

Université de Montréal

**Implication du système rénine-angiotensine dans le
développement de la défaillance cardiaque**

par

Natacha Bastien

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)**

Décembre 1998

©Natacha Bastien, 1998



**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Cette thèse est intitulée:

**Rôle du système rénine-angiotensine dans le
développement de la cardiomyopathie du hamster Syrien**

présenté par:

Natacha Bastien

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Denis Deblois	président rapporteur
Dr. Chantal Lambert	directrice
Dr. Yves Théorêt	co-directeur
Dr. Jean Cusson	membre du jury
Dr. Richard Larivière	examineur externe
Dr. Christian Deschepper	représentant F.E.S

Thèse acceptée le: 99_06_11

SOMMAIRE

La participation du système rénine-angiotensine dans la régulation de la fonction cardiaque est bien établie. Des systèmes rénine-angiotensine existent dans plusieurs tissus cibles du système cardiovasculaire et une importante modulation de leur niveau d'activité est observée lors de certaines conditions pathologiques. Dans le coeur normal, l'angiotensine II module via le récepteur de type AT₁, l'inotropie, la chronotropie et le débit coronarien. Les conséquences possiblement associées à l'activation du système rénine-angiotensine cardiaque au cours de pathologies comme la défaillance cardiaque sont entre autres, l'hypertrophie, la fibrose interstitielle, la nécrose multifocale et l'induction d'arythmies.

Le hamster Syrien cardiomyopathique est un modèle génétique de défaillance cardiaque abondamment utilisé parce que son évolution progressive permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques qui sont impliqués et d'évaluer les effets d'interventions pharmacologiques à différents stades de la pathologie. Nous avons rapporté, dans ce modèle que le récepteur AT₁ à l'angiotensine II est surexprimé dans les ventricules et ce avant que les lésions cardiaques ne soient détectables. Ceci suggère que l'angiotensine II joue un rôle crucial dans la genèse et/ou le maintien de la cardiomyopathie du hamster. Une étude a donc été réalisée afin d'évaluer les effets d'un antagoniste spécifique du récepteur AT₁, le losartan, sur la sévérité des lésions histologiques, le degré d'hypertrophie ainsi que la survie des animaux cardiomyopathiques. Puisque des effets bénéfiques avaient déjà été rapportés avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion, le quinapril, un groupe quinapril a été inclus.

Des groupes de hamsters cardiomyopathiques de 50 jours ont donc été traités de façon chronique avec un placebo, une faible (30 mg/kg/jour) ou forte dose (100 mg/kg/jour) de losartan ou du quinapril (100 mg/kg/jour). À 175 et 325 jours, des animaux ont été sacrifiés pour la détermination de l'hypertrophie cardiaque. Les lésions histologiques ont été évaluées dans les ventricules de hamsters de 325 jours. Aucune différence d'incidence des lésions histologiques n'a été observée suite à l'administration de losartan ou de quinapril. L'hypertrophie cardiaque n'était pas significativement modifiée (30

mg/kg/jour) et elle était même augmentée par une dose de 100 mg/kg/jour de losartan alors qu'elle était diminuée par le quinapril. De façon inattendue, la forte dose de losartan (100 mg/kg/jour) a significativement diminué l'espérance de vie des animaux alors que le quinapril l'a significativement augmentée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats, entre autres, que dans ce modèle la contribution du système des kinines et/ou du récepteur AT_2 dans la progression et/ou la régression de l'hypertrophie soit importante. Il est également possible que la surexpression du récepteur AT_1 soit un phénomène adaptatif et que l'action inotrope positive de l'angiotensine II soit essentielle afin de soutenir un coeur défaillant. D'après les résultats de cette première étude, nous concluons néanmoins que le récepteur AT_1 cardiaque ne semble pas directement impliqué dans le développement ou la régression de l'hypertrophie cardiaque du hamster cardiomyopathique.

