.5.2 Le modèle transgénique**

De façon générale, les modèles de souris transgéniques permettent d'étudier le rôle spécifique de certaines protéines en augmentant ou en bloquant l'expression de leur gène ou en modifiant leur structure pour les rendre plus ou moins fonctionnelles. Selon les modifications génétiques apportées, les modèles transgéniques peuvent produire différents effets comme amplifier ou réduire le développement d'une pathologie ou d'une condition physiopathologique particulière. Chez l'homme, il est rare que des conditions pathologiques engendrent des effets aussi marqués et drastiques que ce genre de modèle animal. L'étude de modèle de souris transgéniques permet plutôt de fournir des explications ou une meilleure compréhension de certains phénomènes sans toutefois reproduire parfaitement toutes les conditions présentes dans

les pathologies humaines. Ils servent plus à fournir des éléments de réponses qu'à expliquer clairement et entièrement l'ensemble d'une pathologie. Ainsi, le modèle AT1R nous permet d'étudier les effets d'une trop grande stimulation du récepteur de type 1 de l'Ang II spécifiquement au niveau du cœur et non de comprendre tous les aspects d'une augmentation de l'action du peptide dans tout l'organisme. Il serait ainsi erroné de penser que l'augmentation des niveaux d'Ang II chez l'homme produit les mêmes effets que ceux observés chez les souris AT1R. Toutefois, ce modèle transgénique nous permet de d'envisager que la stimulation du récepteur de type de l'Ang II au niveau cardiaque peut affecter les courants  $K^+$  et qu'en condition pathologique, elle pourrait même mener à la survenue d'arythmies.

### 3.5.3 Limitation expérimentale

D'autres limitations sont aussi à considérer quant à l'extrapolation des résultats obtenus dans cette étude. L'enregistrement des courants  $K^+$  et du potentiel d'action a été fait sur les cardiomyocytes de ventricule droit. Le choix de cette partie du cœur pour ce type d'enregistrement a été fait principalement pour des raisons techniques. Ainsi, il existe des différences dans la densité des courants ioniques entre les cellules de l'endocarde et de l'épicarde.<sup>116</sup> Comme le ventricule droit est majoritairement composé de cellule épocardiques, les courants ainsi que le potentiel d'action enregistrés seront plus homogènes et il sera plus facile de reproduire et de comparer les résultats de patch en utilisant volontairement les cardiomyocytes du ventricule droit. Parallèlement aux enregistrements de courants ioniques et de potentiel d'action, la mesure des niveaux d'expression protéiques des canaux ioniques a été faite à partir d'extraits de protéines provenant des deux ventricules (gauche et droit). Ce choix est aussi de nature technique puisque pour obtenir suffisamment de protéines pour l'ensemble des canaux  $K^+$ , nous devons utiliser les deux ventricules. Si nous nous limitons seulement à l'utilisation du ventricule droit (comme pour l'isolation des cardiomyocytes), nous devrions utiliser une grande quantité de cœurs de souris pour parvenir à obtenir suffisamment de protéines pour faire l'étude de l'ensemble des canaux  $K^+$ . Nous avons donc fait le choix d'extraire les protéines des deux ventricules afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans l'étude. Malgré tout, la diminution de densité des courants enregistrés sur les cardiomyocytes de ventricules droits concordent avec le changement des niveaux d'expression des canaux ioniques correspondant à ces courants dans les deux ventricules. Ce qui nous indique que, malgré que les caractéristiques

électrophysiologiques des ventricules gauche et droit ne soient pas les mêmes à cause de la nature des cellules qui les composent, l'Ang II agit semblablement au niveau des canaux et des courants ioniques dans les différentes régions du cœur.

