

2M11-2714-4

Université de Montréal

Potentiel cardioprotecteur du mibéfradil et du vérapamil dans la  
cardiomyopathie du hamster UM-X 7.1

Par

France Paquette

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade  
Maîtrise ès sciences (M. SC)  
en pharmacologie

Février, 1999

© France Paquette, 1999



W. 415 1115

W  
4  
U58  
1999  
V. 076

Unité de mesure

Projet de loi relatif à la sécurité des véhicules et de la sécurité des

Caractéristiques des véhicules L14-171

171

7

Caractéristiques

Projet de loi relatif à la sécurité des véhicules

Projet de loi relatif à la sécurité des véhicules

Mémoire présenté à la Commission des affaires étrangères

En vue de la ratification de la Convention de Genève

relative au permis de conduire (C.E.C.)

et de la Convention de Genève

1959

Projet de loi relatif à la sécurité des véhicules



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Potentiel cardioprotecteur du mibéfradil et du vérapamil dans la  
cardiomyopathie du hamster UM-X 7.1

Présenté par :  
France Paquette

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur  
Directeur de recherche  
Codirecteur de recherche  
Membre du jury

Dr Patrick DuSouich  
Dr Louis Dumont  
Dr Gaëtan Jasmin  
Dr Pierre Haddad

Mémoire accepté le: .....

## Résumé

Certains antagonistes des canaux calciques de type L sont capables de prévenir l'expression des nécroses cardiaques chez le hamster UM-X 7.1. Compte tenu de l'augmentation de la densité du courant calcique T dans ce modèle de cardiomyopathie, nous émettons l'hypothèse que le mibéfradil, un antagoniste des canaux calciques T et L, serait bénéfique dans la phase initiale de nécrose de la maladie. Des hamsters de la lignée UM-X 7.1 de 30 jours ont été traités pendant 4-6 semaines avec des doses croissantes de mibéfradil (5-8 mg/kg par jour) et de vérapamil (10-20 mg/kg par jour). À la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés et des coupes histologiques du tissu myocardique (cœur) et squelettique (langue) ont été réalisées. Les dépôts calciques ont été mis en évidence histologiquement selon la technique de Von Kossa. Les résultats indiquent que malgré l'utilisation de doses croissantes et de la prolongation de la durée du traitement, aucun effet cardioprotecteur significatif n'a pu être décelé en présence du mibéfradil. Par contre, le vérapamil a réduit de façon significative la sévérité des nécroses cardiaques de même que leur incidence. Ces résultats suggèrent que ni l'inhibition des canaux calciques T et L, ni l'amélioration de la vasodilatation coronarienne ne participent à l'effet

cardioprotecteur observé en présence du vérapamil. L'hypothèse d'une action intracellulaire et plus spécifiquement une action au niveau du réticulum sarcoplasmique (récepteur à la ryanodine) expliquerait cette différence d'efficacité entre le vérapamil et le mibéfradil.

Mots clés : Antagonistes du calcium, mibéfradil, vérapamil, hamster, cardiomyopathie, nécrose, cardioprotection.

## Table des matières

Résumé	III
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations	XI
Remerciements	XIII
Dédicace	XV
<b>1.0 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 L'importance des maladies cardiaques dans notre société	2
1.2 Modèles expérimentaux de la cardiomyopathie	4
1.2.1 Cardiomyopathies induites	5
1.2.2 Cardiomyopathies héréditaires et défauts génétiques	8
1.3 Modèle expérimental :	
le hamster cardiomyopathique UM-X 7.1	12
1.3.1 Altérations ioniques dans la cardiomyopathie du hamster	17

1.3.2	Altérations membranaires dans la cardiomyopathie du hamster	19
1.3.3	Altérations métaboliques dans la cardiomyopathie du hamster	26
1.3.3.1	Au niveau de la mitochondrie	26
1.3.3.2	Au niveau du réticulum sarcoplasmique	27
1.3.4	Altérations vasculaires dans la cardiomyopathie du hamster	29
1.3.5	Altérations structurales dans la cardiomyopathie du hamster	31
1.3.6	Altérations fonctionnelles dans la cardiomyopathie du hamster	34
1.4	Essais thérapeutiques dans la cardiomyopathie du hamster	36
1.5	Antagonistes des canaux calciques et cardioprotection dans la cardiomyopathie du hamster	41
1.6	Mibéfradil et son potentiel cardioprotecteur	42
1.7	But du projet de recherche	49

<b>2.0</b>	<b>Cardioprotective efficacy of verapamil and mibefradil in young UM-X 7.1 cardiomyopathic hamsters</b>	51
<b>3.0</b>	<b>Discussion et conclusion</b>	81
3.1	Modèle expérimental	82
3.2	Antagonistes du calcium et cardioprotection	84
3.3	Conclusion	99
<b>4.0</b>	<b>Références</b>	101

**Liste des tableaux****Tableau 1**

Body weight gain and heart weight in CM hamsters  
exposed to mibefradil and verapamil 76

**Tableau 2**

Vasosélectivité versus cardioprotection de différents  
d'antagonistes du calcium (tableau 1 du mémoire) 93

## Liste des figures

### **Figure 1**

Arbre généalogique des premières lignées de hamsters

UM-X 7.1 11

### **Figure 2**

Évolution de la cardiomyopathie du hamster UM-X 7.1 13

### **Figure 3**

Conséquences hémodynamiques de la cardiomyopathie 15

### **Figure 4**

Modèle du complexe dystrophine-glycoprotéine 19-A

### **Figure 5**

Nécrose cardiaque 32

### **Figure 6**

Effets de différents médicaments sur le développement  
des nécroses myocardiques du hamster UM-X 7.1 36

### **Figure 7**

Structures chimiques 44

### **Figure 8**

Representative myocardial transection from an untreated  
cardiomyopathic hamster (figure 1 du manuscrit) 77

**Figure 9**

Representative myocardial transection from  
mibefradil-treated (A) and verapamil-treated (B)  
CMH hamster (figure 2 du mauscrit)

78

**Figure 10**

Effects of mibefradil and verapamil on the development  
of myocardial necrosis (figure 3 du manuscrit)

79

**Figure 11**

Effects of mibefradil and verapamil on the development  
of skeletal muscle (tongue) necrosis (figure 4 du manuscrit)

80

**Figure 12**

Effet vasculaire du mibéfradil en présence ou non du  
tétraméthrin ( $10^{-7}$  M) (figure 7 du mémoire)

89

**Figure 13**

Sites d'action intracellulaires potentiels (figure 9 du mémoire)

96

**Liste des abréviations**

$\alpha$	:	alpha
AMP <sub>c</sub>	:	3'5'-adénosine monophosphate cyclique
ATP	:	adénosine triphosphate
ATPase	:	enzyme dépendante de l'adénosine triphosphate
$\beta$	:	bêta
BTZ	:	benzothiazépine
Ca <sup>2+</sup>	:	calcium
CM	:	cardiomyopathique
$\delta$	:	delta
DHP	:	dihydropyridine
EC <sub>50</sub>	:	concentration nécessaire pour obtenir 50% de l'effet
F	:	famille
HPS	:	hematoxylin-phloxine-saffron
ip	:	intra-péritonéale
K <sup>+</sup>	:	potassium
kg	:	kilogramme
L	:	long-lasting

M	:	molaire
Mib	:	mibéfradil
mg	:	milligramme
$\mu$	:	micron
mV	:	millivolt
n	:	nombre de sujets
Na <sup>+</sup>	:	sodium
n.a.	:	not available
ng	:	nanogramme
PAA	:	phénylalkylamine
Ro 40-5967	:	mibéfradil
sc	:	sous-cutané
SEM	:	standard error of the mean
T	:	transient
VER	:	vérapamil

### **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance envers le docteur Louis Dumont qui m'a fait découvrir avec passion le domaine de la recherche. Il a toujours veillé à ce que je puisse réaliser ce projet de recherche. Ses connaissances et son inspiration ont su me guider dans ma formation scientifique. Son enthousiasme, sa patience, et sa compréhension ont rendu l'expérience agréable. Je le remercie sincèrement du temps précieux qu'il m'a consacré.

Je tiens également à remercier le docteur Gaëtan Jasmin qui a accepté de superviser ma formation en tant que codirecteur. Sa connaissance profonde de la cardiomyopathie du hamster et ses conseils pertinents m'ont permis d'appriivoiser une autre facette de la recherche.

De plus, je tiens à exprimer ma gratitude envers M. Florine Sarman pour son support technique, M. François Harel pour son expertise statistique ainsi qu'envers Mme Élisabeth Pérès, spécialiste en infographie.

Enfin, je remercie mes collègues Pierre Beaucage, Jean-françois Boileau, Éric Fontaine, Nathalie Lapointe, Isabelle Lévesque, Julie Massicotte, Phong-liem Ngo et Diem Vu pour leur support, leur écoute et surtout pour avoir été de bons amis.

À mes chers parents

## **INTRODUCTION**

## **1.1 Importance des maladies cardiaques dans notre société**

La mortalité associée aux maladies cardiovasculaires est deux fois plus élevée que celle associée au cancer et jusqu'à 40 fois plus élevée que celle associée au SIDA (syndrome immunodéficientaire acquis). Plus de 115 billions de dollars sont dépensés annuellement en soins médicaux reliés aux maladies cardiovasculaires (Davidoff et Gwathmey, 1994). En 1995, elles représentaient la catégorie de maladies la plus coûteuse au Canada (Santé Canada, 1995). On estime que 440 000 nouveaux cas de maladies cardiovasculaires sont diagnostiqués en Amérique du Nord chaque année (Teo et coll., 1992). Prévoyant qu'en l'an 2000, 20% de la population aura au-delà de 80 ans, on peut supposer que l'importance des maladies cardiovasculaires ne pourra que s'accroître (Davidoff et Gwathmey, 1994).

En dépit de l'augmentation du fardeau économique associé à ces maladies, le défi ne se limite pas à améliorer la qualité des soins mais à assurer une meilleure qualité de vie des personnes atteintes et, dans la mesure du possible, à réduire l'incidence de ces maladies. Les maladies cardiaques dont les cardiomyopathies, suscitent une consommation

élevée de médicaments. Généralement, ces médicaments n'ont peu ou pas d'effet préventif. Ainsi aux États-Unis, on estime qu'une personne sur 500 porte le gène de la cardiomyopathie hypertrophique et que la cardiomyopathie dilatée entraînera le décès de 10 000 personnes par année. L'identification et la caractérisation des facteurs associés au développement de la cardiomyopathie sont donc considérés comme un objectif primordial pour le développement de traitements efficaces.

## **1.2 Modèles expérimentaux de la cardiomyopathie**

Les patients peuvent être difficilement utilisables comme modèle expérimental pour l'étude de la prévention de la cardiomyopathie. En effet, les patients victimes de la cardiomyopathie sont soit sous l'influence d'une polythérapie, soit à un stade avancé de leur cardiomyopathie, sans compter les restrictions éthiques quant aux interventions possibles. Le développement de modèles animaux représentant les diverses formes de cardiomyopathie observées chez l'homme permet d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de l'évolution de la maladie. Il est bien évident que la compréhension des mécanismes sous-jacents à la pathogénèse et à la pathophysiologie de la cardiomyopathie permettra le développement d'une nouvelle avenue thérapeutique plus efficace.

### 1.2.1 Cardiomyopathies induites

Des expériences réalisées à l'aide de modèles animaux ont permis de reproduire différentes formes de cardiomyopathie. Par exemple, certaines peuvent être induites par une ischémie mimant l'infarctus du myocarde (Drexler et coll., 1992; Terlink et coll., 1994), par des mutations génétiques (Vikstrom et coll., 1996), par des substances pharmacologiques tel que la doxorubicine (Toyoda et coll., 1998), l'imipramine (Lucas et coll., 1992), le furazolidone (Genao et al, 1996) ou l'alcool (Preedy et al, 1996). Les cardiomyopathies peuvent aussi être induites par une déficience en carnitine (Paulson, 1998), par une réaction auto-immune (infection virale ou bactérienne) (Huber, 1997), par une destruction des valves cardiaques (Smith et coll., 1985) ou par une stimulation de la fréquence cardiaque au-delà des limites de la normale (Shinbane et al, 1997; Ravens et al, 1996). Certaines pathologies dont la cirrhose du foie (Ma et al, 1996) et le diabète (Schaffer et coll., 1985) peuvent également induire une cardiomyopathie chez l'animal.

Chacun de ces modèles possède des caractéristiques qui lui sont propres. Bien que quelques-uns représentent certaines formes de cardiomyopathie observées chez l'homme, la diversité des anomalies associées aux différentes formes de cardiomyopathie rend celles-ci difficiles à reproduire. De fait, chacun de ces modèles expérimentaux soulèvent des critiques. Ainsi, l'espèce animale étudiée peut différer de l'espèce humaine quant aux mécanismes régulateurs des conditions hémodynamiques (i.e. médiateurs impliqués dans le système sympathique et le système parasympathique, etc) et aux autres caractéristiques physiologiques présentes (i.e. fréquence cardiaque, pression coronarienne, pression systémique, etc).

D'autres critiques s'adressent au traumatisme chirurgical nécessaire pour l'induction de la cardiomyopathie (modèle tachycardique et ischémique) et aux doses des composés pharmacologiques utilisées pouvant affecter la libération de facteurs endogènes ainsi que le fonctionnement de certains organes indirectement impliqués dans la cardiomyopathie humaine (foie, rein).

Le modèle de souris transgénique induit par une mutation au niveau des chaînes lourdes de la myosine (mutation spécifique au niveau G1445A et délétion des acides aminés 468-527) se rapproche beaucoup plus selon certains (Vikstrom et coll., 1996), de la cardiomyopathie hypertrophique humaine (évolution progressive de la maladie, désordre cellulaire, maladie coronarienne, fibrose et hypertrophie des myocytes). Puisque chez l'homme, la cardiomyopathie se manifeste progressivement, un modèle comme celui de la souris transgénique semble particulièrement utile pour caractériser le potentiel cardioprotecteur de certains médicaments. Cependant, des différences spécifiques relatives au sexe ont été rapportées pour ce modèle. En effet, lorsque les femelles manifestent des signes d'hypertrophie, les mâles ont déjà atteint une dilatation significative du ventricule gauche (Vikstrom et coll., 1996). Des telles différences n'ont pas été relatées chez l'humain.

### 1.2.2 Cardiomyopathies héréditaires et défauts génétiques

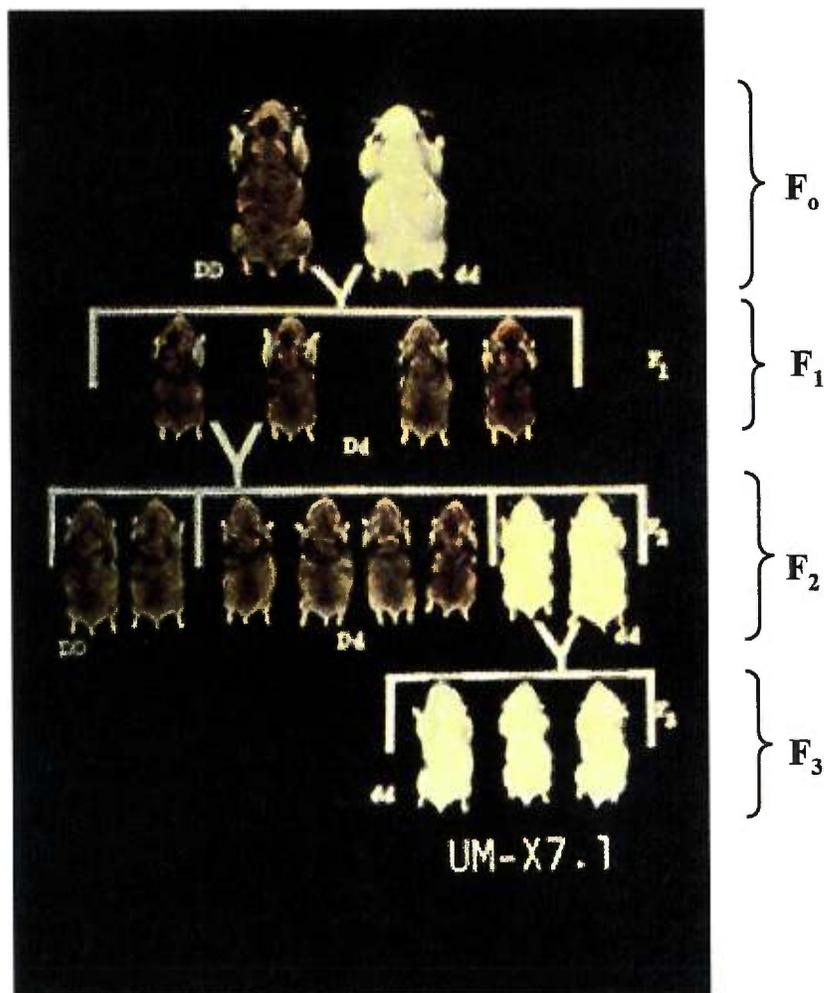
La découverte d'une cardiomyopathie héréditaire dans diverses espèces animales tel que le chien, la souris, le porcelet, la dinde, le bovin et le hamster a eu pour effet de stimuler la recherche sur ce type de pathologie. Même si les opinions sont encore partagées quant aux similitudes que représentent ces modèles avec l'homme, certains croient qu'ils présentent plusieurs avantages permettant l'étude des désordres moléculaires associés à la cardiomyopathie (Jasmin et coll., 1973).

La découverte de la cardiomyopathie héréditaire chez le hamster syrien par Homburger et ses collaborateurs au début des années 60 (Homburger et coll., 1962) a été d'une contribution significative dans l'étude de certaines formes de cardiomyopathie observées chez l'homme. Ces chercheurs ont rapporté l'apparition d'une myopathie spontanée et des nécroses musculaires tant squelettiques que cardiaques dans une lignée consanguine de hamsters syriens. Des études ultérieures avec la souche (BIO 1.50) et les générations successives (BIO 14.6) ont permis d'établir que cette maladie était transmise par un

gène autosomique par mode récessif (Homburger et coll, 1966). Il devient alors possible par ce mode de transmission héréditaire d'établir une lignée d'animaux cardiomyopathiques en croisant des homozygotes avec des hamsters sains et récupérer par la suite le gène mutant dans la génération F<sub>2</sub>. Les lignées subséquentes mènent à une fréquence de cardiomyopathie de l'ordre de 100%. Parmi les multiples lignées disponibles, Bajusz et Jasmin (1972) ont comparé les animaux des souches Bio 14.6, et ceux d'une lignée développée à l'Université de Montréal (UM-X 7.1).

Il n'existe, en fait, que peu de différences dans l'expression des nécroses musculaires entre ces différentes lignées ce qui laisse supposer que les variations génétiques n'affectent pas l'expression de la maladie. Toutefois, l'apparition, le développement et la gravité de la maladie diffèrent dans ces lignées (Homburger, 1979), voir pour les générations qui en dérivent. Par exemple, la sévérité de la maladie, en ce qui concerne les animaux BIO 14.6, a diminué progressivement au fil des 28 générations étudiées. On observa alors une baisse graduelle de la sévérité des signes et symptômes de la maladie et la survie de ces animaux s'en est trouvée accrue. La survie moyenne était de 146 jours

en 1966 (Homburger et coll., 1966) pour atteindre 280 jours 4 ans plus tard (Gertz, 1972; Jasmin et coll., 1973) et cela a continué à progresser par la suite. Cet accroissement de la survie semble liée aux critères de sélection moins rigoureux du choix des géniteurs. Le développement de la souche UM-X 7.1 à partir de hamsters BIO 14.6 (figure 1) a été établie à l'Université de Montréal il y a un peu plus de 25 ans. Grâce à l'utilisation de critères de sélection rigoureux, cette lignée a conservé une meilleure homogénéité des signes et symptômes de la maladie au fil des 75 générations produites. En effet, la survie moyenne de la lignée UM-X 7.1 se situait à environ 190 jours en 1979 (Jasmin et coll., 1979) et elle est de 200-250 jours 19 ans plus tard (Nakamura et coll., 1998).



**Figure 1.** Arbre généalogique des premières lignées de hamsters cardiomyopathiques UM-X 7.1. Hamsters de fourrure brune n'expriment pas la maladie. Hamsters de fourrure blanche expriment la maladie. F<sub>0</sub> = accouplement entre un hamster syrien normal et un hamster syrien cardiomyopathique. F<sub>1</sub> = 100% rejetons hétérozygotes. F<sub>2</sub> = 25% rejetons homozygotes cardiomyopathiques. F<sub>3</sub> = 100% rejetons homozygotes et développement de la lignée UM-X 7.1.