Parallèlement à cette étude et afin d'évaluer plus spécifiquement si le récepteur AT_1 cardiaque possède un rôle dans le développement de l'hypertrophie, les concentrations d'angiotensine II et la densité du récepteur AT_1 ventriculaire ont été déterminées suite aux traitements déjà mentionnés. Le blocage chronique du récepteur AT_1 a entraîné une diminution significative de la densité de ce récepteur alors qu'elle n'était pas modifiée par l'inhibition de l'ECA. Quant aux concentrations d'angiotensine II cardiaques, elles étaient significativement diminuées par le traitement au losartan et au quinapril. Les résultats de cette seconde étude supportent la conclusion de la première suggérant que le récepteur AT_1 cardiaque n'est pas directement impliqué dans le processus de remodelage chez le hamster cardiomyopathique.

Les altérations morphologiques et biochimiques présentes au cours de la cardiomyopathie du hamster Syrien sont bien décrites mais le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la dégénérescence du tissu cardiaque est (sont) encore mal connu(s). Puisque l'apoptose a été décrite dans de nombreux processus pathologiques, il était possible qu'elle soit impliquée dans le développement de la cardiomyopathie. Le marquage immunohistochimique (TUNEL) a permis de détecter des manifestations

apoptotiques dans les cellules myocytaires et non-myocytaires. Nous concluons que l'apoptose participe, tout comme la nécrose, à la perte myocytaire observée dans le myocarde suggérant qu'elle contribue au développement de l'hypertrophie et de la défaillance cardiaque chez le hamster cardiomyopathique.

Des recherches soutenues utilisant ce modèle expérimental de défaillance devrait conduire à une meilleure compréhension de la pathologie clinique ainsi qu'à l'élaboration de nouvelles approches pharmacologiques.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xv

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE

1.1 Introduction.....	1
1.2 Cascade d'activation du système rénine-angiotensine	1
1.3. Les récepteurs à l'angiotensine II: AT ₁ et AT ₂ AT(1-7) et AT ₄	3
1.3.1 Distribution tissulaire des récepteurs aux angiotensines	6
1.3.2 Voies de signalisation intracellulaire	6
1.3.3 Régulation des récepteurs à l'angiotensine II	8
1.3.4 Fonctions physiologiques du système rénine-angiotensine.....	8
1.3.4.1 Effets relayés par les récepteurs AT ₁	8
1.3.4.2 Effets relayés par les récepteurs AT ₂	11
1.3.4.3 Effets relayés par les récepteurs AT(1-7).....	11
1.3.4.4 Effets relayés par les récepteurs AT ₄	11
1.4.1 Système rénine-angiotensine cardiaque.....	12
1.4.2 Localisation des composantes du système rénine-angiotensine cardiaque.....	12
1.4.3 Fonctions physiologiques du système rénine-angiotensine cardiaque.....	13

2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DÉFAILLANCE CARDIAQUE

2.1 Introduction	16
2.2 Évolution de la défaillance cardiaque	16
2.2.1 Définition générale et signes cliniques	16
2.2.2 Mécanismes neurohumoraux compensatoires	16

2.2.3	Stade congestif	17
2.3	Modèle expérimental de la défaillance cardiaque: Le hamster Syrien cardiomyopathique	18
2.3.1	Intérêt du modèle	18
2.3.2	Évolution morphologique de la cardiomyopathie	19
2.3.3	Lésions myocardiques primaires	19
2.3.4	Fibrose	21
2.3.5	Hypertrophie ventriculaire	22
2.4	Altérations sous-cellulaires du myocarde.....	23
2.4.1	Anormalités de l'homéostasie calcique	23
2.4.2	Composition et activité des protéines de contraction	26
2.4.3	Identification du gène responsable de la cardiomyopathie.....	27
2.4.4	Métabolisme énergétique	27
2.4.5	Le système nerveux autonome	27
2.4.	Peptides natriurétiques.....	29
2.5	Aspects thérapeutiques	29