### 3.5.4 Les avantages du modèle AT1R

Le modèle de souris AT1R présente ainsi plusieurs limites comme des différences entre les souris et les humains dans les paramètres électriques cardiaques (courants  $K^+$  différents et rythme cardiaque plus rapide chez les souris) et l'utilisation du modèle transgénique en lui-même qui exagère les effets de l'Ang II. Toutefois, ce modèle présente aussi des avantages puisqu'il permet d'étudier les effets de l'Ang II *in vivo* et non seulement sur des cellules en culture. De plus, grâce au modèle AT1R, il est aussi possible de voir les effets de l'Ang II directement et spécifiquement au niveau des cardiomyocytes. D'autres études avaient rapporté des effets de l'Ang II sur les cellules cardiaques dans des modèles d'animaux ayant des niveaux élevés d'Ang II. Toutefois, ces modèles tiennent compte d'une augmentation systémique de l'action de l'Ang II en reproduisant certaines conditions pathologiques associées à de plus grandes concentrations d'Ang II. Ces conditions peuvent en soi avoir des effets au niveau des cardiomyocytes ou encore induire des pathologies telles que l'hypertrophie qui a des effets au niveau des courants ioniques. Par exemple, le groupe de Shimoni utilise des animaux diabétiques (des rats traités à la streptozotocine (STZ) et des souris transgéniques db/db) qui sont reconnus pour présenter une augmentation de l'Ang II mais également des changements dans d'autres paramètres comme dans la sécrétion d'insuline, les concentrations de glucose ou l'utilisation de la STZ qui peuvent produire des effets au niveau cardiovasculaire.<sup>77,78,80,82,83</sup> Le modèle de souris AT1R nous permet de constater et de comprendre les différents effets de l'Ang II sur les courants  $K^+$  des cardiomyocytes ventriculaires via la stimulation excessive du récepteur AT1. Il nous permet d'éliminer une multitude de facteurs confondants puisque les effets observés sont ceux directement produits via les récepteurs se trouvant au niveau des cardiomyocytes.

## 3.6 Perspectives

Grâce au modèle de souris AT1R, nous avons pu établir que l'Ang II agit directement au niveau des cardiomyocytes pour moduler à la baisse les courants  $K^+$  et causer un retard de repolarisation, ce qui représente un facteur de risque important à la survenue d'arythmies

cardiaques. Il sera intéressant de poursuivre les recherches sur ce modèle de souris afin de voir s'il existe des différences mâles/femelles chez les souris AT1R et d'élucider les mécanismes reliant l'activation du récepteur AT1 par l'Ang II aux effets sur les courants ioniques.

### 3.6.1 Étude des différences mâle/femelle

Chez l'homme ainsi que chez plusieurs espèces animales utilisées en recherche, il existe des différences entre les mâles et les femelles dans la repolarisation cardiaque.<sup>16</sup> Par exemple, on sait que l'intervalle QT des femmes est plus long que celui des hommes.<sup>108,109</sup> Chez la souris cette différence est aussi présente et est causée par une plus faible densité du courant  $I_{Kur}$  chez les femelles.<sup>110,111</sup> Il est donc important de séparer les mâles des femelles puisque chacun présente des caractéristiques particulières. De plus, il se pourrait que l'Ang II puisse agir différemment chez les deux sexes. Il sera intéressant de reproduire l'étude de la repolarisation ventriculaire chez les femelles AT1R (jeunes et vieilles) afin de voir s'il existe des différences mâles/femelles dans ce modèle de souris transgénique.

### 3.6.2 Voie(s) de signalisation intracellulaire(s) impliquée(s)

Les voies de signalisation intracellulaires des deux types de protéines G couplées au récepteurs AT1, Gq et Gi, semblent avoir un rôle important à jouer dans les cascades menant à l'effets sur les courants  $K^+$ . Quelques pistes ont déjà été envisagées. Par exemple, les groupes de Shimoni et de Park ont montré que l'action de l'Ang II sur les courants passe entre autres par les PKC.<sup>77,86</sup> Aussi, Hayabuchi et coll. ont montré que l'inhibition de l'activité des PKA pourrait aussi faire partie des voies empruntées lors de l'activation du récepteur AT1.<sup>87</sup> Dans le modèle de souris AT1R, il serait intéressant d'utiliser des bloqueurs spécifiques de l'activité de différents messagers impliqués dans chacune des cascades, par exemple des inhibiteurs des Gq, Gi, PLC, PKC ou PKA pour voir si l'on peut empêcher ou renverser les effets de l'Ang II sur la repolarisation des cardiomyocytes. Des activateurs de ces voies pourront aussi être utilisés afin de voir si l'activation de plus d'une voie est nécessaire pour produire les effets ou s'il existe des interactions entre les voies de signalisation empruntées.

La caractérisation de la voie de signalisation intracellulaire médiant les effets de l'Ang II sur les courants ioniques permettra (1) de mesurer l'impact électrophysiologique d'une

augmentation de l'activité du RAS au niveau cardiaque chez la souris et aussi dans d'autres espèces, (2) de faire des liens avec d'autres pathologies cardiovasculaires affectant les courants ioniques (comme un dérèglement du système adrénergique) et (3) de prévoir et prévenir des troubles arythmiques survenant en conditions pathologiques associées à ces cascades de signalisation.