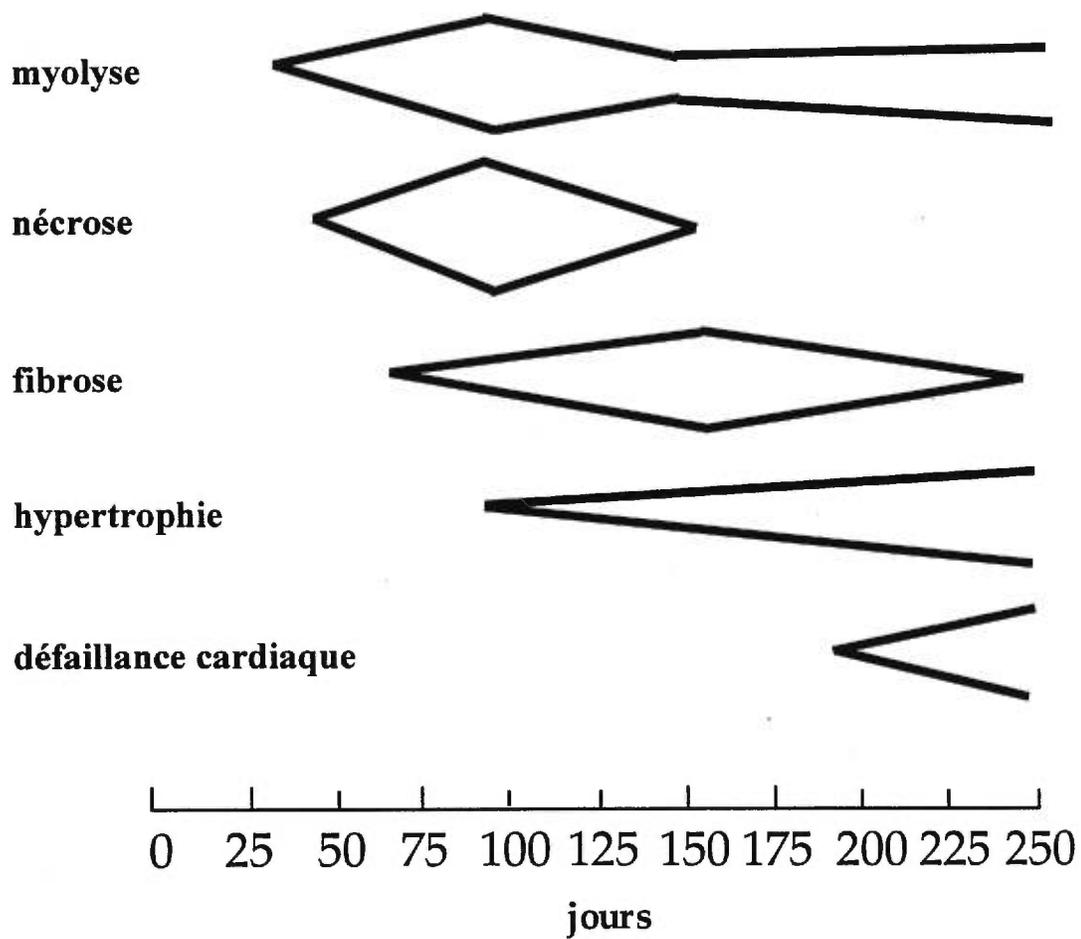
Abréviation: F = famille

### **1.3 Modèle expérimental : le hamster cardiomyopathique**

#### **UM-X 7.1**

L'évolution de la cardiomyopathie du hamster de la lignée UM-X 7.1 est lente, progressive et bien définie (Jasmin et coll. 1982). L'uniformité de l'expression de la maladie rend la maladie prévisible et offre la possibilité d'étudier certains désordres myocardiques dans des stades précoces de son expression (Jasmin et Proscheck, 1996; Rouleau et al., 1982; Zatuchni et coll.; 1951).

Une abondante littérature relative aux anomalies histologiques, biochimiques et mécaniques du myocarde à chacune des phases de la cardiomyopathie du hamster est disponible. Quatre phases distinctes ont été identifiées (figure 2): la myolyse et la nécrose, qui se caractérisent par des lésions disséminées surtout au niveau du septum et de la paroi libre du ventricule gauche, sont observables tôt et leur expression est maximale à 90 jours de vie; la fibrose dont l'expression est maximale à 150 jours de vie; l'hypertrophie observable à partir de 175 jours de vie comme mécanisme compensatoire; et finalement la



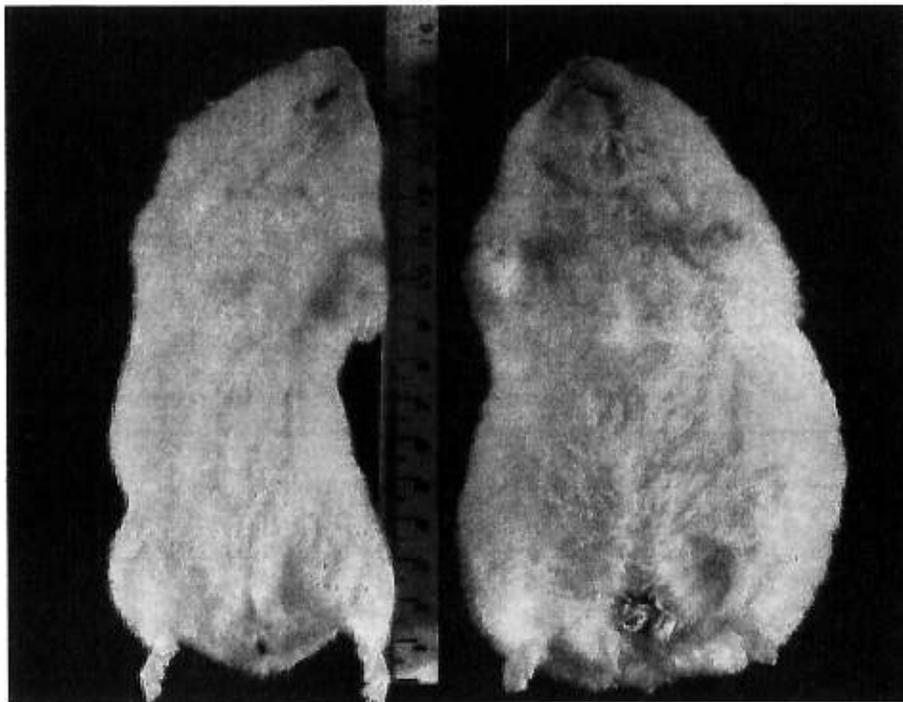
Tiré de *Jasmin et coll., 1982 (voir références)*.

**Figure 2.** Évolution de la cardiomyopathie du hamster UM-X 7.1

phase de décompensation hémodynamique observable entre 225 et 250 jours de vie (Jasmin et al. 1982).

Cliniquement, la maladie n'a pas de conséquence hémodynamique chez les jeunes hamsters. En effet, l'animal n'affiche aucun problème cardiaque en dépit des nombreux foyers nécrotiques au niveau du myocarde. Tout comme dans la cardiomyopathie humaine, l'évolution de la maladie mène à la défaillance cardiaque. La mort est souvent attribuable à des arythmies ventriculaires ou à l'insuffisance cardiaque (anasarque, congestion hépatique et/ou pulmonaire, figure 3).

La cardiomyopathie du hamster suscite beaucoup d'intérêts. Sa popularité n'a fait que croître au fil des ans et son utilisation a permis des percées significatives dans notre compréhension de la cardiomyopathie humaine et de son traitement. Les conséquences du défaut génétique primaire sont nombreuses et impliquent autant des phénomènes ioniques (Bond et coll., 1988), membranaires (Sakamoto et coll., 1997; Roberds et coll., 1992; Jasmin et coll., 1991), métaboliques (Naranjan et coll., 1994), vasculaires (Sonnenblick et

**A****B**

**Figure 3.** Conséquences hémodynamiques de la cardiomyopathie (décompensation hémodynamique). A) hamster de 180 jours. B) hamster de 250 jours avec un œdème périphérique important.

coll., 1985), structuraux (Jasmin et coll., 1982) que fonctionnels (Ma et coll., 1979). Dans le présent travail, nous traiterons des anomalies observables durant la phase de nécrose puisque le profil cardioprotecteur des deux médicaments a été étudié dans la phase initiale du développement de la cardiomyopathie.

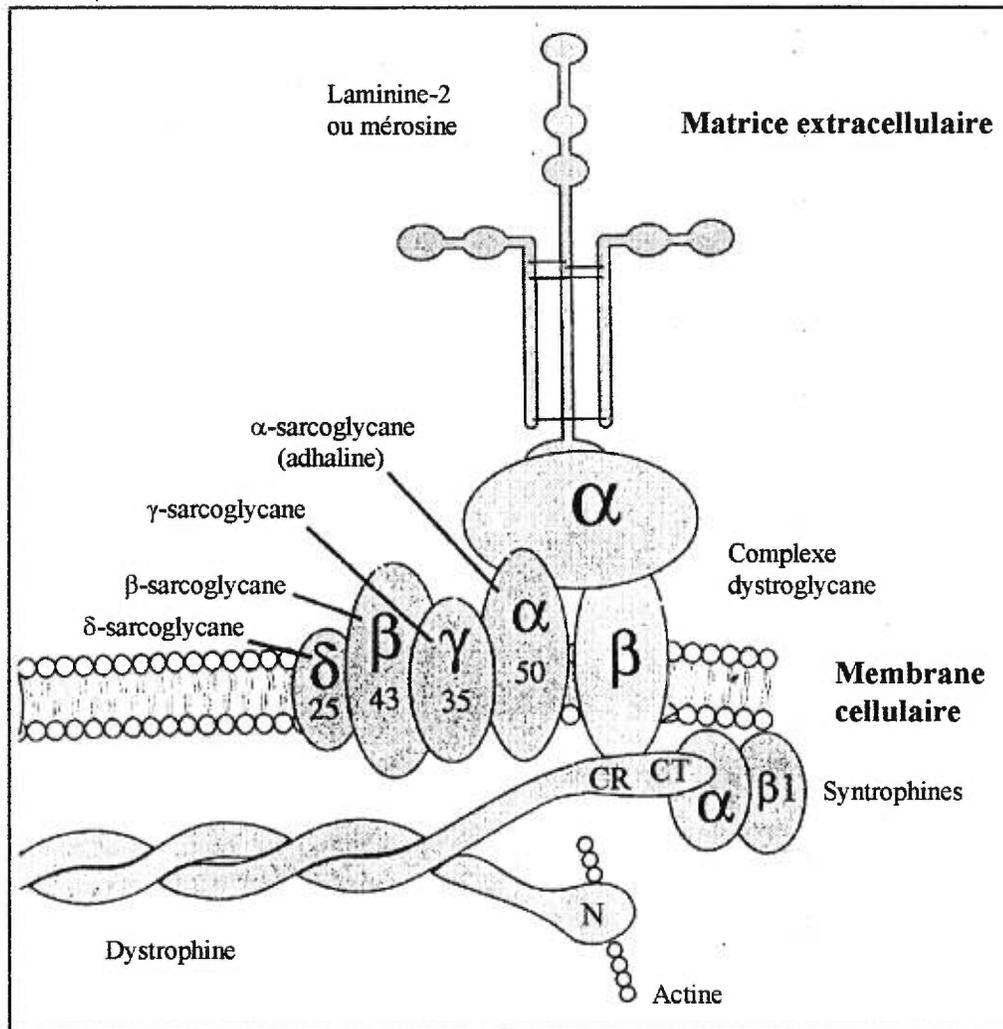
### 1.3.1 Altérations ioniques dans la cardiomyopathie du hamster

Il est connu que le fonctionnement des cellules cardiaques dépend de leur habileté à maintenir l'homéostasie calcique. Une perte de cette homéostasie perturbe leur fonctionnement et engendre des dysfonctions (Schwartz et coll., 1973; Ito et coll., 1972). Dans le cœur du hamster UM-X 7.1, âgé de 24-45 jours et de 128-228 jours, des chercheurs ont détecté une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ionisé (Jasmin et coll., 1984; Hano et coll., 1991). De façon plus spécifique, Bond (1988) a établi une gradation du contenu intracellulaire de calcium ionisé démontrant une relation directe entre la progression de la nécrose et l'augmentation de la concentration de calcium. Ce ne sont cependant pas tous les cardiocytes qui seront affectés de la même façon. Cette surcharge calcique semble se manifester dans les cellules au voisinage d'une zone ischémique, d'une façon significative au pourtour de la zone en processus de nécrose et d'une façon beaucoup plus importante au pourtour du tissu nécrosé. Dans les autres cellules, il n'y a aucun changement dans la concentration intracellulaire de calcium ionisé. Ceci ne signifie pas nécessairement que les mouvements calciques soient normaux à

l'intérieur de ces cellules. D'ailleurs, une diminution de la tolérance au stress calcique a été démontrée dans les cardiocytes de jeunes hamsters cardiomyopathiques (Hano et coll., 1991). Cette élévation du calcium intracellulaire apparaît importante et elle a même été proposée comme un facteur initiateur de l'étiologie de la cardiomyopathie du hamster syrien (Lossnitzer et coll., 1975). Le mécanisme exact expliquant l'origine de cette surcharge calcique est cependant mal connu mais certaines altérations au niveau membranaire, métabolique et vasculaire pourraient contribuer à ces changements ioniques.

### 1.3.2 Altérations membranaires dans la cardiomyopathie du hamster

Plusieurs études ont permis d'identifier un défaut primaire au niveau membranaire (Berry et coll., 1983; Makino et coll., 1985; Panagia et coll., 1986). Dans certaines formes de cardiomyopathies, des altérations au niveau des chaînes lourdes de la myosine  $\beta$  (chromosome 14), de la tropomyosine  $\alpha$  (chromosome 15) et de la troponine T cardiaque (chromosome 1) ont été identifiées (Davies et coll., 1995). D'autres altérations au niveau des glycoprotéines membranaires dont  $\alpha$  (chromosome 17),  $\beta$  (chromosome 4) et  $\gamma$  (chromosome 13) ont également été observées (Duclos et coll., 1995). Ces gènes, en plus du gène de la dystrophine responsable de la dystrophie musculaire (chromosome X), ont été exclus comme éléments responsables de la cardiomyopathie du hamster (Okazaki et coll., 1996; Takada et coll., 1996). L'origine génétique de la cardiomyopathie du hamster semble plutôt liée à une altération au niveau du complexe dystrophine-glycoprotéine (Roberds et coll., 1993) (figure 4). Ce n'est que plus tard que d'autres chercheurs (Nigro et coll., 1997; Sakamoto et coll., 1997) ont identifié une déficience dans la transcription d'une protéine associée à la dystrophine, la  $\delta$ -sarcoglycane (chromosome 9),



*Tiré de Duclos et coll., 1995 (voir références)*

**Figure 4. Modèle du complexe dystrophine-glycoprotéines.** La dystrophine, protéine du cytosquelette musculaire, est associée en homodimères antiparallèles; elle est liée aux filaments d'actine par son extrémité amino-terminale (N) et aux syntrophines par son extrémité carboxy-terminale (CT). Elle est ancrée par son domaine riche en cystéine (CR) à la β-dystroglycane du complexe glycoprotéinique. Celui-ci est composé des sous-complexes dystroglycane et sarcoglycane. Il est lui-même relié à la laminine α<sub>2</sub>, composante de la matrice extracellulaire de la fibre musculaire, par l'α-dystroglycane.

déficience qui entraîne ainsi la disparition de cette dernière. (Nigro et coll., 1997; Sakamoto et coll., 1997). Cette anomalie au niveau du cytosquelette membranaire semble vraisemblablement causer une instabilité au niveau du sarcolemme et par le fait même altérer l'homéostasie du calcium intracellulaire (Ervasti et coll., 1990; Turner et coll., 1991). La surcharge calcique qui en résulte (Lossnitzer, 1975) survient alors de façon simultanée avec la période où les nécroses myocardiques sont les plus manifestes dans ce modèle (Jasmin et coll., 1982). Cette surcharge calcique constitue la manifestation la plus précoce du défaut génétique membranaire (Dhalla et coll., 1975; Jasmin et coll., 1984).

La membrane plasmique des cardiocytes contient beaucoup de cholestérol. Ce dernier est impliqué dans sa fluidité tout comme dans le contrôle de sa perméabilité (Cooper et coll., 1977; Demel et coll., 1976; Papahadjapoulos et coll., 1973) et dans l'activité d'enzymes qui y sont localisées (Farias et coll., 1975; Klein et al, 1978). Des chercheurs se sont intéressés au contenu en cholestérol et ont démontré une augmentation du cholestérol autant au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau de la membrane des organelles intracellulaires

du cœur de hamster cardiomyopathique (Slack et coll., 1980). Ces changements du contenu en cholestérol membranaire pourraient perturber l'activité des protéines membranaires et les mouvements d'entrée et de sortie des ions (Papahadjapoulos et coll., 1973). Ainsi, une altération du contenu membranaire en cholestérol pourrait contribuer à l'augmentation du calcium dans les cardiocytes.

Sachant que le fonctionnement de certaines enzymes membranaires est tributaire du calcium, on pourrait s'attendre à ce que leur activité soit altérée en présence d'une surcharge calcique. Bien que des altérations au niveau de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase aient été observées à un stade plus avancé de la cardiomyopathie par Makino (Makino et coll., 1985), une diminution de l'activité de cette enzyme a été rapportée chez des hamsters âgés entre 25 et 35 jours de vie (Panagia et coll., 1984). Cette activité réduite de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase entraînerait une augmentation du  $\text{Na}^+$  intracellulaire favorisant ainsi la surcharge intracellulaire du calcium par la participation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Naranjan et coll., 1994; Makino et coll., 1985). Agissant comme un régulateur de la concentration cationique intracellulaire, la diminution de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pourrait ainsi expliquer la perte de l'homéostasie

calcique observée dans la cardiomyopathie du hamster (Borowski et coll., 1974; Lossnitzer et coll., 1974; Dhalla et coll., 1982). Nous pouvons cependant exclure la participation de certaines enzymes membranaires à l'étiologie de la cardiomyopathie, dont les ATPases dépendantes du  $Mg^{2+}$  et du  $Ca^{2+}$  (Naranjan et coll., 1994, Panagia et coll., 1984) et l'adénylate cyclase (Panagia et coll., 1984).

Avec ces changements dans la composition du cholestérol membranaire, on pourrait s'attendre à des altérations dans le fonctionnement de protéines de transport. En effet, une augmentation de l'activité de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  a été rapportée dans le cœur de hamster cardiomyopathique dès le 30ième jour de vie (Wagner et coll., 1989). Sachant que cet échangeur favorise la sortie du calcium de la cellule, la surcharge calcique expliquerait l'augmentation de l'activité de cet échangeur. L'implication de cette augmentation d'activité dans l'étiologie de la maladie ne fait pas l'unanimité puisque Makino et coll. (1985) n'ont pas réussi à documenter de changement au niveau de cet échangeur à 40 jours de vie.

Au niveau du sarcolemme de cardiocytes de hamsters en phase de nécrose (BIO 14.6), le nombre de sites de liaison ( $B_{max}$ ) à certains antagonistes calciques, tels les dihydropyridines et les phénylalkylamines serait augmenté (Kuo et al. 1987, Wagner et coll., 1986; Wagner, 1989) La souche animale utilisée semble cependant jouer un rôle dans la capacité à identifier une augmentation de ces récepteurs. En effet, une telle augmentation n'a pu être observée avec la souche CHF 146 (Howlett et coll., 1987) et BIO 53.58 (Bazan et coll., 1987). Sachant que la souche UM-X 7.1 provient de la souche BIO 14.6, l'augmentation des sites de liaison des antagonistes du calcium pourrait aussi s'appliquer à la souche développée à l'Université de Montréal. De plus, sachant que cette augmentation des récepteurs survient avant même l'apparition des nécroses myocardiques, il se peut qu'elle soit impliquée dans l'apparition de ces nécroses.

D'autres études sur la pathogénèse de la cardiomyopathie du hamster suggèrent qu'une augmentation des canaux calcique provoquerait des anomalies au niveau des flux calciques (Wagner et coll., 1986; Howlett et coll., 1987; Jasmin et coll., 1994). En effet, une augmentation du courant calcique de type T entrant a été démontrée dans les cardiocytes

avant même l'apparition des changements biochimiques et anatomiques chez le hamster cardiomyopathique. Or, en favorisant l'entrée du calcium dans la cellule à travers le sarcolemme, cette anomalie favoriserait la surcharge calcique. Ce changement au niveau des canaux calciques de type T pourrait constituer un facteur important de la genèse de la cardiomyopathie. En effet, chez le hamster cardiomyopathique, il semble y avoir plus de cellules cardiaques qui expriment un courant calcique T comparativement aux hamsters normaux (Bkaily et coll., 1997). Ces observations soulèvent l'hypothèse que les canaux calciques de type T pourraient jouer un rôle important dans la genèse de la cardiomyopathie. L'augmentation des canaux calciques voltage-dépendant de type L (Wagner et coll., 1986) ne semble cependant pas contribuer à cette surcharge calcique, puisque le courant calcique L n'augmente pas de façon proportionnelle à la densité de ces canaux (Sen et coll., 1994; Bkaily et coll., 1997). Ainsi, des désordres ioniques pourraient constituer la manifestation primaire du défaut génétique (Dhalla et coll., 1975; Slack et coll., 1980; Jasmin et coll., 1984) et entraîner les dysfonctions au niveau de la mitochondrie, du réticulum sarcoplasmique et de là une nécrose myocytaire disséminée (Wrogemann et coll., 1976).