3. APOPTOSE ET MALADIES CARDIO-VASCULAIRES

3.1.	Apoptose: mécanisme, modulation, rôle physiologique	31
3.1.1	Introduction	31
3.1.2	Apoptose versus nécrose	31
3.1.3	Mécanismes moléculaires de l'apoptose	33
3.1.4	Modulateurs extracellulaires de l'apoptose	34
3.1.5	Modulateurs intracellulaires de l'apoptose	36
3.1.6	Contrôle génétique de l'apoptose	36
3.1.7	Importance physiologique de l'apoptose	38
3.2	Apoptose dans les maladies cardiovasculaires	39
3.2.1	Perte myocytaire après dommage au myocarde	39
3.2.2	Perte myocytaire dans l'hypertrophie et la défaillance cardiaque	39

4. SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET DÉFAILLANCE CARDIAQUE

4.1 Introduction	41
4.2 Modulation du système rénine-angiotensine	41
4.2.1 Concentrations d'angiotensine II plasmatique et tissulaire	41
4.2.2 Le système rénine-angiotensine cardiaque	42
4.2.3 Voies de synthèse d'angiotensine II alternatives.....	44
4.3 Contributions potentielles du système rénine-angiotensine dans la défaillance cardiaque.....	44
4.3.1 Effet extracardiaque du système rénine-angiotensine	44
4.3.2 Effets sur les lésions primaires du myocarde	45
4.3.3 Effet sur le remodelage ventriculaire	45
4.3.4 Effet sur la présence d'arythmies	47
4.3.5 Interaction avec d'autres systèmes neurohumoraux	47
4.3.6 Altération fonctionnelle du myocarde	49
4.3.7 Implication potentielle du récepteur AT ₂ dans la défaillance cardiaque	50

5. TRAITEMENT DE LA DÉFAILLANCE CARDIAQUE: LES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

5.1 Introduction	52
5.2 Vasodilatateurs.....	53
5.2.1 Inhibiteurs de l'ECA	53
5.2.2 Antagonistes du récepteur AT ₁ à l'angiotensine II	55
5.2.3 Autres substances vasodilatatrices	57
5.3 Diurétiques	58
5.4 Agents inotropes	59

6. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE

TRAVAIL	60
----------------------	----

CHAPITRE II - PRÉSENTATION DES MANUSCRIPTS	61
---	----

ARTICLE 1- CHRONIC AT₁ RECEPTOR BLOCKADE AND ACE INHIBITION IN (CHF 146) CARDIOMYOPATHIC HAMSTERS: Effects on cardiac hypertrophy and survival	62
--	----

ABSTRACT	65
-----------------------	----

INTRODUCTION	62
METHODS	69
RESULTS	76
DISCUSSION	86
ACKNOWLEDGEMENTS	92
REFERENCES	93
LEGENDS	100
ARTICLE 2- DOWN-REGULATION OF CARDIAC ANGIOTENSIN II AT₁ RECEPTORS EXPRESSION AND ANGIOTENSIN II CONCENTRATIONS AFTER CHRONIC BLOCKADE OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN CARDIOMYOPATHIC HAMSTERS	102
ABSTRACT	104
INTRODUCTION	105
METHODS	106
RESULTS	111
DISCUSSION	116
ACKNOWLEDGEMENTS	120
REFERENCES	121
LEGENDS	124
ARTICLE 3 - MYOCYTE APOPTOSIS AND THE CARDIOMYOPATHY OF THE SYRIAN HAMSTERS	125
ABSTRACT	126
INTRODUCTION	127
METHODS	128
RESULTS	133
DISCUSSION	142
ACKNOWLEDGEMENTS	146
REFERENCES	147
LEGENDS	151

CHAPITRE III - DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	153
1.0 ARTICLE 1	154
1.1 Problématique	154
1.2 Modèle expérimental de défaillance cardiaque.....	155
1.3 Choix et initiation de la thérapie.....	156
1.4 Voie AT ₁ -dépendante et AT ₁ -indépendante.....	157
2.0 ARTICLE 2	158
2.1 Problématique	158
2.2 Angiotensine II cardiaque	158
3.0 ARTICLE 3	159
3.0 Apoptose myocytaire et cardiomyopathie du hamster Syrien.....	159
3.1 Importance du système rénine-angiotensine et récepteurs AT ₁ et AT ₂	160
4.0 DISCUSSION GÉNÉRALE	161
4.1 Implication en pathologie humaine	161
4.2 Projets futurs	163
BIBLIOGRAPHIE	165
ANNEXE 1	196
ANNEXE 2	201