### 3.6.3 Réversibilité des mécanismes d'action

Il sera intéressant de voir si la diminution des courants  $K^+$  induite par l'action directe (activation du récepteur au niveau du cœur) ou indirecte (via l'apparition de l'hypertrophie ou de l'insuffisance cardiaque) de l'Ang II au niveau des cardiomyocytes est un mécanisme réversible. Les souris AT1R de 50 jours et de 6-8 mois, pourront être traitées avec des agents inhibiteurs de l'action de l'Ang II soit par un IECA ou par un ARA afin de voir s'il est possible de retrouver partiellement ou totalement l'amplitude des courants potassiques et de ramener la durée du potentiel d'action à des valeurs normales dans ce modèle de souris transgéniques. De façon générale, les IECA et les ARA sont reconnus pour améliorer la fonction cardiaque et la survie des patients ou des modèles animales souffrant d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque.<sup>112</sup> Chacun de ces groupes de composés, IECA et ARA, possède des particularités qui pourraient s'avérer utiles dans le choix d'une thérapie cardiovasculaire. Par exemple, le blocage du récepteur AT1 seulement laisse la possibilité à l'Ang II de se lier au récepteur AT2 qui pourrait contrecarrer les effets néfastes produits par la stimulation de AT1. Il a aussi été montré que le traitement de l'hypertrophie cardiaque par des IECA ou des ARA, normalisait les paramètres mécaniques mais aussi électriques associés à la survenue d'arythmies cardiaques.<sup>113,114,115</sup> La comparaison de l'efficacité des IECA et des ARA à renverser spécifiquement les troubles de repolarisation causés par la diminution des courants  $K^+$  dans le modèles de souris AT1R (présentant ou non de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque) pourrait fournir des éléments supplémentaires essentiels au choix de l'utilisation de ce type d'agent en conditions pathologiques cardiaques.



### 3.7 Conclusion

En résumé, la caractérisation de la repolarisation ventriculaire dans le modèle de souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'Ang II spécifiquement au niveau cardiaque (AT1R) nous a montré que la stimulation excessive du récepteur AT1 causait chez les souris âgées de six mois, une diminution des courants  $K^+$   $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{K1}$ , résultant en un retard important de la repolarisation des cardiomyocytes ventriculaire et en une incidence accrue d'arythmies cardiaques. L'évaluation du phénotype pathologique cardiaque des souris AT1R de six mois, nous a toutefois montré que ces souris souffraient d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque, conditions qui sont aussi associées à des troubles de repolarisation. Nous avons donc commencé à l'étude de la repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R de 50 jours afin de dissocier les effets produits par l'Ang II de ceux causés par certaines conditions pathologiques cardiaques. Les premiers résultats recueillis chez les souris AT1R de 50 jours ont montré que les courants  $K^+$  sortants  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{ss}$  seraient diminués par l'activation spécifique des récepteurs de type 1 de l'Ang II. De plus, le courant  $I_{K1}$  ne serait pas directement affecté par l'augmentation de la stimulation des récepteurs AT1 mais, plutôt par des mécanismes associés à l'hypertrophie et à l'insuffisance cardiaque.

Enfin, les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise s'intitulant : « Remodelage électrique cardiaque chez les souris transgéniques surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II », nous ont permis de voir que l'Ang II pouvait agir directement au niveau des cardiomyocytes pour affecter les paramètres électrophysiologiques de la repolarisation ventriculaire chez la souris et entraîner des arythmies cardiaques graves pouvant mener à la mort. Les études sur le modèle AT1R pourront être poursuivies afin d'étudier les différences entre les mâles et les femelles et d'identifier et de caractériser les mécanismes impliqués dans les effets de l'Ang II au niveau des courants  $K^+$  via le récepteur AT1. Les études sur le modèle de souris AT1R permettront d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies cardiovasculaires reliées aux effets de l'Ang II.