### 1.3.3 Altérations métaboliques dans la cardiomyopathie du hamster

#### 1.3.3.1 Au niveau de la mitochondrie

Chez le hamster UM-X 7.1, des changements dans la perméabilité de la membrane mitochondriale surviennent avant même que des changements nécrotiques ne soient décelables (Proscheck et coll., 1982; Panagia et coll., 1986). De plus, le pic des nécroses semble coïncider avec la période où les dysfonctions mitochondriales sont plus importantes (Proscheck et coll., 1982). En effet, vers le 100<sup>ième</sup> jour de vie de l'animal, la capacité de la mitochondrie à produire de l'énergie (phosphorylation oxydative) est réduite et semble secondaire à une surcharge calcique mitochondriale. La diminution de la capacité respiratoire mitochondriale et de la production de la créatine phosphate (Proscheck et coll., 1982; Wickman-Coffelt et coll., 1986<sup>a</sup>) fournissent une preuve à cette réduction de la phosphorylation oxydative. Or, on pourrait s'attendre à ce que les enzymes mitochondriales ATP-dépendante soient moins fonctionnelles. Paradoxalement, aucun changement au niveau de l'ATPase mitochondriale et de l'activité de capture de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la mitochondrie n'a été décelé (Naranjan et coll., 1994). Ceci suggère que les ATPases calciques fonctionnent

mais que la réduction de leur activité n'a pas encore atteint un niveau critique.

### 1.3.3.2 Au niveau du réticulum sarcoplasmique

Dans la cardiomyopathie du hamster, le réticulum sarcoplasmique serait incapable de bien séquestrer le calcium puisque sa  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase est dysfonctionnelle. Ceci s'expliquerait par une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le calcium (Naranjan et coll., 1994). Un défaut du canal sensible à la ryanodine responsable de la relâche calcique dans le cytosol contribuerait aussi aux dysfonctions rapportées. En effet, dans des muscles papillaires de jeunes hamsters cardiomyopathiques (4 mois), on a observé une réponse inotrope positive à de faibles concentrations de vérapamil et de ryanodine (Finkel et coll., 1992; Finkel et coll., 1993) mais aucune réponse aux antagonistes du calcium comme la nifédipine, le diltiazem et le gallopamil n'ont été rapportées. Il est reconnu que parmi ces substances, seul le vérapamil est capable d'interagir avec le canal sensible à la ryanodine (Valdivia et coll., 1990). Or, si ce canal sensible à la ryanodine était surexprimé, il pourrait provoquer la relâche d'une quantité plus importante de calcium dans le cytosol et ainsi jouer un

rôle significatif dans l'étiologie de la cardiomyopathie du hamster (Sapp et coll., 1994). En plus de ce canal sensible à la ryanodine, d'autres composantes du réticulum sarcoplasmique pourraient être impliquées dans la cardiomyopathie du hamster. En effet, il a été suggéré qu'une surproduction de norépinéphrine locale pourrait activer les mouvements calciques par la voie de l'inositol-triphosphate pour ainsi favoriser la détérioration observée dans la phase initiale de nécrose (Jasmin et coll., 1979; Kawaguchi et coll., 1991).

Bref, du point de vue métabolique, la détérioration des mécanismes responsables de l'homéostasie calcique intracellulaire serait étroitement liée à l'initiation du processus nécrotique observé dans la cardiomyopathie du hamster (Jasmin et coll., 1973).

#### 1.3.4 Altérations vasculaires dans la cardiomyopathie du hamster

Sonnenblick et coll. (1985) furent les premiers à suggérer que le défaut primaire responsable du développement de la cardiomyopathie du hamster soit secondaire aux vasospasmes coronariens et à une augmentation de la réactivité des vaisseaux coronariens. Il a été prouvé que des vasospasmes coronariens (Factor et coll., 1982), qu'un flot coronarien hétérogène (Figulla et coll., 1987) ainsi qu'une augmentation de la réactivité vasculaire à des agents vasoconstricteurs (Conway et coll., 1987; Conway et coll., 1994) font partie de cette pathologie. Sachant que ces altérations vasculaires ont été observées avant l'apparition des nécroses, on suggère ainsi leur rôle dans l'initiation du processus nécrotique.

Dans le cœur normal, une ischémie transitoire causée par un vasospasme devrait être réversible et ne pas laisser de séquelles permanentes. Une anomalie au niveau de la gestion du calcium intracellulaire dans les cardiocytes du hamster cardiomyopathique ferait en sorte de rendre le cardiocyte incapable de tolérer une ischémie focale transitoire. La nécrose cellulaire est observable dans une zone

périvasculaire bien définie, la grosseur de la zone nécrosée pourrait dépendre de l'importance de la zone irriguée par le vaisseau qui subit le spasme (Jasmin et coll., 1979).

Les vaisseaux coronariens des hamsters cardiomyopathiques présentent une hypersensibilité à des agents vasoconstricteurs, tel que les catécholamines, la vasopressine, l'endothéline et l'histamine (Hunter et coll., 1983; Sole et coll., 1984; Conway et coll., 1987). Cette hypersensibilité pourrait être responsable des vasospasmes à répétition (Factor et coll., 1982) et de l'apparition d'une nécrose focale disséminée.

### 1.3.5 Altérations structurales dans la cardiomyopathie du hamster

Les changements pathologiques précoces observés dans la cardiomyopathie du hamster sont associés à une surcharge calcique et sont caractérisés par la myolyse et la nécrose de coagulation (Jasmin et coll., 1973; Jasmin et coll., 1982). Ces deux types de dégénérescence myofibrillaire sont communs aux maladies cardiaques ischémiques. La myolyse est un processus qui affecte un groupe de cellules musculaires sans provoquer de processus inflammatoire et ce, tout en préservant l'intégrité des structures avoisinantes (Schlesinger et coll., 1955). Dans les premiers stades de ce processus dégénératif le noyau est préservé mais une diminution du pH intracellulaire activera certaines enzymes intracellulaires (lipases, protéases, phospholipases). Par la suite, les composantes du cytoplasme coagulent d'où l'appellation: nécrose de coagulation. Ce processus fait référence à une mort cellulaire brutale induisant une réaction inflammatoire et résultant d'une dénaturation des protéines causée par une diminution du pH intracellulaire et par une surcharge calcique (Farber 1982). Une diminution du pH en deçà de 6.5 est suffisante pour induire des changements pathologiques irréversibles (Brachfeld, 1972; Jacobus et coll., 1982). Les lésions cardiaques sont

visibles à partir du 40<sup>ième</sup> jour de vie (Jasmin et coll., 1979). Les foyers nécrotiques sont répartis au hasard, atteignant leur sévérité maximale vers le 100<sup>ième</sup> jour de vie (figure 5). La concentration plasmatique de la créatine kinase reflète bien l'intensité du processus nécrotique (Jasmin et coll., 1979). La formation accrue de collagène (reflète la cicatrisation) et la fibrose permettent le remplacement du tissu nécrosé et provoquent des dysfonctions mécaniques dans les phases ultérieures de la maladie.



**Figure 5.** Nécroses cardiaques. Remarquez les stries blanches indicateur de nécroses et de dépôts calciques

### 1.3.6 Altérations fonctionnelles dans la cardiomyopathie du hamster

Dans les premières phases de la maladie, l'équilibre hémodynamique semble préservé malgré les nécroses qui envahissent peu à peu le myocarde (Bajusz et coll., 1972; Jasmin et Eu, 1979; Jasmin et Proscheck, 1982). La phase de nécrose est cependant responsable, en partie, des changements mécaniques ultérieurs qui surviennent dans ce modèle de cardiomyopathie.

Une détérioration de la contractilité survient dès le 30<sup>ième</sup> jour de vie mais elle est sans conséquence hémodynamique. Elle se poursuit tout au long de la vie de l'animal (Ma et coll., 1979). Les signes d'insuffisance cardiaque comprennent l'hépatomégalie, une accumulation de liquide dans la cavité thoracique et l'anasarque. Dans la phase terminale de la maladie, des caillots se développent dans les chambres cardiaques dilatées (Jasmin et coll., 1982).

Avant que les signes d'insuffisance cardiaque apparaissent, l'analyse des caractéristiques de la réponse inotrope (contractilité) et lusitrope (relaxation) révèle que la réponse inotrope est diminuée alors que la

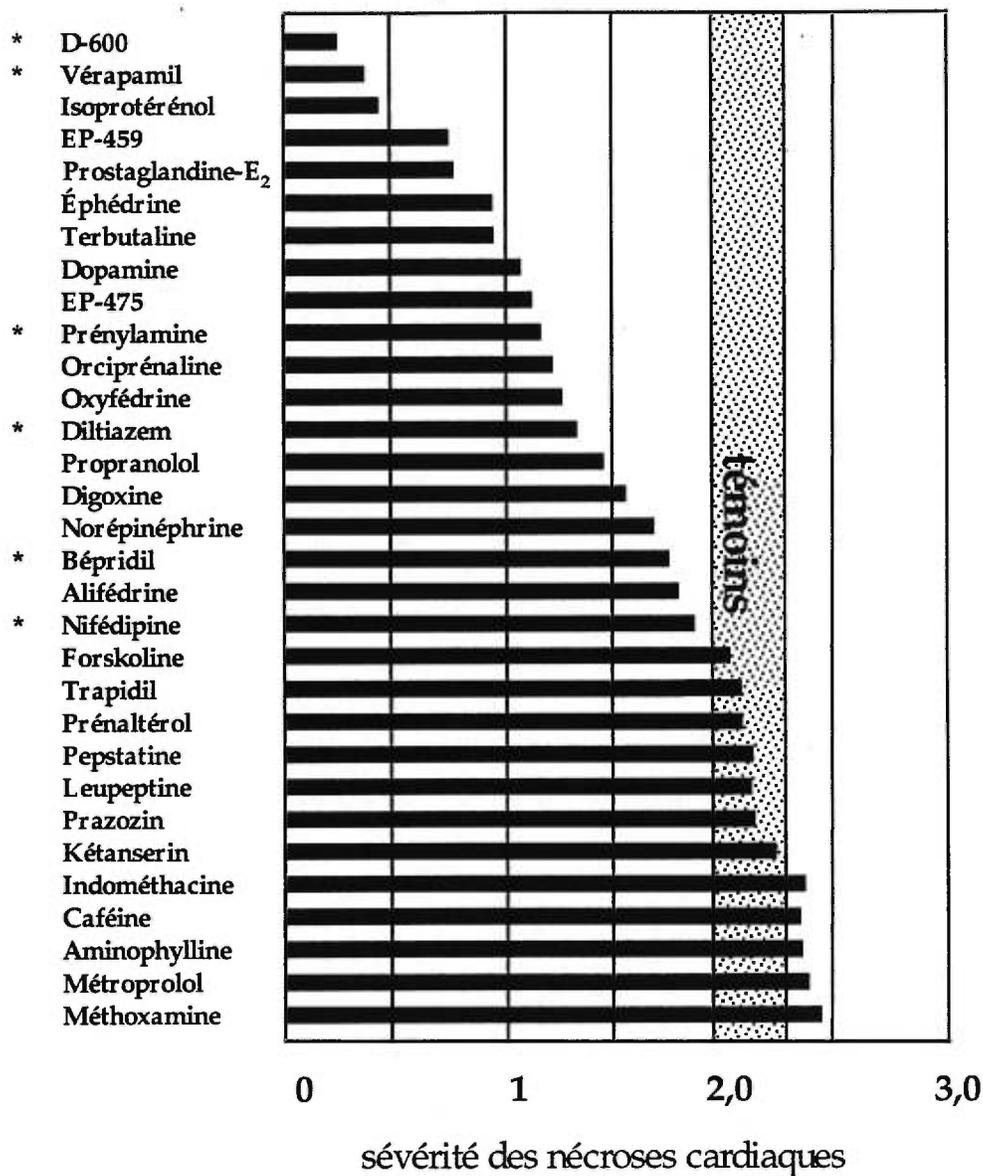
réponse lusitrope demeure inchangée (Antony et coll., 1992). Ces données appuient l'hypothèse que des changements dans les mécanismes régulateurs du calcium et de l'activité des myofilaments précèdent le développement de la phase de défaillance. Cette réduction de la contractilité cardiaque dès les premières phases de la cardiomyopathie pourrait être secondaire à une altération des mouvements calciques rapides entre les différents sites de stockage du calcium. Des altérations au niveau des protéines du cytosquelette (desmine, actine  $\alpha$ , titine) pourraient également être impliquées dans la détérioration de la contractilité cardiaque (Kawaguchi et coll., 1995). D'autres causes pourraient justifier les changements de contractilité, tels l'augmentation de l'activité sympathique (Angelakos et coll., 1973; Sole et coll., 1977), la diminution de l'oxydation de la chaîne longue des acides gras (Kelly, 1968) ou la baisse des réserves énergétiques (Fedelesova et coll., 1971).

La physiopathologie de la cardiomyopathie du hamster est complexe. Une atteinte multisystémique a été rapportée et aucune anomalie spécifique ne semble expliquer à elle seule la perte de l'homéostasie calcique observée dans la phase initiale de nécrose.

#### 1.4 Essais thérapeutiques dans la cardiomyopathie du hamster

Compte tenu de l'importance de la surcharge calcique dans le développement de la cardiomyopathie du hamster, on pourrait s'attendre à ce que seul les antagonistes du calcium préviennent les nécroses myocardiques de façon significative. Cependant, plusieurs essais thérapeutiques réalisés chez le hamster UM-X 7.1 démontrent la complexité des stratégies qui pourraient être mises à profit (figure 6). En effet, une réponse cardioprotectrice a été obtenue avec différents composés. Certaines substances adrénergiques (isoprotérénol, terbutaline éphédrine, dopamine), des activateurs des canaux  $K^+_{ATP}$  dépendant (cromakalim), des inhibiteurs des protéases (EP-459), des prostaglandines (prostaglandine- $E_2$ ) et des sels de magnésium sont dotés d'un effet cardioprotecteur (Olbrich et coll., 1992; Jasmin et coll., 1996; Jasmin et coll., 1987).

Encore aujourd'hui, on n'arrive pas à définir clairement le ou les mécanismes responsables de l'effet cardioprotecteur de ces substances. Mais, parmi ces médicaments, les effets



Tiré de *Jasmin et coll., 1987 (voir références).*

**Figure 6.** Effet de différents médicaments sur le développement des nécroses myocardiques du hamster UM-X 7.1 <sup>(1)</sup>. Zone verticale hachurée: sévérité moyenne des groupes témoins.

<sup>(1)</sup> Traitement de 30 jours initiés à 30 jours de vie.

\* = antagoniste du calcium

cardioprotecteurs les moins prévisibles sont sans doute ceux obtenus avec des amines sympathomimétiques. Sachant que ces dernières favorisent l'entrée du calcium dans le cardiocyte (Fleckenstein, 1977), il est difficile d'expliquer leur potentiel cardioprotecteur dans un modèle où la surcharge calcique est présente. Est-ce l'aspect vasoactif ou le principe d'économie d'énergie associé à ces substances qui expliquerait leur effet cardioprotecteur? Cette question demeure sans réponse à l'heure actuelle.

L'activation métabolique des canaux potassiques  $K^+_{ATP}$  dépendant a elle aussi permis de prévenir l'expression des nécroses myocardiques. Cette activation provoquerait un raccourcissement du potentiel d'action par une diminution du temps de repolarisation. Les cardiocytes étant hyperpolarisés plus rapidement, on préviendrait l'entrée de calcium dans la cellule et on augmenterait la liaison du calcium au niveau des sites membranaires internes (Carmeliet, 1989). Or, l'activation des canaux potassiques  $K^+_{ATP}$  dépendant préviendrait la surcharge calcique et favoriserait une économie d'énergie expliquant ainsi le potentiel cardioprotecteur du cromakalim. (Escande et coll., 1992). Pour sa part, l'effet cardioprotecteur d'un inhibiteur des protéases (EP-459) (Jasmin

et coll., 1987) pourrait s'expliquer par une réduction de l'activité d'une enzyme avec une activité dépendante du calcium. Des études récentes démontrent en effet que cet inhibiteur des protéases (EP-459) exerce une activité vis-à-vis des protéines dépendantes du calcium (Grinde, 1982; Atsma et coll., 1995). Cette explication quant à son effet cardioprotecteur demeure cependant hypothétique puisque le processus dégénératif directement associé à l'activation des protéases endogènes n'a pas encore été élucidé. Certaines prostaglandines ont également démontré des effets bénéfiques cardioprotecteurs (Jasmin et coll., 1987). Ces composés pourraient, en empruntant la voie de l'AMP<sub>c</sub>, permettre une vasodilatation plus importante. Enfin, les sels de magnésium, ont également procuré un effet bénéfique dans la cardiomyopathie du hamster (Olbrich et coll., 1992). Il semble que l'augmentation du magnésium améliore le fonctionnement de la mitochondrie (Wrogemann et coll., 1978). Cette observation expliquerait ainsi l'effet bénéfique des sels de magnésium sur l'évolution des nécroses cardiaques.

Bref, les médicaments énumérés précédemment préviennent de façon significative l'expression des nécroses cardiaques. Les médicaments

cardioprotecteurs appartiennent à des classes pharmacologiques différentes, ce qui laisse supposer que les mécanismes impliqués sont nombreux.

## **1.5 Antagonistes des canaux calciques et cardioprotection dans la cardiomyopathie du hamster**

L'importance des nécroses et celle de la surcharge calcique observées chez le hamster UM-X 7.1 font en sorte que ce modèle est indiqué pour déterminer les effets cardioprotecteurs des antagonistes du calcium. Plusieurs études ont traité des bénéfiques potentiels associés à l'utilisation des antagonistes du calcium dans cette pathologie. Dans la phase de nécrose, des controverses ont été soulevées quant aux bénéfices qu'ils procurent (figure 6, page 33). Certains des antagonistes du calcium se sont avérés d'excellents cardioprotecteurs (D-600, vérapamil) (Jasmin et coll., 1973; Factor et coll., 1988), d'autres tel le diltiazem (Bhattacharya et coll., 1982; Jasmin et coll., 1987) ont démontré peu d'effet cardioprotecteur (diltiazem) et d'autres tels la nifédipine et le bépridil (Jasmin et coll., 1987; Kundel et coll., 1987) n'ont eu aucun effet cardioprotecteur. Ces différences semblent liées à la diversité des structures chimiques de ces composés et soulève l'hypothèse que plus d'un site serait impliqué dans la manifestation du potentiel cardioprotecteur.

## 1.6 Mibéfradil et son potentiel cardioprotecteur

Les canaux calciques de type T ont été décrits il y a déjà quelques années mais leur rôle demeure ambigu (Vassort et coll., 1994) et le bénéfice potentiel de leur inhibition demeure hypothétique. Ces canaux possèdent une structure similaire à celle des canaux calciques de type L. Au même titre que les canaux L, on les retrouve dans plusieurs tissus dont le cœur et le muscle lisse vasculaire. Mais, contrairement aux canaux calciques de type L, la densité des canaux calcique de type T est moindre dans les cardiocytes (Bean, 1989; Balke et coll., 1992). Ceci suggère que l'entrée du calcium via les canaux calciques de type T n'est pas essentielle pour la contraction cardiaque (Bean, 1989). Sachant cependant que l'on peut obtenir un effet vasodilatateur en inhibant le canal calcique T avec le mibéfradil, on peut suggérer que ces canaux aient un rôle significatif dans la contraction du muscle lisse vasculaire (Schmitt et coll., 1992; Mirsha et coll., 1994<sup>b</sup>).