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.I: Principales propriétés pharmacologiques et biochimiques des sous-types de récepteurs aux angiotensines.....	5
Tableau I.II: Fonctions physiologiques possibles du système rénine-angiotensine cardiaque	14
Tableau II.I: Mécanismes neurohumoraux compensatoires en réponse à une diminution de la fonction cardiaque	17
Tableau III.I: Modulateurs neurohumoraux cardiovasculaires de l'apoptose.....	35
Tableau IV.I: Tableau récapitulatif des contributions potentielles des systèmes rénine-angiotensine II cardiaque et extra-cardiaques dans la physiopathologie de la défaillance cardiaque.....	50
Tableau V.I: Classification de la New York Association	52

ARTICLE 1

Table I	Incidence and intensity of calcification and fibrosis in septum and left ventricular walls of inbred control and cardiomyopathic hamsters of 325-day-old.....	79
Table II	Serum variables measured following placebo-, losartan- or quinapril-treatment to inbred control and cardiomyopathic hamsters.....	84
Table III	Pressor and chronotropic effects of losartan and quinapril in 350-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters.....	85

ARTICLE 2

Table I	Specific binding of ¹²⁵ I-sarile of ventricular angiotensin II AT ₁ receptors in inbred control and cardiomyopathic hamsters after chronic AT ₁ blockade and ACE inhibition.....	112
Table II	Ventricular angiotensin II concentrations in inbred control and cardiomyopathic hamsters in end-stage heart failure after chronic AT ₁ blockade and ACE inhibition.....	115

ARTICLE 3

Table I	Left ventricular surface in 50-, 175-, 350-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters.....	134
Table II	Number of TUNEL-positive nuclei per mm ² of left ventricular sections of inbred control and cardiomyopathic hamsters.....	136

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1:	Cascade d'activation du système rénine-angiotensine.....	2
Figure 1.2:	Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'angiotensine II.....	4
Figure 1.3:	Principaux effets physiologiques du système rénine-angiotensine extra- cardiaque dans l'homéostasie cardio-vasculaire	9
Figure 2.1:	Évolution morphologique de la cardiomyopathie du hamster Syrien.....	20
Figure 2.2:	Représentation schématique du mouvement calcique dans le sarcolemme....	24
Figure 3.1:	Différences morphologiques entre la nécrose et de l'apoptose.....	32
Figure 4.1:	Profils d'activité des systèmes rénine-angiotensine plasmatique et cardiaque au cours de la défaillance cardiaque chez le chien	42
Figure 4.2:	Interaction entre les systèmes neurohumoraux dans la défaillance cardiaque	48
ARTICLE 1		
Figure 1	Experimental groups.....	70
Figure 2	Dose-response curves to angiotensin II in untreated anesthetized and treated anesthetized animals 24 hours following oral administration of a single dose of losartan.....	71
Figure 3	Graph showing the effects of chronic treatment with placebo, low- or high-dose of losartan and quinapril on the probability of survival of cardiomyopathic hamsters.....	78
Figure 4	Graph showing body weights of inbred control treated with placebo or losartan and cardiomyopathic hamsters treated with placebo, low- or high-dose of losartan or quinapril determined at 50, 175 and 325 days of age.....	81
Figure 5	Graph showing ventricle/body weight ratio in 325-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters.....	82

ARTICLE 2

- Figure 1** Experimental groups.....108
- Figure 2** Representative competition binding curves of angiotensin II receptor antagonist for the binding of ^{125}I -sarile to ventricular membranes prepared from 175-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters.....114

ARTICLE 3

- Figure 1** Sections of left ventricular walls of 175-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters stained with an *in situ* fluorescein apoptotic detection kit and α -sarcomeric actin antibody.....135
- Figure 2** Sections of left ventricular wall of 50-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters stained with an *in situ* peroxidase apoptotic detection kit and HPS.....138
- Figure 3** Sections of left ventricular wall of 175-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters stained with an *in situ* peroxidase apoptotic detection kit and HPS.....139
- Figure 4** Electron micrograph of left ventricular sections of cardiomyopathic hamsters of 175 days of age.....141

REMERCIEMENTS

Au docteur Chantal Lambert, ma directrice de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire puis formée pendant toutes ces années. Sa rigueur scientifique, son souci d'excellence et du détail qu'elle a partagé m'ont inspiré une très grande admiration.