## Bibliographie

- 1) AHA statistical update, heart disease and stroke statistic- 2006 update., *Circulation*, 2006; 113 : e85-e151.
- 2) Fondation des maladies du Coeur/ Le taux des maladies cardiovasculaires, 2005.
- 3) Keating, M.T., Sanguinetti, M.C., Molecular and cellular Mechanisms of cardiac arrhythmias, *Cell*, 2001; 104: 569-80.
- 4) Aehlert, B., ECGs made easy, second edition, Mosby edition, 2002, chapitre 2(pour PA, ECG) (chapitre 6 pour tachycardia ventriculaire)
- 5) Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics, tenth edition, chapitre 31: rennin and angiotensin, International edition, 2001, pages 809-41.
- 6) Jentsch, T., Hübner, C.A. & Fuhrman J.C., Ion channels: Function unravelled by dysfunction, *Nature cell biology*, 2004; 6(11): 1039-47.
- 7) Nerbonne, J. & Kaas, R.S., Molecular physiology of Cardiac Repolrisation, *Physiological Reviews*, 2005; 85: 1205-53.
- 8) Follmer, CH. & Colatsky, TJ., Block of the delayed rectifier potassium current, IK, by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes, *Circulation*, 1990; 82(1): 289-93.
- 9) Carmeliet, E., Voltage- and time- dependent block of the delayed K<sup>+</sup> current in cardiac myocytes by dofetilide., *Journal Pharmacology and Experimental therapeutics Ther*, 1992; 262(2): 809-17.
- 10) Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.K., Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current, Differential sensitivity to block class III antiarrhythmic agents, *The journal of general physiology*, 1990; 96:195-215.
- 11) Snyder, D.J., Molecular basis of ion channel activity, chapter 3: molecular biology of potassium channels.
- 12) Barry, D.M. & Nerbonne, J.M., Myocardial potassium channels: Electrophysiology and moleculr diversity, *Annual review of physiology*, 1996; 58: 363-94.
- 13) Fiset, C., Clark, RB., Shimoni, Y. & Giles, WR., Shal-type channel contribute tu the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *Journal of physiology*, 1997; 500(1): 51-4.
- 14) Tomaselli, G.F. & Marban, E., Electrophysiological remodelling in hypertrophy and heart failure, *Cardiovascular research*, 1999; 42: 270-83.

- 15) Kaab, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Nabauer, M., Beucklemann, DJ., Steinbeck, G., McKinnon, D. & Tomaselli GF., Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density, *Circulation*, 1998; 98(14): 1383-93.
- 16) James, AF., Choisy, SC. & Hancox JC., Recent advance in understanding sex differences in cardiac repolarisation. *Prog Biophys Mol Biol*, 2005, june.
- 17) Dixon, JE., Shi, W., Wang, HS., McDonald, C., Yu, H., Wymore, RS., Cohen, IS. & McKinnon, D., Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circulation Research*, 1997; 79(4): 659-68.
- 18) Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. & Romey, G., K(v)LQT1 and IsK(minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current, *Nature*, 1996; 384(6604): 78-80.
- 19) Sanguinetti, MC., Curran ME., Zou, A., Shen, J., Spector, PS., Atkinson, DL. & Keating, MT., Coassembly of K(v)LQT1 and minK(IsK) proteins to form cardiac I(Ks) channel. *Nature*, 1996; 384(6604):80-3.
- 20) London, B., Guo, W., Pan Xh. Lee, JS., Shusterman, V., Rocco, CJ., Logothetis, DA., Nerbonne, JM. & Hill JA. Targeted replacement of Kv1.5 in mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of I<sub>K,slow</sub> and resistance to drugs-induced QT prolongation. *Circulation Research*, 2001; 88: 940-6.
- 21) Näbauer, M. & Kääb, S., Potassium channel down-regulation in heart failure, *Cardiovascular research*, 1998; 37: 324-34.
- 22) Marieb, E.N. Anatomie et physiologie humaines, Éditions du Renouveau pédagogique Inc, Saint-Laurent, Qc, 1993
- 23) Stein, E., Electrophysiologie clinique, manuel d'auto apprentissage, éditions Edisem, St-Hyacinthe, QC, 1987, page 11
- 24) Rautaharju, PM., Zhou, SH., Wong, S., Calhoun, HP., Berenson, GS., Prineas, R & Davignon, HP. Sex differences in the involution of the electrocardiographic QT interval with age. *Canadian journal of cardiology*, 1992; 8(7): 690-5.
- 25) Bazett, HC., The time relations of the blood-pressure changes after excision of the adrenal glands, with some observations on blood volume changes., *Journal of physiology*, 1920; 53(3): 320-39.
- 26) Mitchell, G., Jeron, A. & Koren, G., Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse, *American journal of physiology*, 1998; 274(43): H747-51.
- 27) Katzung, B.G., Basic and clinical Pharmacology, 6e edition, Appleton & Lange editions, 1995, page 276-89.