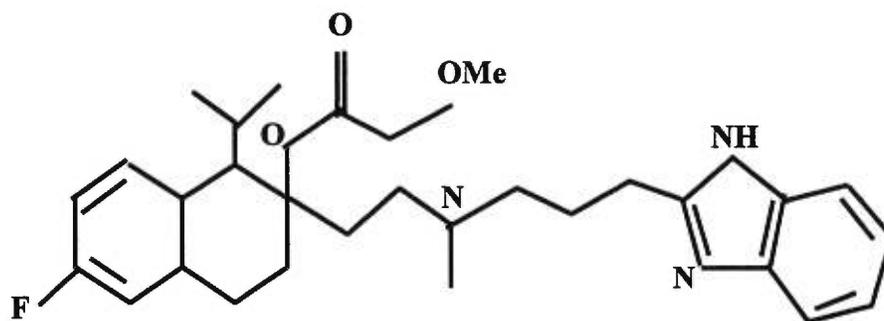
L'activation et l'inactivation des canaux calciques de type T diffèrent également. Ces derniers se ferment et deviennent inactifs plus rapidement que les canaux de type L d'où leur appellation: canaux T

(transient) et canaux L (long-lasting) (Tsien et coll., 1990; Katz, 1996). Ainsi, une légère augmentation du potentiel de repos suffit pour générer un courant calcique via les canaux de type T. Cependant, la dépolarisation du canal calcique T dans la cellule cardiaque est difficile à identifier puisqu'elle se fait de façon simultanée avec la dépolarisation du canal  $\text{Na}^+$  (Arreola et coll., 1991). Ceci suggère qu'en plus de leur rareté, leur ouverture ne joue pas un rôle important dans la genèse d'un potentiel d'action. Par contre, une faible augmentation du potentiel membranaire des cellules du nœud sinusal active les canaux calciques de type T et leur confère un rôle potentiel dans l'activité pacemaker de ces cellules (Hagiwara et coll., 1988; Zhou et coll., 1994). En plus de l'importance des canaux calciques de type T dans les phénomènes de conduction cardiaque, on leur attribue d'autres rôles. Ainsi, on a reconnu que les canaux calciques de type T favorisent le développement et la croissance cellulaire. En effet, on retrouve ces canaux en grand nombre durant les périodes de croissance rapide par exemple dans le cœur fœtal (Carafoli, 1991). Par ailleurs, leur activité diminue de façon importante à l'âge adulte (Beam et coll., 1988; Gonoï et coll., 1988; Xu et coll., 1992). D'autres résultats soulignent que l'expression des canaux calciques de type T est

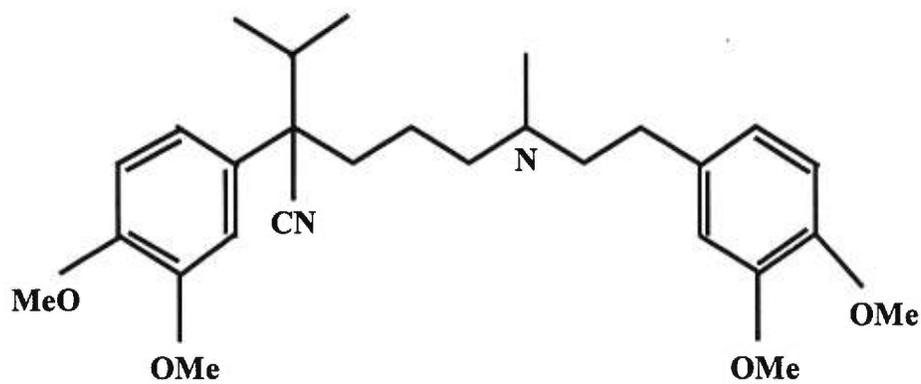
accentuée dans des conditions pathologiques tels que l'hypertrophie cardiaque (Nuss et coll., 1993) et la cardiomyopathie (Sen et coll., 1994). Ces dernières observations suggèrent que les canaux calciques de type T pourraient jouer un rôle dans l'étiologie de la cardiomyopathie d'où l'intérêt potentiel de l'utilisation du mibéfradil.

Le mibéfradil est un nouvel antagoniste des canaux calciques de type T et L et est doté d'une certaine sélectivité pour les canaux T (Mishra et al, 1994; Mehrke et al, 1994). Il appartient à une nouvelle classe d'antagonistes du calcium: les dérivés substitués benzo-midazolil. Le mibéfradil possède une bonne biodisponibilité, une longue durée d'action, un effet hypotenseur soutenu et il n'induit pas de tachycardie réflexe (Noll et coll., 1998). Sa structure chimique est similaire à celle du vérapamil (figure 7) et il interagit avec le même site de liaison que ce dernier (Rutledge et coll., 1995). Cependant, d'autres ont proposé qu'il se lierait sur un site distinct de celui du vérapamil, ce qui expliquerait ainsi la différence entre leur profil pharmacologique et cardiovasculaire (Ratner et coll., 1996). Des données expérimentales indiquent que le mibéfradil est doté de propriétés vasodilatatrices (Bernink et coll., 1996 ; Oparil et coll., 1997) avec un effet marqué sur

**mibéfradil**



**vérapamil**



**Figure 7. Structures chimiques**

les artères coronariennes (Osterrieder et coll., 1989; Clozel, 1989; Bian et coll., 1993; Orito et coll., 1993; Karila-Cohen et coll., 1996). Cette sélectivité vasculaire le différencie du vérapamil (Osterrieder et coll., 1989; Fang et coll., 1991). Mais comment expliquer cette sélectivité vasculaire et l'absence d'effet inotrope négatif avec le mibéfradil? Fang et coll. (1991) suggèrent que l'action voltage-dépendante du mibéfradil expliquerait cette absence d'effet inotrope négatif. En effet, le mibéfradil est environ 50 fois moins efficace à un potentiel membranaire de  $-80$  mV qu'à un potentiel de  $-50$  mV (Fang et coll., 1991). Sachant que le potentiel membranaire du muscle lisse vasculaire se situe entre  $-40$  et  $-55$  mV (Nelson et coll., 1990) et que le potentiel membranaire du myocarde est de  $-80$  mV (Fang et coll., 1991), on comprend aisément le fait que le mibéfradil inhibe davantage les canaux calciques de type T du muscle lisse vasculaire (Orito et coll., 1993). Cette action voltage-dépendante du mibéfradil pourrait aussi expliquer son action antiarythmique (Billman et coll., 1996). En effet, le potentiel membranaire de repos des cellules conductrices cardiaques est plus positif que le potentiel membranaire de repos des cellules ventriculaires (Orito et coll., 1993).

Les propriétés cardioprotectrices du mibéfradil ont été rapportées dans des modèles aigus d'ischémie-reperfusion. Roux et coll. (1996) ont démontré, dans un modèle de sténose qui mime l'angine instable, que le mibéfradil exerce un effet anti-ischémique significatif sans effet inotrope négatif. Bien que l'inhibition des canaux calciques de type T ne semble pas être directement impliquée dans cet effet anti-ischémique, ils attribuent l'effet cardioprotecteur du mibéfradil à un effet bradycardisant. Dans un autre modèle où l'on a diminué la pression de perfusion coronarienne pour mimer l'angine instable, Clozel et coll. (1989) rapportent que contrairement au mibéfradil, le vérapamil n'a pas d'effet cardioprotecteur à faible pression de perfusion. Ils attribuent l'effet cardioprotecteur du mibéfradil à sa capacité à préserver les réserves énergétiques (absence d'effet inotrope négatif) lors d'une baisse de la pression de perfusion coronarienne. Si la diminution de la pression de perfusion induite par le vasospasme est importante dans l'initiation de la cardiomyopathie du hamster, l'effet cardioprotecteur du mibéfradil serait encore plus important que celui du vérapamil. D'où l'intérêt de vérifier l'effet cardioprotecteur du mibéfradil dans la cardiomyopathie du hamster.

Bien que les effets cardioprotecteurs du mibéfradil soient démontrés dans des modèles ischémiques aigus, aucune étude ne s'est attardée à décrire son potentiel cardioprotecteur dans la cardiomyopathie. Certaines formes de cette pathologie pourraient bénéficier de l'introduction du mibéfradil. En effet, l'augmentation de la densité du courant calcique T dans la cardiomyopathie du hamster pourrait constituer un des facteurs étiologiques importants de la surcharge calcique. De plus, des dysfonctions coronariennes contribuent à l'expression de la pathologie (Factor et coll., 1982). Compte tenu des effets du mibéfradil, ces anomalies pourraient être atténuées.

## 1.7 But du projet de recherche

Le but de notre étude est d'évaluer le potentiel cardioprotecteur du mibéfradil dans la phase de nécrose de la cardiomyopathie du hamster UM-X 7.1. Bien que le vérapamil soit jusqu'à maintenant, le médicament cardioprotecteur par excellence dans le modèle à l'étude, nous cherchons une alternative autant, sinon plus efficace, puisque les effets chronotropes et inotropes négatifs du vérapamil limitent son utilisation en clinique (Elkayam et coll., 1990; Elkayam et coll., 1993).

Compte tenu des propriétés pharmacologiques du mibéfradil, de l'augmentation de la densité du courant calcique T démontré dans la cardiomyopathie du hamster, de la similarité de sa structure chimique avec celle du vérapamil et de son profil pharmacologique et cardiovasculaire favorable, nous émettons l'hypothèse que le mibéfradil exerce un effet cardioprotecteur comparable sinon supérieur à celui du vérapamil.

Afin de vérifier cette hypothèse, des hamsters UM-X 7.1 de 30 jours (phase pré-nécrotique) sont traités quotidiennement avec le mibéfradil pour une période de 4 et 6 semaines avec des doses de 0.5 à 8 mg/kg/jour. Pour fin de comparaison, les effets du vérapamil (20 mg/kg/jour) sont évalués. À la fin du traitement, les animaux sont sacrifiés, des coupes histologiques du tissu myocardique (cœur) et du tissu squelettique (langue) sont obtenues. Une évaluation histologique des foyers nécrotiques (échelle de 0 à 3 selon la sévérité) est réalisée après une coloration à l'hématoxyline-phloxine-safran. Cette étude permettra de déterminer le potentiel cardioprotecteur du mibéfradil dans le modèle de hamster UM-X 7.1 et de comparer son efficacité avec celle du vérapamil.

## **CHAPITRE II**

**Cardioprotective efficacy of verapamil and mibefradil  
in young UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters**

**France Paquette, B. Sc., Gaëtan Jasmin, MD,Ph.D. and Louis  
Dumont, Ph.D.**

**Départements de Pharmacologie et de Pathologie,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
Montréal, QC, Canada**

**Running title: mibefradil and cardioprotection**

**This work was supported by a grant from La Fondation  
Québécoise des Maladies du Coeur (FQMC).**

**Address all correspondence to:**

**Louis Dumont, Ph.D.**

**Département de Pharmacologie**

**Faculté de Médecine**

**Université de Montréal**

**CP 6128, Succursale Centre-ville**

**Montréal, QC, Canada H3C 3J7**

**Tel (514) 343-6341**

**Fax (514) 343-2291**

**E-mail: [louis.dumont@umontreal.ca](mailto:louis.dumont@umontreal.ca)**

**ABSTRACT**

Since calcium overload and increased in T-type calcium channel activity have been observed in the cardiomyopathic (CM) hamster, we hypothesized that mibefradil (Ro 40-5967), a new T- and L-type calcium channel blocker, may exert significant cardioprotection in the early phase of the disease. Young (30-day-old) CM hamsters of the UM-X7.1 subline were treated with mibefradil or verapamil for 4 to 6 weeks. Mibefradil doses were in the range of 0.5 to 8 mg/kg/day while verapamil was given at a dose of 5-10 mg/kg/day, both drugs being injected twice daily (sc and ip alternatively). At the end of the treatment period, myocardial and skeletal muscle (tongue) were harvested and processed for assessment of necrotic changes and calcification. In hearts from control CM hamsters, numerous necrotic and calcified foci were observed. These myocardial necrosis markers were not attenuated by mibefradil in the dose range studied whereas verapamil significantly reduced their severity. The dystrophic process in skeletal muscle (tongue) was not inhibited by mibefradil or verapamil. These results suggest that mechanisms other than inhibition of T- and L-type calcium channels are related to the cardioprotection observed in the presence of verapamil. A specific action on the sarcoplasmic reticulum (ryanodine-sensitive calcium channel) or the mitochondria may explain the efficacy of phenylalkylamines (verapamil) in this condition.

**Key words:** mibefradil, verapamil, hamster, cardiomyopathy, cardioprotection

## INTRODUCTION

Mibefradil (Ro 40-5967) is a new T- and L-type calcium channel blocker that possesses strong coronary dilator properties [1-4] but is devoid of negative cardiac effects, even in the presence of reduced left ventricular function [5,6]. In addition to its vasodilator properties, mibefradil has been shown to exert significant anti-ischemic actions [7,8]. Other protective actions of mibefradil include significant reduction of cardiac and vascular hypertrophy [9,10] as well as inhibition of the proliferation and migration of smooth muscle cells [11].

Although the cardioprotective properties of mibefradil have been demonstrated in acute ischemic models, no study has focused on its efficacy in chronic myocardial disease. Since an increase in myocardial T-channel activity has been reported in the cardiomyopathic (CM) hamster [12] and calcium overload and coronary vasospasms are considered key features of expression of the disease in the hamster [13,14], we hypothesized that mibefradil could exert significant cardioprotection in this condition.

In the present study, we evaluated the effects of chronic administration of various doses of mibefradil on the course of the heart necrotizing process in

30-day-old UM-X7.1 CM hamsters [15]. For comparison, the cardioprotective effects of verapamil were investigated.

## MATERIALS AND METHODS

Male and female CM hamsters of the UM-X7.1 subline, aged  $30 \pm 1$  days, were used in this study. They were cared for in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993) and housed under identical conditions ( $24^{\circ}\text{C}$  and 12:12-hour light/dark cycle) with free access to Purina laboratory chow and tap water. Several groups of CM hamsters were studied. In the first protocol, they were treated for 4 weeks with mibefradil in a dose range of 0.5 to 5 mg/kg per day. Verapamil was used at a dose level of 5-10 mg/kg per day. Untreated CM hamsters were studied in parallel with the treated groups. In the second protocol, the highest doses of mibefradil, i.e. 5 and 8 mg/kg per day, were given daily for 6 weeks. Preliminary studies were conducted in groups of 5 CM hamsters treated with mibefradil or verapamil to determine their tolerance to these medications. With mibefradil 8 mg/kg and verapamil 10 mg/kg, given daily, no visible untoward or cumulative effect was noted. The animals were weighed once weekly.

Following euthanasia with an overdose of sodium pentobarbital and thoracotomy, the heart was excised and cleaned of excess blood. An overall quantification of disseminated necrotic myocardial foci visible to the naked eye was performed. The hearts were blotted, weighed and processed together

with the tongue for routine histology. Quantitative assessment of disseminated lesions throughout the heart muscle was undertaken by sectioning the ventricles at different levels. Serial paraffin 4- $\mu$  sections were stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). The Von Kossa silver staining method was used to estimate myocardial calcification changes [16]. All tissue samples were processed and evaluated in a similar manner. Microscopic readings of necrotic foci were made following a double-blind procedure using an arbitrary scale of 0-3 for quantification. A maximum score of 3 indicates that damage exceeds 50% of the entire myocardium, whereas a score of 2 corresponds to moderate changes, a score of 1 represents mild changes, and 0, no damage [15].

**Drugs.** Mibefradil, a generous gift from Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland), and verapamil, kindly supplied by Knoll E.G. (Ludwigshaffen, Germany), were dissolved in distilled water. All solutions were kept refrigerated. To reduce cutaneous irritation, daily administration was alternated: ip in the morning and sc in the evening. Fresh solutions were prepared weekly to adjust the dose to body weight changes.

**Statistics.** The data are expressed as means  $\pm$  SEM. One way analysis of variance and the Mann-Whitney U-test, a non-parametric equivalent of the unpaired t-test, were used to determine the statistical significance of the microscopic readings. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

In all CM hamsters, mibefradil at a daily dose of 5 - 8 mg/kg and verapamil 20 mg/kg daily were both well tolerated. In the mibefradil-treated group, only 1 animal was lost (ileite), whereas 2 out of 21 animals treated with verapamil were lost for similar reasons. At autopsy, no signs of hepatomegaly, renal necrosis or ascites were observed. Table 1 illustrates the body weight changes and heart weight at the end of the treatment period. Except for a slight reduction with verapamil, weekly weight gain was similar in treated and untreated animals.

Upon macroscopic examination, mibefradil-treated hearts showed most of the characteristic white streaks seen on hearts from vehicle-treated CM hamsters while in the verapamil-treated group, these white streaks were less abundant. Under the microscope, necrotic foci were visible mainly in the interventricular septum as well as in the left ventricular free wall (Figure 1). The degenerative process was characterized by coagulation necrosis with disseminated calcification foci. The subendocardium also exhibited some degree of myolysis. Necrotic alterations were observed in all control hearts under study (incidence = 100%). Typical findings of mibefradil and verapamil treatment are exemplified in Figure 2: mibefradil did not prevent the development of calcific changes in the myocardium while in the presence

of verapamil these degenerative changes were not observed. Mibefradil treatment for 4 weeks did not offer significant cardioprotection in CM hamsters despite the increased dosage (Figure 3). Furthermore, extending the treatment period to 6 weeks did not bring any significant benefits. Verapamil treatment, on the other hand, was very efficient in preventing necrotic changes as well as calcification of the myocardium and their incidence (<10%). As far as skeletal muscle (tongue) changes were concerned, neither mibefradil nor verapamil treatment improved the necrotic and calcification changes (Figure 4).

## DISCUSSION

Young CM hamsters of the UM-X7.1 subline were used to compare the cardioprotective effects of chronic treatment with mibefradil, a new T- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, and verapamil, a L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, in a model of cardiomyopathy associated with calcium overload. In all untreated CM hamsters, necrotic and calcification foci were observed in the heart and skeletal muscle. Four weeks of treatment with verapamil resulted in almost complete abrogation of myocardial necrosis. On the contrary, mibefradil, despite an increase in dosage, did not result in significant attenuation of the severity of the necrotic changes. A further increment of the dosage and treatment period with mibefradil was not beneficial. The results suggest that mechanisms other than inhibition of T- and L-type calcium channels are involved in the cardioprotection observed with verapamil.

Since the heart's involvement in hamster polymyopathy is prominent in nature, this animal has become widely used as a model for research on primary cardiomyopathy. In addition to skeletal muscle dystrophy starting as early as the first week of life, these animals display progressive cardiomyopathy which is characterized by focal myocardial necrotic lesions beginning after the 30th day with fully developed lesions occurring around the 60th day of age concomitantly with calcium overload [17-19]. Apart from

biochemical abnormalities and genetic defects of membrane structure and function, abnormalities of the sympathetic nervous system and microvascular spasms may contribute to progression of the disease [13, 20,21,22). In the UM-X7.1 line (a subline of BIO 14.6) developed at the University of Montreal in the early 70's, myocardial lesions lead to cardiac hypertrophy and the animals subsequently die of circulatory failure. The average life span of animals from the UM-X7.1 subline is 250 days [15].

Calcium overload and the extensive necrosis as well as calcification observed in the myocardium of the CM hamster make this model appropriate to study the cardioprotective effects of drugs. Several investigations have reported the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers in the early necrotizing phase of the disease although the results are controversial. Nifedipine and bepridil were completely inactive in preventing necrosis or calcium accumulation [14, 23], diltiazem exerted a slight beneficial effect [24,25] while the phenylalkylamines gallopamil and verapamil consistently reduced the severity and incidence of myocardial necrotic foci [26,27]. The difference in the cardioprotective efficacy of calcium channel blockers appears to be related to the heterogeneity of their chemical structures, suggesting that several mechanisms may be involved.

We hypothesized that mibefradil may afford significant cardioprotection in the early stage of hamster cardiomyopathy for the following reasons: (1) this molecule has been shown to interact preferentially with the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel [28,29] and among the multiple abnormalities leading to increased cell  $\text{Ca}^{2+}$  in the heart of CM hamsters, heightened T-type  $\text{Ca}^{2+}$  activity has been reported [12]; (2) the progression of cardiac damage observed in CM hamsters is associated with microvascular spasm-induced ischemia and reperfusion [13,30,31], a condition that may be prevented by the coronary dilator properties of mibefradil and its capacity to redistribute coronary blood flow toward the endocardium [3,4,8,32,33]; (3) it has been demonstrated that mibefradil exerts significant anti-ischemic effects through a bradycardic and antiarrhythmic action [7,34], which may be beneficial in the CM hamster [35,36]; and (4) mibefradil, a benzimidazolyl-substituted tetraline derivative, exhibits some structural resemblance and shares some binding-site characteristics with verapamil [37], the latter being considered the most efficient cardioprotective agent in the early developmental phase of hamster cardiomyopathy [26, 27].

This study is the first to report the effects of mibefradil in a model of cardiomyopathy. The results indicate that mibefradil did not exert any

beneficial action in the heart of young UM-X7.1 CM hamsters despite an increase in dosage or in the duration of treatment. Verapamil, as expected, significantly reduced the severity and incidence of myocardial necrosis and calcification in this model. Several pharmacokinetic and pharmacodynamic factors may explain these differences in efficacy. Mibefradil up to 5-8 mg/kg per day was given to the animals. To verify its pharmacokinetic profile, plasma concentrations were measured in a few hamsters: plasma mibefradil levels were in the range of  $101 \pm 17$  ng/ml which is close to that reported in clinical studies using a similar daily dosage [1,38]. In our protocol, mibefradil was given twice daily which would appear to be adequate to maintain therapeutic concentrations since its plasma half-life is in the range of 17 to 25 hours [38]. Therefore, neither inadequate dosage nor low plasma levels can be cited to explain its lack of efficacy in the present study.

As mentioned previously, mibefradil interacts preferentially with T-type, low-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. In fact, its inhibitory action on these channels is observed at concentrations 10 times less than those required to suppress L-type, high-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels [28,29]. The lack of efficacy of mibefradil observed in the present study suggests that an inhibitory action on T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels is not mandatory for significant

cardioprotection. The observation that dihydropyridines (nifedipine), benzothiazepines (diltiazem), phenylalkylamines (verapamil) and mibefradil all interact with the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel and dilate the coronary bed while only phenylalkylamines are cardioprotective in this model suggests that inhibition of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel and coronary dilation are not key factors in the difference in cardioprotection. One might argue that the cardioprotective effects of verapamil might derive from its intrinsic negative inotropic action. This could hardly be the case since the doses used in the present study, i.e. 20 mg/kg per day, is in the therapeutic range for this calcium channel blocker [39].