Au docteur Yves Théorêt, mon co-directeur de recherche qui a su me faire partager son expertise, sa rigueur scientifique mais également pour son humanisme.

Au docteur Juan Saavedra pour m'avoir reçu dans son laboratoire et appris la technique d'autoradiographie quantitative des récepteurs à l'angiotensine II.

Au docteur Sylvain Meloche pour sa participation scientifique dans la réalisation des études de liaison et ses judicieux conseils.

À Marc Servant pour sa collaboration scientifique et formation technique dans la réalisation des études de liaison des récepteurs mais également pour son support amical.

Au docteur André De Léan pour ses conseils avisés et pour nous avoir permis d'utiliser son équipement dans le cadre des études de liaison des récepteurs.

À Marie-France Legault pour sa contribution technique à nos travaux et pour l'initiation technique dans les protocoles impliquant des animaux.

À Elisabeth Perez pour son excellente contribution quant à la préparation des exposés oraux, affiches et publications.

À Hélène Maurice Courteau et Lucie Héroux pour leur bonne humeur et leur support amical.

À Francine Côté pour son sourire, sa joie de vivre communicative.

Je remercie la Faculté des études supérieures, la société Bio-Méga Boehringer Ingerheim, Merck Frosst Canada et l'Hôpital St-Justine de m'avoir permis de bénéficier de Bourses de recherche pendant mes études doctorales.

À Yvette

À Sylvia

Et à Roland

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.0 Le système rénine-angiotensine

1.1 Introduction

Tiegerstedt et Bergman (1898) ont été les premiers à observer que l'injection d'un extrait rénal chez le lapin augmente la pression artérielle. La substance active contenue dans cet extrait, la rénine, s'est avérée par la suite être l'enzyme initiale de la cascade conduisant à la formation de la molécule pressive, l'angiotensine II (Kohlstaedt et coll., 1938; Page et coll., 1940). Des études réalisées depuis plus d'une soixantaine d'années ont permis de montrer que ce peptide possède un spectre d'action étendu et complexe affectant l'ensemble du système cardiovasculaire.

1.2 Cascade d'activation du système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine a traditionnellement été connu comme un régulateur important de la pression artérielle systémique, du volume sanguin circulant et de la balance hydrosodée. La cascade d'activation de ce système (**figure 1.1**) est initiée par la synthèse hépatique d'un peptide inactif, l'angiotensinogène, qui est relâché constitutivement dans la circulation sanguine. La rénine, une endopeptidase produite et sécrétée par le rein, clive l'angiotensinogène circulant en angiotensine I, un décapeptide. Par la suite, l'action de l'enzyme de conversion (ECA) des cellules endothéliales sur l'angiotensine I génère la molécule active, l'angiotensine II, un octapeptide. L'angiotensine (1-7) peut également être générée à partir de l'angiotensine I par des endopeptidases spécifiques neutres ou de l'angiotensine II par une carboxypeptidase (Dimitrov et coll., 1997). La demi-vie plasmatique de l'angiotensine II est d'environ 15-30 secondes (Hodge et coll., 1967; Al-Merani et coll., 1978). La présence d'aminopeptidases circulantes est responsable du métabolisme rapide de l'angiotensine II en angiotensine III et angiotensine IV (3-8), respectivement un hepta- et un hexapeptide. L'angiotensine III possède une activité qui contribue aux effets physiologiques de l'angiotensine II. Par ailleurs, bien que des récepteurs à l'angiotensine (1-7) et l'angiotensine IV (3-8) existent, l'activité physiologique de ces peptides n'est pas connue. Cependant, ils semblent exercer des activités physiologiques opposés à celles de l'angiotensine II (Swanson et coll., 1992; Ferrario et Iyer, 1998). Des voies alternatives de