- 28) Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T. & Goldstein, S.A., MirP1 forms Ikr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia., *Cell*, 1999; 97(2): 175-87.
- 29) Sesti, F., Abbott, G.W., Wei, J., Murray, K.T., Saksana, S., Schwartz, P.J., Priori S.G., Roden, D.M., George, A.L. Jr. & Goldstein, S.A., A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia., *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 2000; 97(12): 10613-8.
- 30) Spooner, P.M., Albert, C. et al., Sudden cardiac death, Genes and Arrhythmogenesis, *Circulation*, 2001; 103:2447-52.
- 31) De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright J.W. & Under, T.H., International union of pharmacology: XXIII: The Angiotensin II receptor, *Pharmacological reviews*, 2000; 52: 415-72.
- 32) Dostal, D.E., Baker, K.M. The cardiac renin-angiotensin system/ Conceptual, or a regulator of cardiac Function? *Circulation Research*, 1999; 85: 643-50.
- 33) Timmermans, P., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Wong, P.C. & Smith, R.D., Angiotensin II receptor subtypes, *American journal of hypertension*, 1992; 5:406-10.
- 34) Timmermans, P., Benfield, P., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Wong, P.C. & Smith, R.D., Angiotensin II receptors and functional correlates, *American journal of hypertension*, 1992; 5: 221S-35S.
- 35) Schunkert, H., Dzau, V.J., Tang, S.S., Hirsch, A.T., Apstein, C.S. & Lorell, B.H., Increased Rat Cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. *Journal of clinical investigation*, 1990; 86:1913-20.
- 36) Lindpaintner, K., Jin, M., Niedermaier, N., Wilhelm, M.J. & Ganten, D., Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart, *Circulation research*, 1990; 67: 564-73.
- 37) Bader, M, Role of the local Renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models, *Journal of molecular and cellular biology*, 2002; 34: 1455-62.
- 38) Dostal, D.E., The cardiac rennin-angiotensin system: novel signalling mechanism related to cardiac growth and function., *Regulatory peptides*, 2000; 91: 1-11.
- 39) Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K.S., Bumpus, F.M. & Husain, A., Identification of a high specific chymase as a major angiotensin II-forming enzyme in the human heart., *Journal of Biological Chemistry*, 1991; 265(36):22348-57.

- 40) Guimaraes, S. & Pinheiro, Functional evidence that in the cardiovascular system AT1 angiotensin II receptors are AT1B prejunctionally and AT1A postjunctionally, *Cardiovascular research*, 2002;67: 208-215.
- 41) Murphy, TJ., Alexander, RW., Griengling, KK., Runge, MS. & Bernstein, KE., Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor, *Nature*, 1991; 351(6323): 233-6.
- 42) Gasc J.M., Shanmugan, S., Sibony, M. & Corvol, P., Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study., *Hypertension*, 1994; 24(5): 531-7.
- 43) Hunyady, L., Catt, KJ., Clark, AJL. & Gaborik, Z., Mechanisms and functions of AT1 angiotensin receptor internalization. *Regulatory Peptides*, 2000; 91: 29-44.
- 44) Hein, L., Meinel, L., Pratt, R.E., Dzau, V.J. & Kobilka, B.K., Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: Evidence for selective sorting of receptor and ligand, *Molecular Endocrinology*, 1997; 11: 1266-77.
- 45) Steckeling, U.M., Kaschima, E. & Unger, Th. The AT2 receptor- A matter of love and hate, *Peptides*, 2005; 26, 1401-9.
- 46) Barber, MN., Samper, DB. & Widdip, RE., AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats., *Hypertension*, 1999; 34(5): 1112-6.
- 47) Moore AF., Heiderstadt, NT., Huang, E., Howell, NL., Wang, ZQ., Siragy, HM. & Carey, RM., Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure in conscious rats., *Hypertension*, 2001; 37(5): 1285-91.
- 48) Hein, L., Barsh GS., Pratt RE., Dzau VJ. & Kobilka BK., Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice, *Nature*, 1995; 377(6551): 744-7.
- 49) Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., Miwa, T., Kawada, N., Mori, Y., Shinasaki, Y., Tanaka, Y., Fujiyama, S., Koyama, Y., Fujiyama, A., Takahashi, H. & Iwasaka, T., Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilatation, *Journal of Clinical Investigation*, 1999; 104(7): 925-35.
- 50) Stoll, M., Steckelings, UM., Paul, M., Bottari, SP., Metzger, R. & Unger, T., The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of the cell proliferation in coronary endothelial cells., *Journal of Clinical Investigation*, 1995; 95(2):651-7.
- 51) Ichiki, T., Labosko, PA., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan BL. & Inagami T., Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor., *Nature*, 1995; 377(6551):748-50.