Since all the above-mentioned factors do not provide an explanation for the difference in cardioprotection among  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers, the hypothesis that the protective properties of phenylalkylamines are related to an intracellular site of action is attractive. Studies have suggested that the diminished myocardial tolerance to  $\text{Ca}^{2+}$  stress in CM hamsters might be related to defective mitochondrial and sarcoplasmic reticulum function [21,40-42]. Furthermore, recent data indicate that verapamil modulates either mitochondrial or sarcoplasmic reticulum function [43,44] and improves the

defective sarcoplasmic reticulum release channel in the CM Syrian hamster [45].

There are some limitations to this study. Assessment of myocardial and muscular necrosis as well as tissue calcification is semiquantitative. Although not performed in this study, previous studies have demonstrated that verapamil can significantly reduce calcium content in myocardial and skeletal muscle tissue of cardiomyopathic hamsters [14,23]. It is unlikely that difference in hemodynamic effects i.e. reduction in heart rate or decrease arterial pressure explains the different results with verapamil and mibefradil. Previous studies have shown that heart rate is not affected and arterial pressure is reduced to a similar extent with verapamil and mibefradil using concentrations as those of the present work [8,36,46]. Although no specifically address in this work, changes in coronary reactivity may participate in the different cardioprotection afforded by the calcium antagonists utilized. However data from our laboratory suggest that coronary reactivity to verapamil and mibefradil is similar; in isolated hearts from this model although older animals were used the computed, EC<sub>50</sub> for coronary dilatation = 117 nM for verapamil versus 36 nM for mibefradil (p=ns) and maximal increase in coronary flow was 4.6 ml per min for verapamil versus 5.3 ml per min for mibefradil (p=ns).

In conclusion, 4 weeks of treatment with verapamil led to virtually complete abrogation of the necrotic changes observed in the hearts of young CM hamsters of the UM-X7.1 subline. In contrast, mibefradil, a new T- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, despite its increased dosage, did not result in significant attenuation of myocardial necrosis. These results suggest that mechanisms other than inhibition of T- and L-type calcium channels are related to the cardioprotection observed in the presence of verapamil. A specific action on the sarcoplasmic reticulum (ryanodine sensitive calcium channel) or the mitochondria may explain the efficacy of phenylalkylamines (verapamil) in this condition.

## REFERENCES

1. Clozel JP, Osterrieder W, Kleinbloesen CH, et al. Ro 40-5967: a new nondihydropyridine calcium antagonist. *Cardiovasc Drugs Rev* 1991;9:4-17.
2. Osterrieder W, Holck M. In vitro pharmacologic profile of Ro 40-5967, a novel  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker with potent vasodilator but weak inotropic action. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:754-759.
3. Orito K, Satoh K, Taira N. Cardiovascular profile of Ro 40-5967, a new non-dihydropyridine calcium antagonist delineated in isolated blood-perfused dog hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22:293-299.
4. Karila-Cohen D, Dubois-Randé JL, Giudicelli JF, Berdeaux A. Effects of mibefradil on large and small coronary arteries in conscious dogs: role of the vascular endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:271-277.
5. Clozel JP, Véniant M, Osterrieder W. The structurally novel  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker Ro 40-5967, which binds to the [ $^3\text{H}$ ] desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990;4:731-736.
6. Véniant M, Clozel JP, Hess P, Wolfgang R. Ro 40-5967, in contrast to diltiazem, does not reduce left ventricular contractility in rats with chronic myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:277-280.

7. Roux S, Bühler M, Clozel JP. Mechanism of the antiischemic effect of mibefradil, a selective T calcium channel blocker in dogs: comparison with amlodipine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:132-139.
8. Clozel JP, Banken L, Osterrieder W. Effects of Ro 40-5967, a novel calcium antagonist, on myocardial function during ischemia induced by lowering coronary perfusion pressure in dogs: comparison with verapamil. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;14:713-721.
9. Li J-S, Schiffrin EL. Effect of calcium blockade or angiotensin-converting enzyme inhibition on structure of coronary, renal, and other small arteries in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:68-74.
10. Vacher E, Richer C, Fornes P, Clozel JP, Giudicelli JF. Mibefradil, a selective calcium T-channel blocker, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:686-694.
11. Schmitt R, Clozel JP, Iberg I, Bühler FR. Prevention of neointima formation by mibefradil after vascular injury in rats: comparison with ACE inhibition. *Cardiovasc Drug Ther* 1996;10:101-105.
12. Sen L, Smith TW. T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts. *Circ Res* 1994;75:149-155.

13. Factor SM, Minase T, Cho S, Dominitz R, Sonnenblick EH. Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: a preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation* 1982;66:342-354.
14. Jasmin G, Proschek L. Calcium and myocardial cell injury. An appraisal in the cardiomyopathic hamster. *Can J Physiol Pharmacol* 1984;62:891-898.
15. Jasmin G, Proschek L. Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the Syrian hamster. I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X7.1 line. *Muscle and Nerve* 1982;5:20-25.
16. Mallory FB. Von Kossa's method for calcium. In: *Pathological Techniques*. New York: Hafner, 1961:114-125.
17. Jasmin G, Eu HY. Cardiomyopathy of hamster dystrophy. *Ann NY Acad Sci* 1979;317:46-58.
18. Bajusz E. Hereditary cardiomyopathy: a new disease model. *Am Heart J* 1969;77:686-696.
19. Hamburger F. Myopathy of hamster dystrophy: history and morphological aspects. *Ann NY Acad Sci* 1979;317:2-17.
20. Roberds SL, Ervasti JM, Anderson RD, Ohlendieck K, Kahl SD, Zoloto D. Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J Biol Chem* 1993;268:11496-11499.

21. Hano O, Lakatta EG. Diminished tolerance of prehypertrophic cardiomyopathic Syrian hamster hearts to  $\text{Ca}^{2+}$  stress. *Circ Res* 1991;69:123-133.
22. Sole MJ, Lo C-M, Laird CW, Sonnenblick EH, Wurtman RJ. Norepinephrine turnover in the heart and spleen of the cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ Res* 37; 855-862, 1975.
23. Kundel B, Hofmann U, Mutschler M. Comparison of verapamil and bepridil in the therapy of familiar cardiomyopathy of the Syrian hamster. *Z. Kardiol* 1987;76 (suppl 3):159-163.
24. Bhattacharya YH, Palmieri EA, Bertorini UE, Nuting DF. The effects of diltiazem on dystrophic hamsters. *Muscle and Nerve* 1982;5:73-78.
25. Jasmin G, Proschek L. Pathogenesis of the hamster hereditary cardiomyopathy: a pharmacologic appraisal. In: *Pathogenesis of Myocarditis and Cardiomyopathy*. Kawai C, Abelmann WH, Eds. Tokyo: University of Tokyo Press, 1987:79-89.
26. Factor SM, Cho S, Scheuer J, Sonnenblick EH, Malhotra A. Prevention of hereditary cardiomyopathy in the Syrian hamster with chronic verapamil therapy. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:1599-1604.
27. Jasmin G, Proschek L. Comparative effects of calcium antagonists and of inotropic agents on the development of hereditary cardiomyopathy in the

- hamster. In: Treatment with Gallopamil Bender F, Meesmann W Eds. Darmstadt: Steinkoff Verlag, 1989:13-23.
28. Mehrke G, Zong XG, Flockerzi V, Hofmann F. The  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:1483-1488.
29. Mirsha SK, Hermsmeyer K. Selective inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Ro 40-5967. *Circ Res* 1994;75:144-148.
30. Figulla HR, Vetterlein F, Glaubitz M, Kreuzer H. Inhomogenous capillary flow and its prevention by verapamil and hydralazine in the cardiomyopathic Syrian hamster. *Circulation* 1987;76:208-216.
31. Conway RS, Natelson BH, Chen WH, Ting W. Enhanced coronary vasoconstriction in the Syrian myopathic hamster supports the microvascular spasm hypothesis. *Cardiovasc Res* 1994;28:320-324.
32. K ng CF, Tschudi MR, Noll G, Clozel JP, Lüscher TF. Differential effects of the calcium antagonist mibefradil in epicardial and intramyocardial coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:312-318.
33. Mishra SK, Hermsmeyer K. Inhibition of signal  $\text{Ca}^{++}$  in dog coronary arterial vascular muscle cells by Ro 40-5967. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24:1-7.

34. Billman GE, Hamlin RL. The effects of mibefradil, a novel calcium channel antagonist, on ventricular arrhythmias induced by myocardial ischemia and programmed electrical stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1517-1526.
35. Hano O, Mitsuoka T, Matsumoto Y, et al. Arrhythmogenic properties of the ventricular myocardium in the cardiomyopathic Syrian hamster, BIO 14.6 strain. *Cardiovasc Res* 1991;25:49-57.
36. Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Chronic calcium channel blockade prevents the progression of myocardial contractile and electrical dysfunction in the cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ Res* 1990;67:1381-1393.
37. Rathner EI, Bochkov VN, Tkachuk VA. Comparison of binding of  $^3\text{H}$ -desmethoxyverapamil and  $^3\text{H}$ -mibefradil in vascular smooth muscle and heart membranes. *Drug Res* 1996;46:953-955.
38. Abernethy DR. Pharmacologic and pharmacokinetic profile of mibefradil, a T- and L-type calcium channel antagonist. *Am J Cardiol* 1997;80:4C-11C.
39. Kelly JG, O'Malley K. Clinical pharmacokinetics of calcium antagonists. An update. *Clin Pharmacokin* 1992;22:416-433.

40. Proschek L, Jasmin G. Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the Syrian hamster. II. Development of heart necrotic changes in relation to defective mitochondrial function. *Muscle and Nerve* 1982;5:26-32.
41. Saap JL, Howlett SE. Density of ryanodine receptors is increased in sarcoplasmic reticulum from prehypertrophic cardiomyopathic hamster heart. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:325-334.
42. Ueyama T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, et al. Alterations in cardiac SR Ca<sup>2+</sup> channels during development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *Am J Physiol* 1998;274:H1-H7.
43. Zerning G. Photoaffinity labeling of the partially purified mitochondrial phenylalkylamine calcium antagonist receptor. *Mol Pharmacol* 1992;42:1010-1013.
44. Valdivia HH, Valdivia C, Ma J, Coronado R. Direct binding of verapamil to the ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. *Biophys J* 1990;58:471-481.
45. Finkel MS, Shen L, Oddis CV, Romeo R. Verapamil regulation of the defective SR release channel in the cardiomyopathic Syrian hamster. *Life Sci* 1993;52:1109-1119.
46. Hefti F, Clozel J-P, Osterrieder W. Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist (1S,2S-2-[2-[[3-(2-benzimidazolyl) propyl]

methylamino] ethyl] -6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl methoxyacetate dihydrochloride in the rat models. Comparison with verapamil. Drug Res 1990;40:417-421.

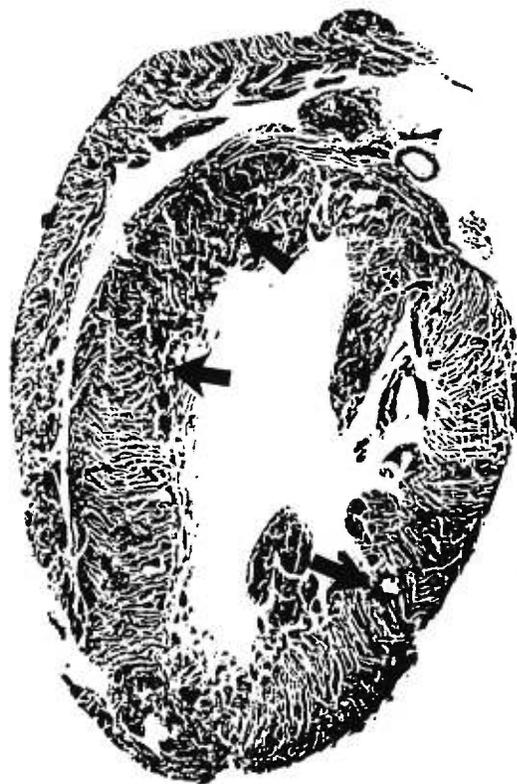
**Table 1. Body weight gain and heart weight in CM hamsters exposed to mibefradil and verapamil**

<b>Treatment duration</b>	<b>Treatment dose (mg/kg)</b>	<b>Body weight gain<sup>a</sup> (g)</b>	<b>Heart weight (mg)</b>
<b><u>4 weeks</u></b>			
Control	-	38 ± 5	262 ± 14
Mibefradil	0.5	45 ± 7	285 ± 22
Mibefradil	1.0	44 ± 5	271 ± 12
Mibefradil	5.0	43 ± 3	290 ± 29
Control	-	33 ± 5	n.d.
Verapamil	20	26 ± 5	n.d.
<b><u>6 weeks</u></b>			
Control	-	46 ± 11	285 ± 28
Mibefradil	5.0	51 ± 5	311 ± 20
Mibefradil	8.0	50 ± 5	311 ± 13

Results are expressed as means ± SEM (n = 9-10 animals per group).

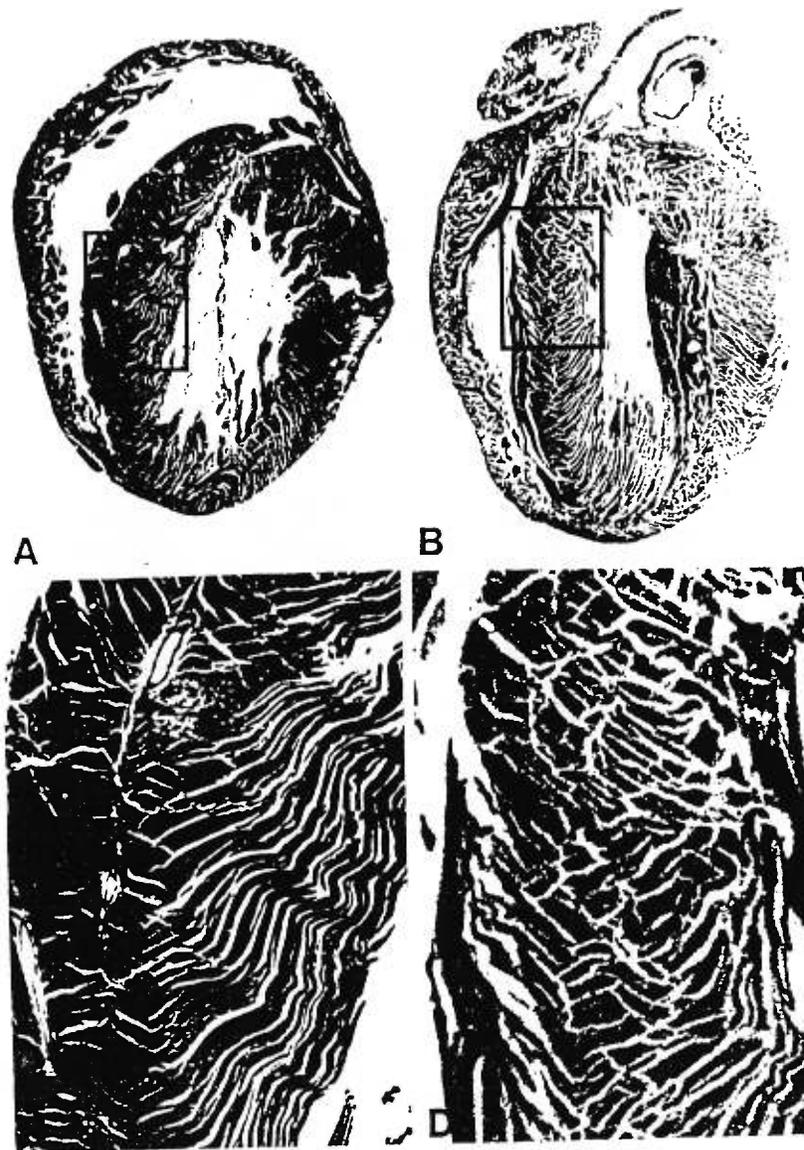
<sup>a</sup> Initial mean body weight of 30-day-old CM hamsters: 46 ± 4 g.

n.d. = not determined



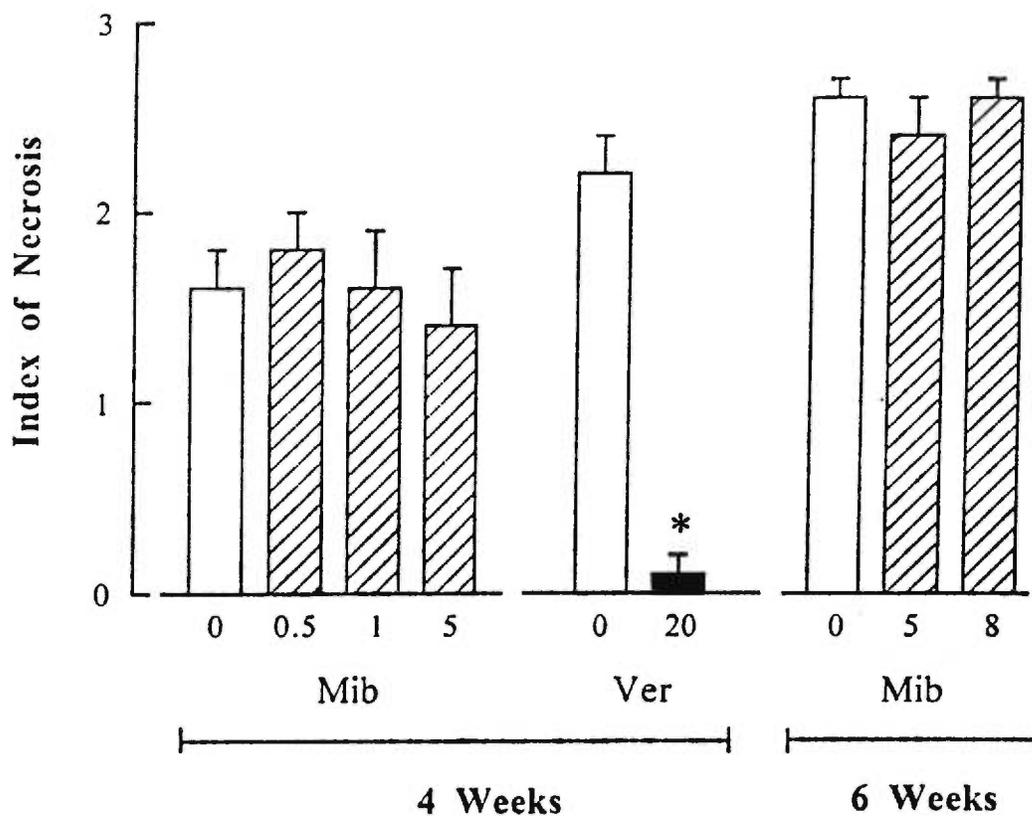
**Figure 1** Representative myocardial transection from an untreated cardiomyopathic hamster

Highly calcified disseminated lesions shown by Von Kossa stain, x 18. Necrotic foci are indicated by arrows.



**Figure 2. Representative myocardial transection from mibefradil-treated (A) and verapamil-treated (B) CMH hamster**

**C:** Higher magnification of calcium deposit in cardiomyocytes from the mibefradil-treated CMH heart, x300. **D:** higher magnification showing the absence of calcification in the verapamil-treated CMH heart, x300.



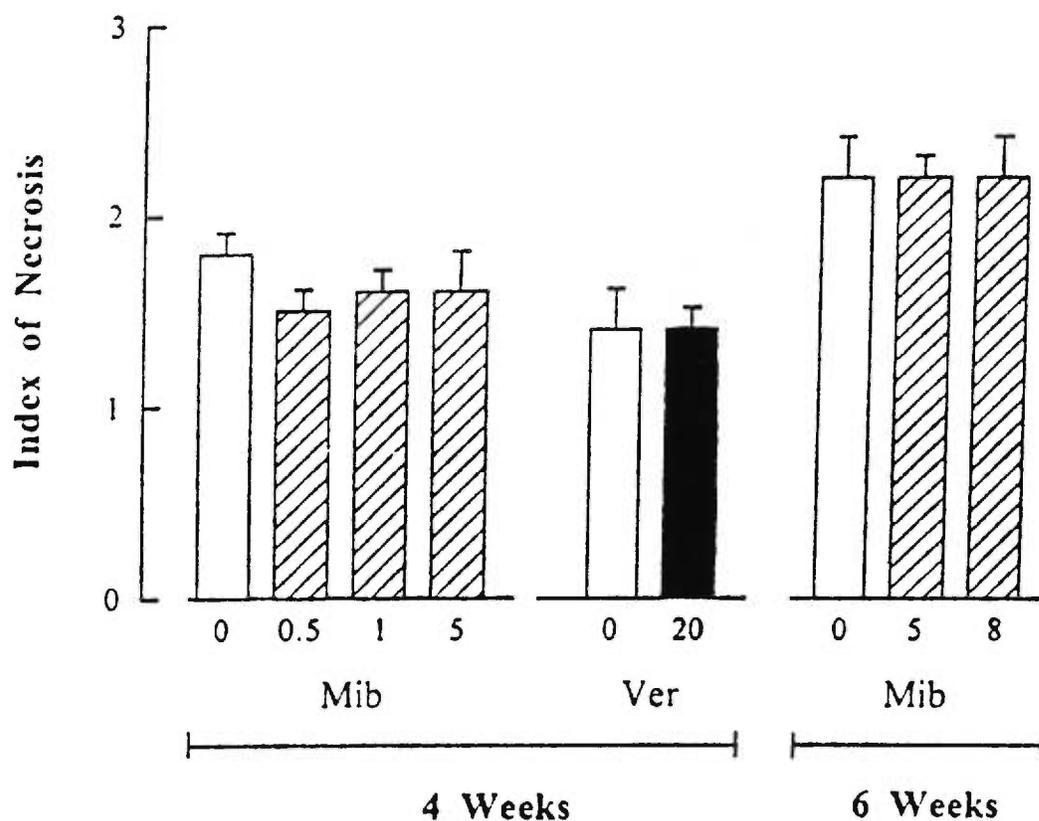
**Figure 3 Effects of mibefradil and verapamil on the development of myocardial necrosis**

Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

\*  $p < 0.05$  vs untreated CM hamsters.

Severity of necrosis expressed on an arbitrary scale: 0 = no lesion, 1 = occasional fiber degeneration, 2 = small scattered foci of necrosis, 3 = large areas of fiber destruction.

Legend: open bars = untreated; hatched bars = mibefradil; filled bar = verapamil.



**Figure 4. Effects of mibefradil and verapamil on the development of skeletal muscle (tongue) necrosis**

Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

Arbitrary scale of the severity of necrosis: 0 = no lesions, 1 = occasional fiber degeneration, 2 = small scattered foci of necrosis, 3 = large areas of fiber destruction.

Legend: open bars = untreated; hatched bars = mibefradil; filled bar = verapamil

**CHAPITRE III**  
**DISCUSSION ET CONCLUSION**

### 3.1 Modèle expérimental

Le modèle de hamster cardiomyopathique UM-X 7.1 offre la possibilité d'étudier les anomalies musculaires et cardiaques qui pourraient survenir chez l'homme avec une cardiomyopathie. L'abondance de la littérature concernant l'histologie, la biochimie, l'électrophysiologie et les propriétés mécaniques du cœur de hamster cardiomyopathique rend ce modèle particulièrement intéressant.

En effet, ce modèle de hamster cardiomyopathique a permis d'élucider certains mécanismes initiateurs de la pathologie. Des altérations au niveau des glycoprotéines membranaires (Roberds et coll., 1993; Nigro et coll., 1997; Sakamoto et coll., 1997), du contenu en cholestérol membranaire (Slack et coll., 1980), de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (Panagia et coll., 1984), de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Wagner et coll., 1989), de la densité des récepteurs aux antagonistes calciques (Kuo et coll., 1987, Wagner et coll., 1989), du courant calcique de type T (Sen et coll., 1994), du potentiel de phosphorylation oxydative (Proscheck et coll., 1982) et de la  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase du réticulum sarcoplasmique (Naranjan et coll., 1984) ont été identifiés. De plus, une

augmentation du contenu calcique cellulaire qui coïncide avec la phase nécrotique a été rapportée par plusieurs chercheurs et semble être capitale dans le développement de la cardiomyopathie (Bond et coll., 1989; Hano et coll., 1991). De plus, une augmentation de la densité du canal sensible à la ryanodine a été rapportée (Finkel et coll., 1993; Lachnit et coll., 1994; Sapp et coll., 1994) et cette dernière surviendrait conjointement avec la surcharge calcique cellulaire. Bref, ce modèle offre la possibilité d'étudier les changements associés à la surcharge calcique et semble approprié pour l'étude des antagonistes des canaux de type T et L. Du point de vue thérapeutique, il permet de déterminer l'efficacité des médicaments pendant l'évolution de la maladie. Comme cette évolution est bien caractérisée, le modèle offre une situation expérimentale idéale pour caractériser les bénéfices potentiels associés à l'utilisation des antagonistes du calcium. L'inférence des résultats obtenus chez l'animal à l'humain comporte cependant certaines limites et ce modèle expérimental de cardiomyopathie ne représente pas toutes les formes de cardiomyopathie humaine.

### **3.2 Antagonistes calciques et cardioprotection**

Dans le présent travail, le potentiel cardioprotecteur du mibéfradil et du vérapamil ont été comparés. Les résultats obtenus confirment l'hétérogénéité de l'effet cardioprotecteur des différents antagonistes du calcium. En effet, le vérapamil administré dans la phase initiale de la maladie a diminué significativement la sévérité et l'incidence des nécroses myocardiques alors que le mibéfradil n'a procuré aucun bénéfice cardioprotecteur.

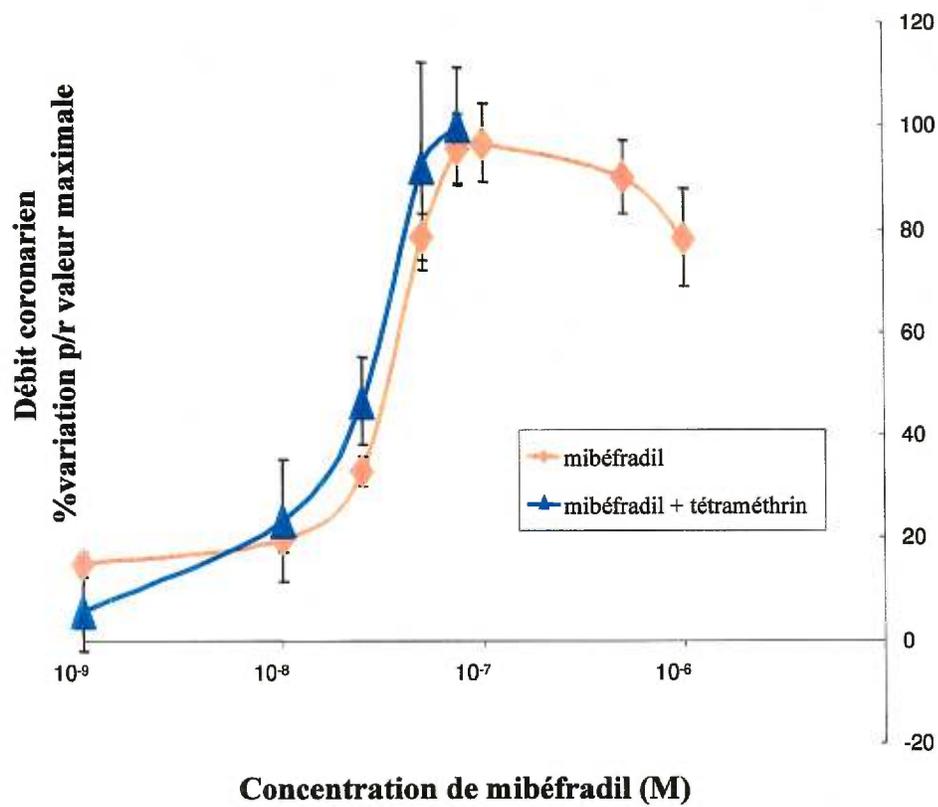
Plusieurs études ont rapporté les effets cardioprotecteurs associés à l'utilisation du mibéfradil dans différents modèles de cardiomyopathie ischémique. Clozel et coll. (1989) et Guth (1992) voulant reproduire l'angine de poitrine ont provoqué une ischémie en diminuant la pression de perfusion d'une artère coronaire chez le chien anesthésié ou en soumettant à l'exercice un chien avec une occlusion coronarienne permanente. Dans ces modèles, le mibéfradil améliore la fonction contractile régionale et le flot coronarien (spécialement au niveau de l'endocarde) et ce sans détériorer la performance ventriculaire. L'amélioration de la fonction contractile de la région ischémique

s'expliquerait par une diminution de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, deux facteurs déterminants de la consommation d'oxygène par le myocarde. D'autres modèles ischémiques ont également été utilisés. Des chiens soumis à l'exercice après avoir subi un infarctus du myocarde (Billman, 1996) ainsi que des rats (Richard et coll., 1995), des chiens (Vander Heiders et coll., 1994) et des cochons (Muller et coll., 1998) soumis à des épisodes d'ischémie-reperfusion ont été traités avec du mibéfradil. Dans ces modèles, le mibéfradil a diminué les épisodes de fibrillation auriculaire et ce à des concentrations dépourvues d'effet cardiopresseur (Vander Heide et coll., 1994; Richard et coll., 1995; Muller et coll., 1998). De plus, dans les modèles d'ischémie-reperfusion chez le chien et le rat, le mibéfradil a réduit l'étendue de la zone ischémique. Bien que dans ces modèles ischémiques aigus le mibéfradil ait démontré des effets cardioprotecteurs significatifs, tel n'est pas le cas lors d'une administration à long terme chez le hamster cardiomyopathique. L'efficacité du mibéfradil pourrait dépendre des conditions expérimentales utilisées (in-vitro, ex-vivo, in-vivo).

Théoriquement, plusieurs facteurs pharmacocinétiques pourraient contribuer à l'inefficacité du mibéfradil dans le modèle que nous avons utilisé. Des doses quotidiennes de 5 à 8 mg/kg/jour de mibéfradil ont été administrées chez les hamsters. Ces doses ont été choisies en fonction des doses utilisées chez l'humain (Kobrin et coll., 1997) et ne correspondent pas à des doses supra-thérapeutiques. Afin de déterminer le profil cinétique du mibéfradil, nous avons évalué ses concentrations plasmatiques chez quelques hamsters ( $n = 4$ ) 12 heures après l'administration de la dernière dose. Les concentrations plasmatiques moyennes obtenues ( $101 \pm 17$  ng/ml) correspondent à celles rapportées chez l'homme (Abernethy, 1997). La demi-vie n'a cependant pas été évaluée chez le hamster. Par contre chez d'autres rongeurs, la demi-vie se situe à environ 10 à 15 heures après une administration orale (Wiltshire et coll., 1997). Or ces observations font qu'une administration biquotidienne a permis de maintenir des niveaux plasmatiques adéquats. D'après ces observations, le choix des doses et des voies d'administration du mibéfradil ne constituent pas des éléments expliquant la différence d'efficacité entre le mibéfradil et le vérapamil.

Puisque les facteurs pharmacocinétiques ne semblent pas contribuer à cette différence, quels seraient les effets pharmacologiques qui l'expliqueraient? Les résultats obtenus lors de notre étude permettent de circonscrire certains de ces facteurs pharmacodynamiques. Tout d'abord, la littérature rapporte que la densité des canaux calciques de type T est augmentée au cours de la cardiomyopathie du hamster UM-X 7.1 (Sen et coll., 1994; Bkaily et coll., 1997). Ceci suggère que ces canaux sont impliqués dans l'expression de la maladie. Il a été démontré que le mibéfradil exerce une action inhibitrice sélective sur le courant calcique de type T et ce, à des concentrations plus faibles que celles requises pour inhiber le courant calcique de type L. En effet, le mibéfradil s'est avéré 10 fois plus efficace pour inhiber les canaux calciques de type T que les canaux calciques de type L (Mirsha et coll., 1994<sup>a</sup>; Mehrke et coll., 1994). Compte tenu de ces propriétés pharmacologiques et de l'augmentation du courant calcique de type T rapportée dans la cardiomyopathie du hamster, on aurait pu s'attendre à un effet cardioprotecteur significatif avec le mibéfradil. Cependant, les résultats obtenus suggèrent que l'inhibition de l'activité des canaux calciques de type T n'est pas un facteur important pour l'obtention d'une cardioprotection significative dans ce modèle.

Afin d'étudier la réelle contribution des canaux calciques de type T, des expériences ont été réalisées dans notre laboratoire avec des cœurs isolés de hamsters UM-X 7.1 selon la méthode de Langendorff (Boileau, 1998). Un premier groupe a reçu des doses croissantes de mibéfradil seulement ( $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  M; n=6) alors qu'un deuxième groupe a reçu une infusion constante de tétraméthrin ( $10^{-7}$  M) et les doses croissantes de mibéfradil (n=6). Ces expériences ont permis d'évaluer l'effet vasculaire coronarien du mibéfradil et du bloqueur spécifique et sélectif des canaux calciques de type T, le tétraméthrin (Hagiwara et coll., 1988) (figure 8). Ni l'effet vasodilatateur à de faibles concentrations, ni l' $EC_{50}$  n'a pas été déplacé vers la droite suggérant ainsi que l'inhibition des canaux calciques de type T ne contribue pas à la dilatation coronarienne initiée avec le mibéfradil (Boileau, 1998). On pourrait même remettre en question cette propriété exclusive d'inhibition du canal calcique de type T par le mibéfradil. En effet, de récents travaux (Mehrke et coll., 1994) réalisés dans des cellules isolées (cellules cancéreuses d'origine médullaire de la thyroïde et cellules ovariennes de hamsters) démontrent que d'autres antagonistes calciques peuvent inhiber le canal calcique de type T. Le vérapamil posséderait



**Figure 8.** Effet vasculaire du mibéfradil en présence ou non du téttraméthrin ( $10^{-7}$  M)

80% de l'efficacité du mibéfradil sur ce canal. Compte tenu de la capacité du mibéfradil à inhiber le courant calcique de type T, de son inefficacité cardioprotectrice dans la cardiomyopathie du hamster et de l'action inhibitrice du vérapamil sur le canal calcique de type T, nous pouvons facilement déduire que l'activation des canaux calciques de type T ne serait pas importante dans le développement des nécroses cardiaques chez le jeune hamster UM-X 7.1.

Il est connu que les différentes classes des antagonistes du calcium, soit les phénylalkylamines (vérapamil, gallopamil), les dihydropyridines (nifédipine, félodipine, amlodipine, isradipine), les benzothiazépines (diltiazem) et la nouvelle classe des dérivés substitués benzo-midazolil (mibéfradil) exercent une action inhibitrice sur les canaux calciques de type L (Opie et coll., 1987; Nayler et coll., 1991; Mirsha et coll., 1994<sup>a</sup>). De par cette action, ils diminuent l'influx calcique et pourraient ainsi empêcher la surcharge calcique cellulaire observable dans le cœur du hamster UM-X 7.1. Parmi ces différents antagonistes calciques, certains se sont avérés d'excellents cardioprotecteurs (D-600, vérapamil : Jasmin et al, 1973 ; Factor et coll., 1988) alors que d'autres ont démontré peu (diltiazem : Bhattacharya et coll., 1982; Jasmin et al,

1987) ou pas d'effet cardioprotecteur (nifédipine : Jasmin et coll., 1987). Compte tenu des propriétés inhibitrices de ces antagonistes calciques sur les canaux calciques de type L et de cette variabilité dans l'effet cardioprotecteur des antagonistes du calcium dans le modèle de cardiomyopathie étudié (figure 5), nous proposons que l'effet cardioprotecteur du vérapamil n'est pas tributaire d'une action inhibitrice sur le canal calcique de type L.

Le mibéfradil est un excellent vasodilatateur coronarien (Osterrieder et coll., 1989; Clozel, 1989; Orito et coll., 1993) et son action vasodilatatrice est en partie dépendante de l'endothélium (Boulangier et coll., 1994; Karila-Cohen et coll., 1996). D'autres chercheurs rapportent que le mibéfradil est efficace pour inhiber le vasospasme coronarien induit par une substance  $\alpha$ -adrénergique, l'ergonovine (Karila-Cohen et coll., 1996). Malgré ces propriétés vasodilatatrices coronariennes, le mibéfradil n'a procuré aucun effet cardioprotecteur chez le hamster UM-X 7.1. En tenant compte de la variabilité de l'efficacité cardioprotectrice des antagonistes du calcium (Jasmin et coll., 1987) et des résultats de notre étude, nous suggérons qu'une trop grande sélectivité vasculaire coronarienne nuit au développement d'une

cardioprotection efficace. En effet, plus la vasosélectivité coronarienne d'un antagoniste du calcium sera importante, (mibéfradil > nifédipine > diltiazem > vérapamil) (Ljung et coll., 1987) moins la cardioprotection sera significative (vérapamil > diltiazem > nifédipine > mibéfradil) (tableau 1). Ces observations vont à l'encontre de la théorie de Sonnenblick et coll. (1985) qui propose que le vasospasme coronarien est l'élément majeur de l'initiation des nécroses cardiaques dans ce modèle de cardiomyopathie. Bien que l'effet cardioprotecteur du vérapamil puisse être lié à son action cardiodépressive, cette hypothèse nous paraît peu vraisemblable. En effet, les doses de vérapamil utilisées dans la présente étude sont comparables aux doses thérapeutiques, donc sans effet inotrope négatif significatif.

Quel pourrait être le mécanisme responsable de l'effet cardioprotecteur du vérapamil? Des études démontrent que le vérapamil exerce une action inhibitrice sur le récepteur  $\alpha$ -adrénergique (Descombes et coll., 1985; Nishimura et coll., 1985). Cependant, selon l'étude de Jasmin et coll. (1987), cette action pharmacologique ne serait pas impliquée dans l'effet cardioprotecteur du vérapamil. En effet, un antagoniste  $\alpha$ -adrénergique, le prazosin, ne procure aucun bénéfice cardioprotecteur

	<b>vasosélectivité coronarienne</b>	<b>cardioprotection</b>
<b>Mibéfradil</b>	<b>++++</b>	<b>+</b>
<b>Nifédipine</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>
<b>Diltiazem</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
<b>Vérapamil</b>	<b>+</b>	<b>++++</b>

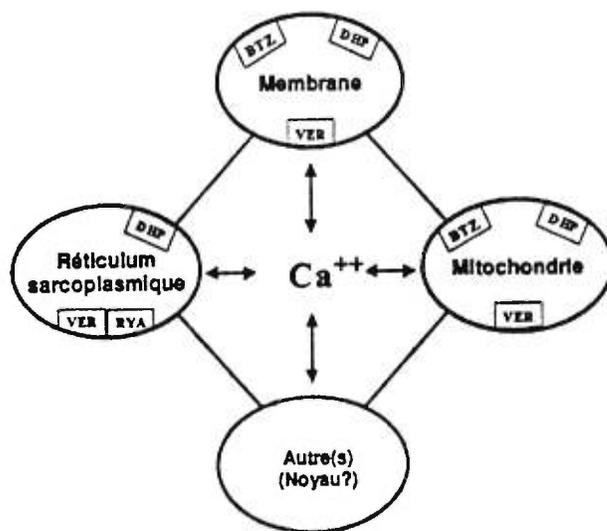
**Tableau 1.** Vasosélectivité versus cardioprotection de différents antagonistes du calcium.

+, ++, +++, +++++: importance croissante.

significatif. Alors, il nous apparaît peu vraisemblable que l'effet cardioprotecteur du vérapamil soit tributaire de son action inhibitrice sur les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques.

D'autres équipes ont déjà démontré que le vérapamil possède d'excellentes propriétés cardioprotectrices dans le modèle de hamster cardiomyopathique (Jasmin et coll., 1975<sup>a b</sup>; Rouleau et coll., 1982; Wikman-Coffelt et coll., 1986<sup>b</sup>; Kobayashi et coll., 1987; Factor et coll., 1988; Capasso et coll., 1990). Rouleau et coll. (1982) suggèrent que cet effet bénéfique du vérapamil est secondaire à la diminution de la surcharge calcique. Kobayashi et coll. (1987) suggèrent quant à eux que la diminution de la production de radicaux libres contribuerait à l'effet bénéfique du vérapamil. Wikman-Coffelt et coll. (1986<sup>b</sup>) parlent de la capacité du vérapamil de préserver les réserves énergétiques (phosphate hautement énergétique, AMP<sub>c</sub>) tandis que Factor et coll. (1988) défendent l'idée que la prévention du vasospasme est responsable de la cardioprotection offerte par le vérapamil. Bref, les mécanismes impliqués dans l'effet cardioprotecteur du vérapamil semblent nombreux.