- 52) Ozono, R., Wang, ZQ., Moore, AF., Inagami, T., Siragi, HM. & Carey, RM., Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney., *Hypertension*, 1997; 30(5): 1238-46.
- 53) Wagenaar, LJ., Voors, AA., Buikema, H. & Van Gilst, WH., Angiotensin receptors in the cardiovascular system., *Canadian journal of Cardiology*, 2002; 18(12): 1331-9.
- 54) Miura, S.I., Saku, K. & Karnic, S.S., Molecular analysis of the structure and function of angiotensin II type 1 receptor., *Hypertensive research*, 2003; 26(12): 937-43.
- 55) Becker, WM., Kleinsmith, LJ. & Hardin, J., The world of the cell, fourth edition, The benjamin/cummings Imprint, 2000.
- 56) Ruwhof, C. & van der Laarse, A., Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways, *Cardiovascular research*, 2000; 47: 23-37.
- 57) Satoru, E. & Tadashi, I., Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase., *Regulatory Peptides*, 2000; 91: 13-20.
- 58) Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami K., Kukamizu, A. & Murakami, K., Angiotensinogen-deficient mice with hypotension *Journal of biological chemistry*, 1994; 269(50):31334-7.
- 59) Schunkert, H., Dzau, VJ., Tang, SS., Hirsch, AT., Apstein CS. & Lorell BH., Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *Journal of Clinical Investigation*, 1990; 86(6): 1913-20.
- 60) Busatto, VC., Cicilini, MA. & Mill, JG., Increased angiotensin-converting enzyme activity in left ventricle infarction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1997; 30(5): 679-87.
- 61) Paul, M., Pinto, YM., Schunkert, H., Ganten, D. & Bohm, M. Activation of the renin-angiotensin system in heart failure and hypertrophy—studies in human hearts and transgenic rats. *European Heart Journal*, 1994; supp D: 63-7.
- 62) Tian, X.-L., Pinto, Y.M., et al, Over-expression of angiotensin converting enzyme-1 augments cardiac hypertrophy in transgenic rats. *Human molecular genetics*, 2004; 13(14): 1441-50.
- 63) Pfeffer MA., Lamas, GA, Vaughan DE, Parisi, AF. & Braunwald, E., Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior infarction. *New England journal of medicine*, 1988; 319(2): 80-6.
- 64) Baker, K.M., Chermin, M.I., Wixson, S.K. & Aceto, J.F, Renin angiotensin system involvement in pressure overload hypertrophy in rats, *American journal of physiology*, 1990; 259:H324-32.

- 65) Hayabuchi, Y. Standen, N.B, & Davies, N.M., Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K<sup>+</sup> channels of rat arterial smooth muscle, *American journal of physiology, heart and circulation physiology*, 2001; 281: H2480-89.
- 66) Fujii, N., Tanaka, M., Ohnishi, J., Yukawa, K., Takimoto, E., Shimada, S., Naruse, M., Sugiyama, F., Yagami, M., Murakami, K et al., Alteration of angiotensin II receptor contents in hypertrophied hearts., *Biochemical and biophysical research communications*, 1995; 212(2): 326-33.  
Biochemical and biophysical reseach communications
- 67) Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F.W., Thibault, G., Nemer, M., Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodelling, *Proceeding of the national Academy of science(PNAS)*, 2000; 97(2): 931-6.
- 68) Hein, L., Stevens, ME., Barsh, GS., Pratt, RE., Kobilka, BK. & Dzau VJ., Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proceeding of the National Academy of Science*. 1997; 94: 6391-6.
- 69) Pachori, A.S., Wang, H., Gelband, c.H., Ferrario, C.M., Katovich, M.J., Raizada, M.K., Inability to induce hypertension in normotensive rat expressing AT1 receptor antisense, *Circulation research*, 2000; 86:1167-72.
- 70) Takahashi, A., Takase, H., Toriyama, T., Sugiura, T., Kurita, Y., Ueda, R & Dohi, Y., Candesartan, an angiotensin II type-1 receptor blocker, reduces cardiovascular events in patients on chronic haemodialysis-a randomized stydy, *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21:2507-2512.
- 71) Siddiqui, A & Kowey P.R., Sudden death secondary to cardiac arrhythmias : mechanisms and treatment strategies, *Current opinion in cardiology*, 2006; 21: 517-525.
- 72) Aksnes, T.A., Flaa, A., Strand, A. & Kjeldsen, S.E., Prevention of new-onset atrial fibrillation and its predictors with angiotensin II-receptor blockers in the treatment of hypertension and heart failure, *Journal of hypertension*, 2007; 25):15-23.
- 73) Caballero, R., Gomez, R., Moreno, I., Nurez, L., Gonzalez, T., Arias, C., Guizy, M., Valenzuela, C., Tamargo, J. & Delpon, E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current, *Cardiovascular Research*, 2004; 62: 86-95.
- 74) Dorinin, SV., Potapova, IA., LU, ZJ. & Cohen, IS., Angiotensin receptor type 1 form a complex with the transient outward potassium channel Kv4.3 and regultes its gating properties and intracellular localization. *Journal of biological chemistry*, 2004; 274(46): 48231-7.
- 75) Zhang, TT., Takimoto, K., Stewart, AFR., Zhu, C. & Levitan, ES., Independent regulation of cardiac Kv4.3 potassium channel expression by angiotensin II and Phenylephrine. *Circulation research*, 2001; 88:476-82.