Nous croyons que l'effet cardioprotecteur du vérapamil est probablement lié à un effet intracellulaire. Cette hypothèse tient du fait que plusieurs antagonistes du calcium possèdent des sites de liaison intracellulaire (Zsotér et coll., 1983). En effet, un site de liaison mitochondrial a été identifié pour les benzothiazépines (BTZ) (Matlib et coll., 1991), les dihydropyridines (DHP) (Zerning et coll., 1988) et les phénylalkylamines (PAA) (Zerning, 1992). Une action inhibitrice des PAA a également été rapportée au niveau du réticulum sarcoplasmique sur le canal sensible à la ryanodine (Valdivia et coll., 1990) (figure 9). Bien que d'autres actions intracellulaires des antagonistes du calcium puissent être impliquées (notamment au niveau du noyau), il nous paraît vraisemblable que l'action cardioprotectrice du vérapamil soit liée à une action inhibitrice des mouvements calciques au niveau du réticulum sarcoplasmique (Valdivia et coll., 1990; Finkel et coll., 1993). En effet, le vérapamil semble être la seule substance pharmacologique à exercer un effet direct sur le canal sensible à la ryanodine. Même si le récepteur [<sup>3</sup>H]-ryanodine est inchangé durant les premiers stades de la cardiomyopathie du hamster (phase de nécrose), certains auteurs (Lachnit et coll., 1994; Sapp et coll., 1994; Tawada-Iwata et coll., 1993; Ueyama et coll., 1998)



**Figure 9.** Sites d'action intracellulaire potentiels  
(Abréviations BTZ: benzothiazépines, DHP: dihydropyridines, VER: vérapamil, RYA: ryanodine)

rapportent qu'une augmentation de la densité des canaux calciques sensibles à la ryanodine survient conjointement avec le développement de la surcharge calcique. Il est possible que cette augmentation de la densité des récepteurs sensibles à la ryanodine représente un important facteur dans le développement des nécroses cardiaques observées dans la cardiomyopathie du hamster. Bien qu'il puisse s'agir d'un mécanisme compensatoire à l'étiologie de la maladie, l'effet cardioprotecteur du vérapamil pourrait être tributaire de son action inhibitrice sur le canal sensible à la ryanodine.

Sachant qu'au niveau du myocarde, la relâche du calcium est davantage médiée par le canal calcique sensible à la ryanodine que par le canal calcique sensible à l'inositol triphosphate, notre hypothèse est d'autant plus plausible. Contrairement au vérapamil qui exerce une action directe sur le canal sensible à la ryanodine, les DHP exercent une action intracellulaire indirecte sur la relâche calcique du réticulum sarcoplasmique (via le tubule T) (Anderson et coll., 1995). Cependant, l'administration des DHP dans des conditions expérimentales comparables à celles utilisées pour démontrer l'effet cardioprotecteur

du vérapamil n'a pas diminué la sévérité et l'incidence des nécroses myocardiques (Jasmin et coll., 1987).

La liposolubilité des antagonistes du calcium (DHP > PAA > DTZ) pourrait aussi contribuer à expliquer la différence entre l'effet cardioprotecteur des PAA et des DHP. Comme le coefficient de partage pour les DHP est supérieur à celui des PAA (Mason, 1995) ce phénomène entraînerait une séquestration des DHP dans la membrane plasmique et empêcherait l'accès à leurs sites intracellulaires. Ainsi, la plus faible liposolubilité des PAA faciliterait leur transit vers des sites intracellulaires.

### 3.3 Conclusion

L'utilisation du mibéfradil dans la phase initiale de la cardiomyopathie du hamster aurait pu être bénéfique puisque des évidences démontrent que la surcharge calcique et l'augmentation de l'activité des courants calciques de type T participent au développement des nécroses myocardiques présentes dans cette pathologie. Cependant, les résultats indiquent que le mibéfradil administré dans la phase initiale de la cardiomyopathie ne procure aucun effet cardioprotecteur alors que le vérapamil a réduit significativement la sévérité et l'incidence de ces nécroses. Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes que l'inhibition des canaux calciques de type T et L expliquent l'effet cardioprotecteur du vérapamil. De plus, en analysant l'effet cardioprotecteur de médicaments de différentes classes (antagonistes du calcium, inhibiteurs  $\alpha$ -adrénergiques et inhibiteurs des canaux sodiques) nous avons tenté de faire la lumière sur le ou les autres mécanisme(s) probablement impliqué(s) dans cet effet cardioprotecteur associé au vérapamil. Ainsi, la vasosélectivité coronarienne, l'action inotrope négative, l'inhibition des canaux sodiques et celle des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ne semblent pas contribuer aux bénéfices

observés avec le vérapamil. Sans négliger la possibilité que le vérapamil exerce des effets au niveau mitochondrial, une action spécifique au niveau du réticulum sarcoplasmique (inhibition du canal calcique sensible à la ryanodine) contribuerait aux effets bénéfiques des phénylalkylamines (vérapamil). La vérification de cette hypothèse commande cependant une étude plus approfondie.

## **RÉFÉRENCES**

- Abernethy DR. Pharmacologic and Pharmacokinetic Profile of Mibefradil, a T- and L-type Calcium Channel Antagonist. *Am J Cardiol* 1997, 80 (4B): 4C-11C.
- Anderson K and Meissner G. T-Tubule Depolarization-induced SR  $\text{Ca}^{2+}$  Release Is Controlled by Dihydropyridine Receptor- and  $\text{Ca}^{2+}$  -dependent Mechanisms in Cell Homogenates from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 1995, 105: 363-383.
- Antony I, Chemla D, LeCarpentier Y. Myocardial Contractility, Lusitropy and Calcium Responsiveness in Young (50 Days) and Hypertrophic (180 Days) Cardiomyopathic Hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1992, 24: 1089-100.
- Arreola J, Dirksen RT, Shieh RC, Willifoud DJ, Sheu SS.  $\text{Ca}^{2+}$  Current and  $\text{Ca}^{2+}$  Transient Under Action Potential Clamp in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Am J Physiol* 1991, 261: C393-C397.
- Atsma DE, Bastiaanse EM, Jerzewski A, Van der Valk LJ, Van der Laarse A. Role of calcium-activated neutral protéase (calpain) in cell death in cultures neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition. *Circ Res* 1995, 76: 1071-8.

- Bajusz E, Jasmin G. Hereditary Disease Model of Congestive Cardiomyopathy: Studies on a New Line of Syrian Hamsters. *Fed Proc* 1972, 31: 621.
- Balke CW, Rose WC, Narban E, Wier WG. Macroscopic and Unitary Properties of Physiological Ion Flux Through T-type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in Guinea Pig Hearts. *J Physiol* 1992, 456: 247-65.
- Bazan E, Schwartz A, Gardner S, Wells JW, Sole MJ, Johnson CL. Receptors for Calcium Channel Antagonists in Cardiomyopathy (abstract). *Fed Proc* 1987, 46: 852.
- Beam KG, Knudson CM. Effect of Postnatal Development on Calcium Currents and Slow Charge Movement in Mammalian skeletal Muscle. *J Gen Physiol* 1988, 91: 799-815.
- Bean. BP. Classes of Calcium Channels in Vertebrate Cells. *Ann Rev Physiol* 1989, 51: 367-84.
- Bernink P, Prager G, Schelling A, Kobrin I. Antihypertensive Properties of the Novel Calcium Antagonist Mibefradil (Ro 40-5967): a New Generation of Calcium Antagonists. *Hypertension* 1996, 27: 426-432.
- Berry B, Poulsen R, Younge L, Brunewald P, Fitchett D, de Castonay C, Gabbiani G, Hüttner I. Numerical Densities of Intramembrane

- Particles in the Cardiac Sarcolemma of Normal Syrian Hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1983, 15: 503-13.
- Bhattacharya SK, Palmieri GM, Bertorini TE, Nutting DF. The Effects of Diltiazem on Dystrophic Hamsters. *Muscle and Nerves* 1982, 5: 73-78.
- Bian K, Hermsmeyer K. Ca<sup>2+</sup> Channel Antagonist Ro 40-5967 in Vascular Muscle Cells Cultured From Dog Coronary and Saphenous Arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993, 348: 191-196.
- Billman GE, Hamlin RL. The Effects of Mibefradil, a Novel Calcium Channel Antagonist on Ventricular Arrhythmias Induced by Myocardial Ischemia and Programmed Electrical Stimulation. *J of Pharmacol Exp Therap* 1996, 277: 1517-1526.
- Bkaily G, Naik R, D'orléans-Juste P, Wang S, Fong CN. Endothelin-1 Activates the R-Type Ca<sup>2+</sup> Channel in Vascular Smooth-Muscle Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, 26 (suppl. 3): S303-S306.
- Bkaily G, Sculptoreanu A, Jacques D, Jasmin. Increase of T-type Ca<sup>2+</sup> Current in Heart Cells of the Cardiomyopathic Hamster. *Mol Cell Biochem* 1997, 176: 199-204.

- Boileau JF. Le rôle des canaux calciques de type T dans l'effet vasculaire et cardiaque du mibéfradil dans la défaillance cardiaque. Rapport de stage exécuté sous la direction du Dr L. Dumont, Département de pharmacologie. Université de Montréal, 1998.
- Bond M, Jaraki AR, Disch CH, Healy BP. Subcellular Calcium Content in Cardiomyopathic Hamsters Hearts in Vivo: an Electron Probe Study. *Circ Res* 1988, 64: 1001-12.
- Borowski IFM, Harrow JAC, Pritchard ET, Dhalla NS. Changes in Electrolyte and Lipid Contents of the Myopathic Hamster (UM-X 7.1) Skeletal and Cardiac Muscle. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1974, 7: 443-51.
- Boulanger CM, Nakashima L, Olmos G, Vanhoutte PM. Effects of Ca<sup>2+</sup> Antagonist RO 40-5967 on Endothélium-Dependant Responses of Isolated Arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23: 869-76.
- Brachfeld N. The Pathogenesis of Myocardial Cell Death. In: *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*. Vol. 1. Edited by Bajusz E, Rona G. University Park Press. Baltimore. MD, 1972, pp. 59-70.

- Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989, 338: 259-62.
- Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Chronic Calcium Blockade Prevents the Progression of Myocardial Contractile and Electrical Dysfunction in the Cardiomyopathic Syrian Hamster. *Circ Res* 1990, 67: 1381-1393.
- Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 1991, 71: 129-53.
- Carmeliet E. K<sup>+</sup> Channels in Cardiac Cells: Mechanisms of Activation, Inactivation, Rectification and K<sub>e</sub><sup>+</sup> Sensivity. *Pflügers Arch* 1989, 414 (suppl 1): S88-S92.
- Conway RS, Factor SM, Sonnenblick EH, Baez S. Microvascular Reactivity of the Myopathic Syrian Hamster Cremaster Muscle. *Cardiovasc Res* 1987, 21: 796-803.
- Conway RS, Natelson BH, Chen WH, Ting W. Enhanced Coronary Vasoconstriction in the Syrian Myopathic Hamster Supports the Microvascular Spasm Hypothesis. *Cardiovasc Res* 1994, 28: 320-4.
- Cooper RA. Abnormalities of Cell-membrane Fluidity in the Pathogenesis of Disease. *New Engl J Med* 1977, 297: 371-7.

- Clozel JP, Banken L, Osterrieder W. Effects of Ro 40-5967, a Novel Calcium Antagonist, on Myocardial Function During Ischemia Induced by Lowering Coronary Perfusion Pressure in Dogs: Comparison with Verapamil. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989, 14: 713-21.
- Davidoff AJ, Gwathmey JK. Pathophysiology of Cardiomyopathies: Part I. Animal Models and Humans. *Current Opinion in Cardiology* 1994, 9 (3): 357-68.
- Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy – pathophysiology and pathogenesis. *Histopathology* 1995, 493-500.
- Demel RA, DeKruyff B. Function of Sterols in Membranes. *Biochim biophys acta* 1976, 457: 109-32.
- Descombes JJ, Stoclet JC. Diphenylalkylamines Calcium Antagonists Interact with Alpha-Adrenoreceptor Binding Sites in Aortic Membranes. *Eur J Pharmacol* 1985, 115: 313-6.
- Dhalla NS, Singh A, Lee SL, Anand MB, Bernatsky AM, Jasmin G. Defective Membrane Systems in Dystrophic Skeletal Muscle of the UM-X 7.1 Strain of Genetically Myopathic Hamster. *Clin Sci Mol Med* 1975, 49: 359-68.

Dhalla, NS. Pierce, GN. Panagia V, Singal PK, Beamish RE. Calcium Movement in Relation to Heart Function. *Basic Res Cardiol* 1982, 77: 117-39,.

Drexler H, Lu W. Endothelial Dysfunction of Hindquarter Resistance Vessels in Experimental Heart Failure. *Am J Physiol* 1992, 262: H1640-H1645.

Duclos F, Lim LE, Broux O, Sunada Y, Meyer J, Campbell CP, Bourg N, Allamand V, Richard I, Beckmann JS et coll.  $\beta$ -sarcoglycane: une protéine du complexe dystrophine-glycoprotéine est responsable d'une forme récessive de dystrophie musculaire. *Med Sci* 1995, 11: 1732-8.

Elkayam U, Amin J, Anilkumar M, Vasquez J, Weber L, Rahimtoola SH. A. Prospective, Randomized, Double-Blind, Crossover Study to Compare the Efficacy and Safety of Chronic Nifedipine Therapy with that of Isradipine Dinitrate and their Combination in the Treatment of Chronic Congestive Heart Failure. *Circulation* 1990, 82: 1954-61.

Elkayam U, Shotan A, Mehra, A Ostrzega, E. Calcium Channel Blockers in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 1993, 22 (suppl A): 139A-144A.

- Ervasti J, Ohlendieck K, Kahl WS, Gaver M, Campbell KP. Deficiency of Glycoprotein Component of the Dystrophin Complex in Dystrophic Muscle. *Nature* 1990, 345: 315-9.
- Escande D, Caverio I. K<sup>+</sup> channel openers and “natural” cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 1992, 13 (suppl): 269-72.
- Factor SM, Minase T, Cho S, Dominitz R, Sonnenblick EH. Microvascular Spasm in the Cardiomyopathic Syrian Hamster: A Preventable Cause of Focal Myocardial Necrosis. *Circulation* 1982, 66 (2): 342-354.
- Factor SM, Cho SH, Scheuer J, Sonnenblick EH, Malhotra A. Prevention of Hereditary Cardiomyopathy in the Syrian Hamster with Chronic Verapamil Therapy. *J Am Coll of Cardiol* 1988, 12: 1599-1604.
- Fang LM, Osterrieder W. Potential-Dependent Inhibition of Cardiac Ca<sup>2+</sup> Inward Currents by Ro 40-5967 and Verapamil: Relation to Negative Inotropy. *Eur J Pharmacol* 1991, 196: 205-7.
- Farber JL. Biology of Disease. Membrane Injury and Calcium Homeostasis in the Pathogenesis of Coagulative Necrosis. *Lab Invest* 1982, 47 (2): 114-23.

- Farias RN, Bloj B, Morero RD, Sineriz F, Trucco RE. Regulation of Allosteric Membrane-Bound Enzymes Through Changes in Membrane Lipid Composition. *Biochim biophys acta* 1975, 415: 231-51.
- Fedelesova M, Dhalla NS. High Energy Phosphate Stores in the Hearts of Genetically Dystrophic Hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1971, 3: 93-102.
- Figulla HR, Vetterlein MD, Glaubitz M, Kreuzer H. Inhomogeneous Capillary Flow and its Prevention by Verapamil and Hydralazine in the Cardiomyopathic Syrian Hamster. *Circulation* 1987, 76: 207-16.
- Finkel MS, Shen L, Oddis CV, Romeo R. Verapamil Regulation of the Defectives SR Release Channel in the Cardiomyopathic Syrian Hamster. *Life Sci* 1993, 52: 1109-19.
- Finkel MS, Romeo RC, Oddis CV, Salama G. Inotropic Effects of Calcium Antagonists in the Cardiomyopathic Syrian Hamster. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, 19: 546, 53.
- Fleckenstein A. Specific Pharmacology of Calcium in Myocardium, Cardiac Pacemakers and Vascular Smooth Muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1977, 17: 149-66.

- Genao A, Seth K, Schmidt U, Carles M, Gwathmey JK. Dilated Cardiomyopathy in Turkeys: an Animal Model for the Study of Human Heart Failure. *Laboratory Animal Sci* 1996, 46 (4): 399-404.
- Gonoi T, Hasegawa S. Post-natal Disappearance of Transient Calcium Channels in Mouse Skeletal Muscle: Effects of Denervation and Culture. *J Physiol* 1988, 401: 617-37.
- Grinde B. Selective inhibition of lysosomal protein degradation by the thiol proteinase inhibitors E-64, Ep-459 and Ep-457 in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982, 701: 328-33.
- Guertz W. Cardiomyopathy of the Syrian Hamster: a Possible Model of Human Disease. In: *Pathology of Syrian Hamster: Progress in Experimental Tumor Research*, Vol 16. Edited by Homburger F, Hargen S. Basel: Switzerland, 1972: pp 242-60.
- Guth BD. Reduction of Exercise-Induced Regional Contractile Dysfunction in Dogs Using a Novel Calcium Channel Blocker (Ro 40-5967). *Cardiovasc Drugs Ther*, 1992, 6: 167-71.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of Two Types of Calcium Currents to the Pacemaker Potentials of Rabbit Sino-Atrial Node Cells. *J Physiol* 1988, 395: 233-59.

- Hano O, Lakatta EG. Diminished Tolerance of Prehypertrophic Cardiomyopathic Syrian Hamster to  $Ca^{2+}$  Stresses. *Circ Res* 1991, 69: 123-33.
- Homburger F, Baker JR, Nixon CW, Withney R. Primary Generalized Polymyopathy and Cardiac Necrosis in an Inbred Line of Syrian Hamster. *Med. Exp. (Basel)* 1962, 6: 339-345.
- Homburger F, Nixon CW, Eppenberger M, Baker JR. Hereditary Myopathy in the Syrian Hamster: Studies on Pathogenesis. *Ann. N.Y. Acad* 1966, 138: 14-27.
- Homburger F. Myopathy of Hamster Dystrophy: History and Morphologic Aspects. *Ann NY Acad Sci* 1979, 317: 2-17.
- Howlett SE, Gordon T. Calcium Channels in Normal and Dystrophic Hamster Cardiac Muscle. *Biochem Pharmacol* 1987, 36: 2653-9.
- Huber SA. Autoimmunity in Myocarditis: Relevance of Animal Models. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1997, 83(2): 93-102.
- Hunter EG, Elbrink J. Increased Contractility in Vascular Smooth Muscle of Dystrophic Hamsters. *Can J Physiol Pharmacol* 1983, 61: 182-5.

- Ito Y, Chidsey CA. Intracellular Calcium and Myocardial Contractility: IV. Distribution of Calcium in the Failing Heart. *J Mol Cell Cardiol* 1972, 4: 507-17.
- Jacobus WE, Pores IH, Lucas SK, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Intracellular Acidosis and Contractility in the Normal and Ischemic Heart as Examined by PNMR. *J Mol Cell Cardiol* 1982, 14 (suppl. 3): 13-20.
- Jasmin G, Bajusz E. Polymyopathie et Cardiomyopathie Héritaire chez le Hamster de Syrie. Inhibition Sélective des Lésions du MyocardE. *Ann Anat Pathol* 1973, 18: 49-66.
- Jasmin G, Bujusz E, Solymoss B. Selective Prevention by Verapamil and Other Drugs of the Hereditary Cardiomyopathy. In: *Recent Advances in Myology*. Edited by Bradley WG, Gardner-Medwin D, Walton JN. Excerpta Medica: Amsterdam 1975, 413-7. <sup>a</sup>
- Jasmin G, Solymoss B. Prevention of Hereditary Cardiomyopathy in the Hamster by Verapamil and Other Agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1975, 149: 193-8. <sup>b</sup>
- Jasmin, G. Eu, HY. Cardiomyopathy of Hamster Dystrophy. *Ann NY Acad Sci* 1979, 317: 46-58.

- Jasmin G, Proscheck L. Hereditary Polymyopathy and Cardiomyopathy in the Syrian Hamster. I. Progression of Heart and Skeletal Muscle Lesions in the UM-X7.1 Line. *Muscle and Nerves* 1982, 5: 20-5.
- Jasmin G, Proscheck L. Calcium and Myocardial Cell Injury. An Appraisal in the Cardiomyopathic Hamster. *Can J Physiol Pharmacol* 1984, 62: 891-8.
- Jasmin G, Proscheck L. Pathogenesis of the Hamster Hereditary Cardiomyopathy: A Pharmacologic Appraisal. In: *Pathogenesis of Myocarditis and Cardiomyopathy*. Edited by Kawai C, Abelman WH. University of Tokyo Press: Tokyo, 1987, 79-89.
- Jasmin G, Pasternac A, Bkaily G, Proscheck L. Modulation of Calcium Channels in the Management of Cardiomyopathies. In: *Calcium Channels: Their Properties, Fonctions, Regulation, and Clinical Relevance*. Edited by Hurwitz L, Partridge LD, Leach JK. CRC Press: Boston, 1991: 295-307.
- Jasmin G. Proscheck L. The Hamster Cardiomyopathy: New Insights in the Pathogenesis of this Hereditary Disease. In: *Membrane physiopathology*. Edited by: Bkaily, G. Kluwer Academic Publishers: Boston, 1994: 2-11.