- 76) Yu, H., Gao, J., Wang, H., Wymore, R., Steinberg, S., McKinnon, D., Rosen, M. & Cohen, IS., Effects of the renin-angiotensin system on the current  $I_{to}$  in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circulation Research*, 2000; 86: 1062-8.
- 77) Shimoni, Y. & Liu, X-F., Role of PKC in autocrine regulation of ventricular  $K^+$  currents by angiotensin and endothelin. *American journal of physiology*, 2003; 284: H1168-81.
- 78) Shimoni, Y., Chuang, M., Abel, ED. & Severson, DL., Gender-dependant attenuation of cardiac potassium current in type 2 diabetic db/db mice. *Journal of Physiology*, 2003; 555(2): 345-54.
- 79) Shimoni, Y., Hormonal control of ion channels and transporters, *Progress in biophysics & Molecular biology*, 1999; 72:67-108.
- 80) Shimoni, Y. Inhibition of the formation action of angiotensine II reverses attenuated  $K^+$  currents in type 1 and type 2 diabetes. *Journal of physiology*, 2001; 537(1): 83-92.
- 81) Daleau, P. & Turgeon, J. Angiotensin II modulates the delayed rectifier potassium current of guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Archive*, 1994; 427(5-6):553-5.
- 82) Shimoni, Y. & Liu, X-F. Sex differences in the modulation of  $K^+$  currents in diabetic rat cardiac myocytes. *Journal of physiology*, 2003; 550(2): 401-412.
- 83) Shimoni, Y., Liu X-F. Gender differences in AngII levels and action on multiple  $K^+$  current modulation pathways in diabetic rats. *American journal of Physiology*, 2004; 287: H311-H319.
- 84) Zankov, DP., Omatsu-Kanbe, M., Isono, T., Toyoda, F., Ding, WG., Matsuura, H. & Horie, H. Angiotensin ii potentiates the slow component of delayed rectifier  $K^+$  current via AT1 receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation*, 2006; 113(10): 1278-86.
- 85) Morita, H, Kimura, J. & Endoh, M., Angiotensin II activation of chloride current in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 1995;483(1):119-30.
- 86) Park, W.S., Kim, N., Youm, J.B., Warda, M., Ko, J-H., Kim, S.J., Earm, Y.E. & Han, J., Angiotensin II inhibits inward rectifier  $K^+$  channels in rabbit coronary smooth muscles cells through protein kinase  $C\alpha$ , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 341: 728-35
- 87) Hayabuchi, Y., Standen, N.B. & Davies, N.W., Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated  $K^+$  channels of rat arterial smooth muscle, *American journal of physiology*, 2001; 281: H2480-9.
- 88) Capuano, V., Ruchon, Y., Antoine, S., Sant, M-C. & Renaud, J-F., Ventricular hypertrophy induced by mineralocorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac  $K^+$  channels in the rat, *Molecular and cellular biochemistry*, 2002; 237:1-10.



- 89) Akar, F.G., Wu, R.C., Juang, G.J., Tian, Y., Burysek, M., DiSilvestre, D., Xiong, W., Armoundas, A.A. & Tomaselli, G.F., Molecular mechanisms underlying K<sup>+</sup> current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure, *American journal of Physiology, Heart circulation physiology*, 2005; 288:H2887-96.
- 90) Broosky, P., Levi, A.J. & JonesJV., The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rat., *Journal of hypertension*, 1993; 6: 611-22.
- 91) Cerbai, E., Barbieri, M., Li, Q. & Mugelli, A., Ionic basis of action potential prologation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovascular research*, 1994; 8: 1180-7.
- 92) Benigni, A., Corna, D., Zola, C., Longaretti, L., Gagliardini, E., Perico, N., Coffman, T.M. & Remuzzi, G. Targeted deletion of angiotensin II type 1A receptor does not prtect mice from progressive nephropathy of overload proteinuria., *Journal of American society of nephrology*, 2004; 15: 2666-74.
- 93) Beucklemann, DJ., Nabauer, M. & Erdmann, E., Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure, *Circulation research*, 1993; 73(2): 379-85.
- 94) Wettwer, E., Amos, GJ., Posival, H. & Ravens, U., Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circulation Research*, 1994; 75(3): 473-82.
- 95) Kaab, S., Nuss, HB., Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Pak, PH., Kass, DA, Marban, E. & Tomaselli GF. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation Research*, 1996; 78(2): 262-73.
- 96) Xu, XP. & Best, PM. Decreased transient outward K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes from acromegalic rats. *American journal of physiology*, 1991; 260(3pt2): H935-42.
- 97) Meszaros, J., Ryder, KO. & Hart, G., Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *American Journal of physiology*, 1996; 271(6pt2): H2360-7.
- 98) Potreau, D., Gomez, JP. & Fares, N., Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from right ventricle of ferret heart., *Cardiovascular Research*, 1995; 30: 440-8.
- 99) Benitah, JP., Gomez, AM., Bailly, P., Da Ponte, JP., Berson, G., Delgado, C. & Lorente, P., Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated form normal and hypertrophied rat hearts. *Journal of Physiology*; 469: 111-138.
- 100) Kleiman, RB. & Houser, SR. Outward currents in hypertrophied feline ventricular myocytes, *Prog of clinical biology Research*, 1990; 334: 65-83.