- Jasmin G, and Proschek L. Prevention by Cromakalin of Spontaneously Occurring Cardiac Necrosis in Polymyopathic Hamsters. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996, 10: 587-91.
- Karila-Cohen D, Dubois-Randé JL, Giudicelli JF, Berdeaux A. Effects of Mibefradil on Large and Small Coronary Arteries in Conscious Dogs: Role of vascular Endothelium. *J Cardiovasc Pharm* 1996, 28: 271-7.
- Katz AM. Protein Families that Mediates  $Ca^{2+}$  Signaling in the Cardiovascular System. *Am J Cardiol* 1996, 78 (suppl 9A): 2-6.
- Kawaguchi H, Shoki M, Sano H, Kudo T, Sawa H, Okamoto H, Sakata Y, Yasuda H. Phospholipid Metabolism in Cardiomyopathic Hamster Heart Cells. *Circ Res* 1991, 69: 1015-21.
- Kawaguchi N, Fujitani N, Schaper J, Onishi S. Pathological Changes of Myocardial Cytoskeleton in Cardiomyopathic Hamster. *Mol Cellr Biochem* 1995, 144: 75-9.
- Kelly TF. Altered Lipoprotein Lipase and Lipid Metabolism in the Myocardium of BIO 14.6 Myopathic Hamster. *Trans NY Acad Sci* 1968, 30: 960-1.
- Klein I, Moore L, Pastan I. Effects of Liposomes Containing Cholesterol on Adenylate Cyclase Activity of Cultured

Mammalian Fibroblastes. *Biochim biophys acta* 1978, 506: 42-53.

Kobayashi A, Yamaschita T Kaneko M, Nishiyama T, Hayashi H, Yamazaki N. Effects of Verapamil on Experimental Cardiomyopathy in the Bio 14.6 Syrian Hamster. *J Am Coll Cardiol* 1987, 10: 1128-34.

Kobrin I, harlon V, Lindberg E, Pordy R. Safety of mibéfradil, a new once-a-day, selective T-type calcium channel antagonist. *Am J Cardiol* 1997, 80 (4B): 40C-46C

Kundel B, Hofmann U, Mutschler M. Comparaison of Verapamil and Bepredil in the Therapy of Familiar Cardiomyopathy of the Syrian Hamster. *Z Kardiol* 1987, 76 (suppl 3): 159-63.

Kuo TH, Johnson DF, Tsang W, Wiener J. Photoaffinity Labeling of the Calcium Channel Antagonist Receptor in the Heart of the Cardiomyopathic Hamster. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148: 926-33.

Lachnit WG, Philipps M, Gayman KJ, Pessah IN. Ryanodine and Dihydropyridine Binding Patterns and Ryanodine Receptor mRNA Levels in Myopathic Hamster Heart. *Am J Physiol* 1994, 267: H1205-H1213.

- Ljung B, Kjellstedt a, Orebäck B. Vascular Versus Myocardial Selectivity of Calcium Antagonists Studied by Concentration-Time-Effect Relations. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987, 10 (suppl. 1): S34-S39.
- Lossnitzer K, Bajusz E. Water and Electrolyte Alterations During the Life Course of the BIO 14.6 Syrian Golden Hamster. A disease Model of a Hereditary Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1974, 6: 163-77.
- Lossnitzer K, Janke J, Hein B, Stauch M, Fleckenstein A. Disturbed Myocardial Calcium Metabolism: A Possible Pathologic Factor in the Hereditary Cardiomyopathy of the Syrian Hamster. *Rec Adv Card Struct Metab* 1975, 6: 207-17.
- Lucas CM, Cheriex EC, van der Veen FH, Habets J, van der Nagel T, Penn OC, Wellwans HJ. Imipramine Induced Heart Failure in the Dog: a Model to Study the Effect of Cardiac Assist Devices. *Cardiovasc Res* 1992, 26: 204-9.
- Ma TS, Bailey LE. Excitation-Contraction Coupling in Normal and Myopathic Hamster Hearts II: Changes in Contractility and Ca Pools Associated with Development of the Cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1979, 13: 499-505.

- Ma Z, Lee SS. Cirrhotic Cardiomyopathy: Getting to the Heart of the Matter. *Hepatology* 1996, 24 (2): 451-9.
- Makino N, Jasmin G, Beamish RE, Dhalla NS. Sarcolemmal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  Exchange During the Development of Genetically Determined Cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Comm* 1985, 133 (2): 491-7.
- Mason RP. Differential Effect of Cholesterol on Membrane Interaction of Charged versus Uncharged 1,4-Dihydropyridines Calcium Channel Antagonists: A Biophysical Analysis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995, 9: 45-54.
- Matlib MA, Farland KL. Diltiazem Inhibition of Sodium-Induced Calcium Release. Effects on Energy Metabolism of Heart Mitochondria. *Am. J. of Hypertension* 1991, 7 (7 pt 2): 435S-441S.
- Mehrke G, Zong XG, Flockerzi V, Hofmann F. The  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Blocker Ro 40-5967 Blocs Differently T-type and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 271: 1483-8.
- Mirsha SK, Hermsmeyer K. Selective inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Ro 40-5967. *Circ Res* 1994, 75: 144-8. <sup>a</sup>

- Mirsha SK, Hermsmeyer K. Inhibition of Signal  $Ca^{2+}$  in Dog Coronary Arterial Vascular Cells by Ro 40-5967. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 24: 1-7. <sup>b</sup>
- Muller CA, Opie LH, McCarthy J, Hofmann D, Pineda CA, Peisach Effects of mibefradil, a Novel Calcium Channel Blocking Agent with T-type Activity, in Acute Experimental Myocardial Ischemia: Maintenance of Ventricular Fibrillation Threshold without Inotropic Compromise. *J Am Coll Cardiol* 1998, 32(1): 268-74
- Nakumara Y, Ryoke T, Tanaka N, Ohkusa T, Matsuzaki M, Celiprolol A.  $\beta$ -Adrenoreceptor Antagonist with Vasodilator Effect, Improves Hemodynamic Response to Catecholamine, Spontaneous Locomotor Activity, and Survival in Cardiomyopathic Hamsters with Advanced Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998, 31: 171-78.
- Naranjan S, Dhalla SL, Kanu R, Shah VE, Shingo S, Jasmin G. Behavior of Subcellular Organelles During the Development of Congestive Heart Failure in Cardiomyopathic Hamsters (UM-X7.1) In: *The Cardiomyopathic Heart*. Edited by Nagano, M.

- Takeda, N. Dhalla, NS. New York: Raven Press:New York, 1994: 1-14.
- Nayler WG, *Second Generation of Calcium Antagonists*. Berlin, Sprigine-Verlag: New York, 1991, chap 1: 1-8.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standed NB. Calcium Channels, Potassium Channels, and Voltage Dependence of Arterial Smooth Muscle Tone. *Ann J Physiol* 1990, 259: C3-C18.
- Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, Nigro G, Ventura C, Abbondanza C, Molinari AM, Acampora D, Nishimura M, Hayashizaki Y, Puca GA. Identification of the Syrian Hamster Cardiomyopathy Gene. *Human Molecular Genetics* 1997, 6 (4): 601-7.
- Nishimura J, Kanaide H, Nakamura M. Binding of [<sup>3</sup>H]Prazozin to Porcine Aortic Membranes: Interaction of Calcium Antagonists with Vascular *Alpha*-1 Adrenoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1985, 236 (no.3): 789-93.
- Noll G, Lüscher TF. Comparative Pharmacological Properties Among Calcium Channel Blockers: T-channel Versus L-channel Blockade. *Cardiology* 1998, 89 (suppl 1): 10-5.

- Nuss HB, Houser SR. T-type Current is Expressed in Hypertrophied Adult Feline Left Ventricular Myocytes. *Circ Res* 1993, 73: 777-82.
- Okazaki Y, Okuizumi H, Ohsumi T, Nomura O, Takada S, Kamiya M, Sasaki N, Matsuda Y, Nischimura M, Tagaya O, Muramatsu M, Hayashizaki Y. A Genetic Linkage Map of the Syrian Hamster and Localization of Cardiomyopathy Locus on Chromosome 9qa2.1-b1 using RLGS Spot-mapping. *Nature Genet* 1996, 13: 87-90.
- Olbrich HG, Bocker JF, Rachor S, Ketelsen UP, Wieland H, Kober G, Schmidt A, Mutschler E. Effect of Magnesium Pyridoxal 5-Phosphate Glutamate on the Hamster Cardiomyopathy. *Drug Res* 1992, 42 (1): 292-6.
- Oparil S, Bernink P, Bursztyn M, Carney S, Kobrin I. Antihypertensive Effects of Mibefradil in the Treatment of Mild-to-Moderate Systemic Hypertension. *Am J Cardiol* 1997, 80 (suppl. 4B): 12C-19C.
- Opie LH, Bühler FR, Fleckenstein A, Hansson L, Harrison DC, Poole-Wilson PA, Schwartz A, Vanhoutte PM, Braunwald E, Nayler WG, Paoletti R, Conti R, Rapaport E, Godfrind T, Snyder S,

Kübler W. International Society and Federation of Cardiology: Working group on Classification of Calcium Antagonists for Cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 1987, 60: 630-2.

Orito K, Satoh K, Taira N. Cardiovascular Profile of Ro 40-5967, a New Nondihydropyridine Calcium Antagonist, Delineated in Isolated, Blood-Perfused Dog Hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993, 22: 293-9.

Osterrieder W, Holck M. In Vivo Pharmacologic Profile of Ro 40-5967, a Novel Ca<sup>2+</sup> Channel Blocker with Potent Vasodilator but Weak Inotropic Action. *J cardiovasc. Pharmacol* 1989, 13: 754-759.

Panagia V, Singh JN, Anand-Srivastava MB, Pierce GN, Jasmin G, Dhalla NS. Sarcolemmal Alterations During the Development of Genetically Determined Cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1984, 18: 567-72.

Panagia V, Lee SL, Singh A, Pierce G, Jasmin G, Dhalla NS. Impairment of Mitochondrial and Sarcoplasmic Reticular Functions During the Development of Heart Failure in Cardiomyopathic (UM-X 7.1) Hamsters. *Can J Cardiol* 1986, 2: 236-47.

- Papahadjapoulos D, Cowden M, Kimelberg H. Role of Cholesterol in Membranes. Effects on Phospholipid-Protein Interactions, Membrane Permeability and Enzyme Activity. *Biochim biophys acta* 1973, 330: 8-26.
- Paulson DJ. Carnitine Deficiency-Induced Cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 1998, 180 (1-2): 33-41.
- Preedy VR, Richardson PJ. Alcoholic Cardiomyopathy: Clinical and Experimental Pathological Changes. *Herz* 1996, 21(4):241-7.
- Proscheck L, Jasmin G. Hereditary Polymyopathy and Cardiomyopathy in the Syrian Hamster: II. Development of Heart Necrotic Changes in Relation to Defective Mitochondrial Function. *Muscle and Nerve* 1982, 5 (1): 26-32.
- Ratner EI, Bochkov VN, Tkachuk VA. Comparison of Binding of <sup>3</sup>H-Desmethoxyverapamil and <sup>3</sup>H-Mibéfradil in vascular Smooth Muscle and Heart Membranes. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1996, 46 (II): 953-5.
- Ravens U, Davia K, Davies CH, O'Gara P, Drake-Holland AJ, Hynd JW, Noble MI, Harding SE. Tachycardia-Induced Failure Alters Contractile Properties of Canine Ventricular Myocytes. *Cardiovas Res* 1996, 32(3): 613-21.

- Richard V, Tron C, Blanc T, Thuillez C. Infarct Size-Limiting Properties of Ro 40-5967, a Novel Nondihydropyridine Calcium Channel, in Anesthetized Rats: Comparison with Vérapamil. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, 25: 552-7.
- Roberds SI, Ervasti JM, Anderson, RD, et al. Disruption of the Dystrophin-Glycoprotein Complex in the Cardiomyopathic Hamster. *J Biol Chem* 1993, 268: 11496-9.
- Rouleau JL, Chuck LHS, Hollosi G, Kidd P, Sievers R, Wikman-Coffelt J, Parmley W. Verapamil Preserves Myocardial Contractility in the Hereditary Cardiomyopathy of the Syrian Hamster. *Circ Res* 1982, 50: 405-12.
- Roux S, Bühler M, and Clozel JP. Mechanism of the Antiischemic Effect of Mibefradil, a Selective T Calcium Channel Blocker in Dogs: Comparison with Amlodipine. *J. of Cardiovasc. Pharmacol* 1996, 27: 132-9.
- Rutledge A, Triggle DJ. The Binding Interactions of Ro-40-5967 at the L-type  $Ca^{2+}$  Channel in Cardiac Tissue. *Eur J pharmacol* 1995, 280: 155-8.

Saap JL, Howlett SE. Density of Ryanodine Receptors is Increased in sPSarcoplasmic Reticulum from Prehypertrophic Cardiomyopathic Hamster heart. *J Mol Cell Cardiol* 1994, 26: 325-34.

Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka. Both Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathies are Caused by Mutation of the Same Gene, Delta-Sarcoglycan, in Hamster: An Animal Model of Disrupted Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex. *Med Sci* 1997, 94: 13873-8.

Schaffard SW, Tan BH, Wilson GL. Development of a Cardiomyopathic in a Model of Noninsulin-Dependant Diabetes. *Am J Physiol* 1985, 248 (2 pt 2): H179-H185.

Schlesinger MJ, Reiner L. Focal Myocytolysis of the Heart. *Am J Pathol* 1955, 31 (3): 443-59.

Schmitt R, Kleinbloesem CH, Belz GG, Schroeter V, Feifes U, Pazenel H, Kirch W, Halabi A, Woittiez A, Welker H, van Brummelen P. Hemodynamic and Humoral Effects of the Novel Antagonist Ro 40-5967 in Patients with Hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 1992, 52: 314-23.

- Schwartz A, Sordahl LA, Entman ML, Allen JC, Reddy YS, Goldstein MA, Luchi RJ, Wyborny LE. Abnormal Biochemistry in Myocardial Failure. *Am J Cardiol* 1973, 32: 407-22.
- Sen L, and Smith T. T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels Are Abnormal in Genetically Determined Cardiomyopathic Hamster Hearts. *Circ Res* 1994, 75: 149-55.
- Shinbane JS, Wood MA, Jensen DN, Ellenbogen KA, Fitzpatrick AP, Scheinman MM. Tachycardia-Induced Cardiomyopathy: a Review of Animal Models and Clinical Studies. *J Am Coll Cardiol* 1997, 29 (4): 709-15.
- Slack BE, Boegman RJ, Downie JW, Jasmin G. Cardiac Membrane Cholesterol in Dystrophic and Verapamil-Treated Hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1980, 12: 179-85.
- Smith HJ, Nuttall A. Experimental Models of Heart Failure (Review). *Cardiovasc Res* 1985, 19: 181-6.
- Sole, MJ. Kamble, AB. Hussain, MN. A Possible Change in the Rate-Limiting Step for Cardiac Norepinephrine Synthesis in the Cardiomyopathic Syrian Hamster. *Circ Res* 1977, 41: 814-7.

- Sole MJ, Factor SM. In: *Pathogenesis of Stress-Induced Heart Disease*. Edited by Beamish RE, Panagia V, Dhalla NS. Kluwer Academic Publishers: Boston, 1984: p. 34.
- Sonnenblick E, Fein F, Capasso J, Factor M. Microvascular Spasm as a Cause of Cardiomyopathies and the Calcium-Blocking Agent Verapamil as Potential Primary Therapy. *Am J Cardiol* 1985, 55: 179B-184B.
- Takada S, Okazaki Y, Kamiya M, Ohsumi T, Nomura O, Okuizumi H, Sasaki N, Shibata H, Mori M, Nishimura M, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Matsuda Y. Five Candidate Genes for Hamster Cardiomyopathy were not Mapped on the Cardiomyopathy Locus by FISH Analysis. *DNA Res* 1996, 3: 273-6.
- Tawada-Iwata Y, Imagawa T, Yoshida A, Takahashi M, Nakamura H, Shigekawa M. Increased Mechanical Extraction of T-Tubule/junctional SR from Cardiomyopathic Hamster heart. *Am J Physiol* 1993, 264: H1447-H1453.
- Teo KK, Ignaszewski AP, Gutierrez R, Hill KL, Martin SL, Calhoun HP, Humen DP, Montague TJ. Contemporary Medical Management of the Left Ventricular Dysfunction and Congestive Heart Failure. *Can J Cardiol* 1992, 8 (6): 611-9.

- Teerlink JR, Gray GA, Clozel M, Clozel JP. Increases vascular responsiveness to norepinephrine in rats with heart failure endothelium dependant. *Circulation* 1994, 89: 393-401.
- Toyoda Y, Okada M, Kashem MA. A Canine Model of Dilated Cardiomyopathy Induced by Repetitive Intracoronary Doxorubicin Administration. *J Thoracic and Cardiovasc Surgery* 1998, 115(6): 1367-73.
- Tsien RW, Tsien RY. Calcium Channels, Stores, and Oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 1990, 6: 715-60.
- Turner PR, Fomg P, Denetclaw WF, Steinhard RA. Increased Calcium Influx in Dystrophic Muscle. *J Cell Biol* 1991, 115: 1701-12.
- Ueyama T, Ohkusa T, Hissamatsu Y, Nakamura Y, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Alterations in Cardiac SR  $Ca^{2+}$  Channels During Development of Heart Failure in Cardiomyopathic Hamsters. *Am J Physiol* 1998, 274: H1-H7.
- Valdivia HH, Valdivia C, Ma, JM, Coronado R. Direct Binding of Verapamil to the Ryanodine Receptor Channel of Sarcoplasmic Reticulum. *Biophys J* 1990, 58: 471-81.

- Vander Heide RS, Schwartz LM, Reiner KA. The Novel Calcium Antagonist Ro 40-5967 Limits Myocardial Infarct Size in the Dog. *Cardiovasc Res* 1994, 28: 1526-32.
- Vassort G, Alvarez J. Cardiac T-Type Calcium Current: Pharmacology and Roles in Cardiac Tissues. *J Cardiovasc. Electrophysiol* 1994, 5: 376-93.
- Vikstrom KL, Factor SM, Leinwand LA. Mice Expressing Mutant Myosin Heavy Chains Are a Model for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy, *Mol Med* 1996, 2 (5): 556-67.
- Wagner JA, Reynolds IJ, Weisman HF, Dudeck P, Weisfeldt M, Snyder SH. Calcium Antagonist Receptors in Cardiomyopathic Hamster: Selective Increase in Heart Muscle and Brain. *Science* 1986, 232: 515-8.
- Wagner JA, Weisman HF, Snowman AM, Reynolds IJ, Weisfeldt ML, Snyder SH. Alterations in Calcium Antagonist Receptors and Sodium-Calcium Exchange in Cardiomyopathic Hamster Tissues. *Cardiovasc Res* 1989, 65 (1): 205-24.

- Wikman-Coffelt, J Sievers, R, Parmley WW, Jasmin G.  
Cardiomyopathic and Healthy Acidotic Hamsters Hearts:  
Mitochondrial Activity May Regulate Cardiac Performance.  
*Cardiovasc Res* 1986, 20: 471-81. <sup>a</sup>
- Wikman-Coffelt J, Sievers R, Parmley WW, Jasmin G. Verapamil  
Preserves Adenine Nucleotide Pool in Cardiomyopathic Syrian  
Hamster. *Am J Physiol* 1986, 250: H22-28. <sup>b</sup>
- Wiltshire HR, Sutton BM, Heeps GM, Betty AM, Angus DW, Harris  
SR, Worth E, Welker HA. Metabolism of the calcium antagonist,  
mibefradil (POSICOR<sup>TM</sup>, Ro 40-5967). Comparative  
pharmacokinetics of mibefradil and its major metabolites in rat,  
marmoset, cynomolgus monkey and man. *Xenobiotica* 1997, 27:  
557-71.
- Wrogemann K, Pena SDJ. Mitochondrial Calcium Overload: A General  
Mechanism of Cell-Necrosis in Muscle Diseases. *Lancet* 1976, 1:  
672-4.
- Wrogemann K, Nysten EG. Mitochondrial Calcium Overloading in  
Cardiomyopathic Hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1978, 10: 185-95.
- Xu X, Best PM. Postnatal Changes in T-type Calcium Current Density  
in Rat Atrial Myocytes. *J Physiol* 1992, 454: 657-72.

- Zatuchni J, Aegerter FF, Molthan L, Shuman C. The Heart in Progressive Muscular Dystrophy. *Circulation* 1951, 3: 846-53.
- Zerning G, Glossmann H. A Novel 1,4-Dihydropyridine Site on Mitochondrial Membranes from Guinea Pig Heart, Liver and Kidney. *Biochem J* 1988, 253: 49-58.
- Zerning G, Moshhammer T. Characterization of a Phenylalkylamine-Binding Site Allosterically Coupled to the High-Capacity Low-affinity 1,4-Dihydropyridine Binding Site in Mitochondria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch* 1992, 339 (suppl.): R45.
- Zhou Z, Lipsius SL. T-type Calcium Current in Latent Pacemaker Cells Isolated From Cat Right Atrium. *J Mol Cell Cardiol* 1994, 26: 1211-9.
- Zsorér TT, Church JG. Calcium Antagonists: Pharmacodynamic Effects and Mechanisms of Action. *Drugs* 1983, 25: 93-112.