- 101) Ryder, KO., Bryant, SM. & Hart, G., Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pig after abdominal aortic coarctation, *Cardiovascular research*, 1993; 27(7): 1278-87.
- 102) Zhou, J., Kodirov, S., Murata, M., Buckett, P.D., Nerbonne, J.M. & Koren, G., Regional upregulation of Kv2.1-encoded current,  $I_{K,slow2}$ , in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice, *American journal of physiology, Heart circulation physiology*, 2002; 284:H491-500.
- 103) London, B., Guo, W., Pan Xh. Lee, JS., Shusterman, V., Rocco, CJ., Logothetis, DA., Nerbonne, JM. & Hill JA. Targeted replacement of Kv1.5 in mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of  $I_{K,slow}$  and resistance to drugs-induced QT prolongation. *Circulation Research*, 2001; 88: 940-6.
- 104) Chaves, AA. Keller, WJ., Sullivan, SO., Williams, MA., Fitzgerald, LE., McPherson, HE., Goykhman, D., Ward, PD., Hoe, CM., Mixson, L. & Briscoe, RJ. Cardiovascular monkey telemetry: Sensitivity to detect QT interval prolongation. *Journal of pharmacological and Toxicological methods*, 2006; 54(2):150-8.
- 105) Fermini, B. & Fossa, AA. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nature Reviews of Drug Discovery*, 2003, 2(6): 439-47.
- 106) Fedida, D. Wible, B. Wang, Z, Fermini, B., Faust, F., Nattel, S. & Brown, AM. Identity of a novel delayed rectifier current from heart with a cloned  $K^+$  channel current. *Circulation Research*, 1993; 73(1): 210-6.
- 107) Brink, M., Erne, P., de Gasparo, M., Rogg, H., Schmid, A., Stulz, P. & Bullock, G. Localization of the angiotensin II receptor subtypes in the human atrium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1996; 28(8): 1789-99.
- 108) Bernal, O. & Moro, C. Cardiac arrhythmias in women, *Rev of Esp. Cardiology.*, 2006; 59(6): 609-18.
- 109) Justo, D. & Zeltser, D. Torsades de pointes induced by antibiotics. *European journal of internal medicine*, 2006; 17: 254-9.
- 110) Trépanier-Boulay, V., St-Michel, C., Tremblay, A. & Fiset C., Gender-based differences in cardiac repolarisation in mouse ventricle, *Circulation Research*, 2001; 89: 437-44.
- 111) Brouillette, J., Rivard, K., Lizotte, E. & Fiset, C., Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovascular research*, 2005; 65: 148-57
- 112) Wollert, KC. & Drexler, H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular Research*, 1999; 43:838-49.

113) Rials ST., XU, X., WU, Y., Marinchak, RA. & Kowey, PR., Regression of LV hypertrophy with captopril normalizes membrane currents in rabbits. *American journal of physiology*, 1998; 275(44): H1216-24.

114) Zhang, C., Yasuno, S., Kuwahara, K., Zankov, D.P., Kobori, A., Makiyama, t. & Horie, M. Blockade of angiotensin II type 1 receptor improves the arrhythmias morbidity in mice with left ventricular hypertrophy, *Circulation journal*, 2006; 70: 335-41.

115) Li, Y., Lu, Z., Zhang, C., Ma, J. & Liu, N., Long-term effects of imidapril on calcium and potassium current in rabbit left ventricular hypertrophied myocytes. *Chinese Medical Journal (eng)*, 2003; 116(12): 1795-8.

116) Antzelevitch C., Sicouri, S., Litovsky SH. *et al.* Heterogeneity within the ventricular wall, *Circulation Research*, 1991; 60: 1427-49.