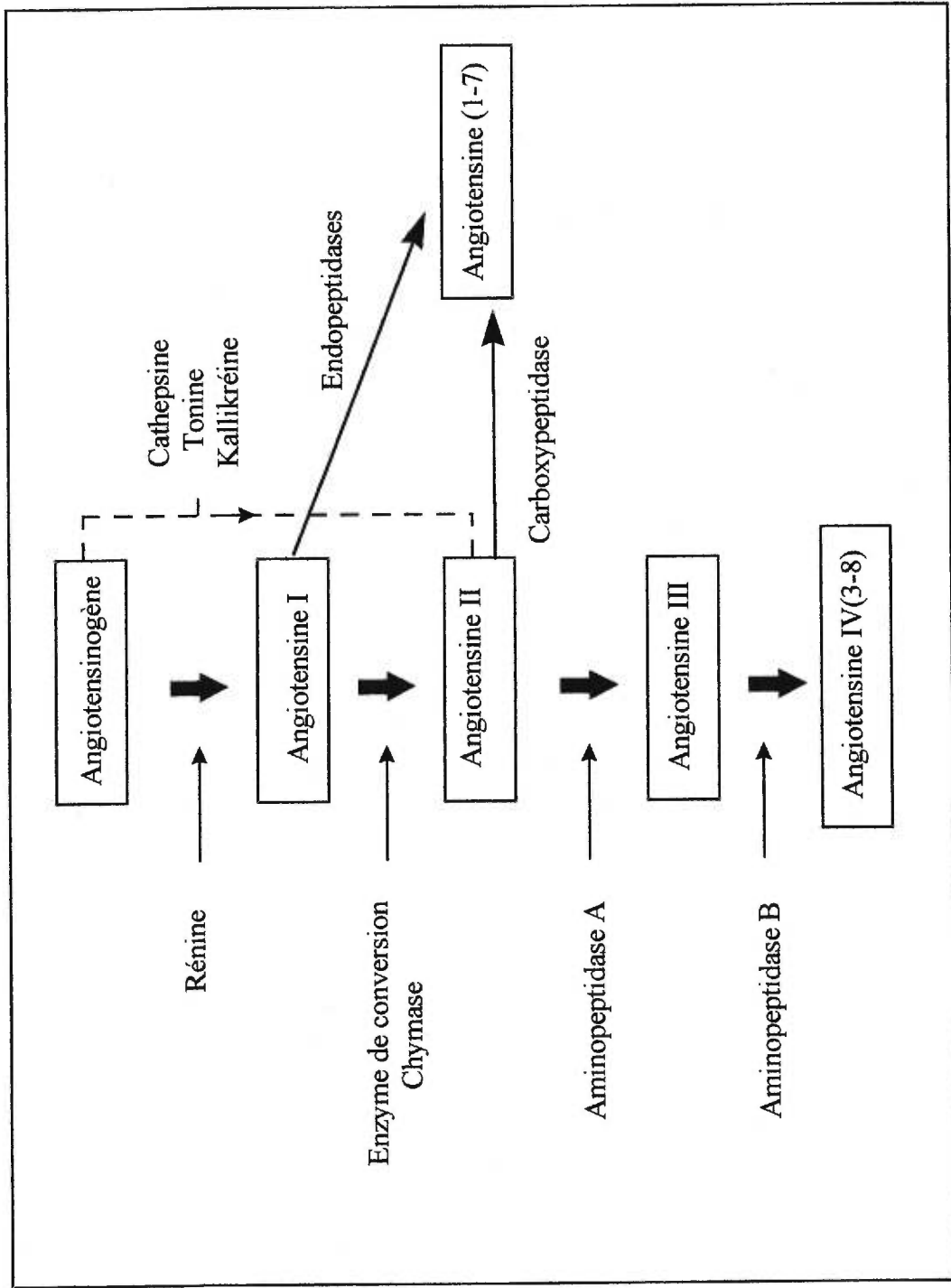


Figure 1.1: Cascade d'activation du système rénine-angiotensine. La ligne pointillée indique la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine II par la cathepsine, la tonine et la kallikréine.

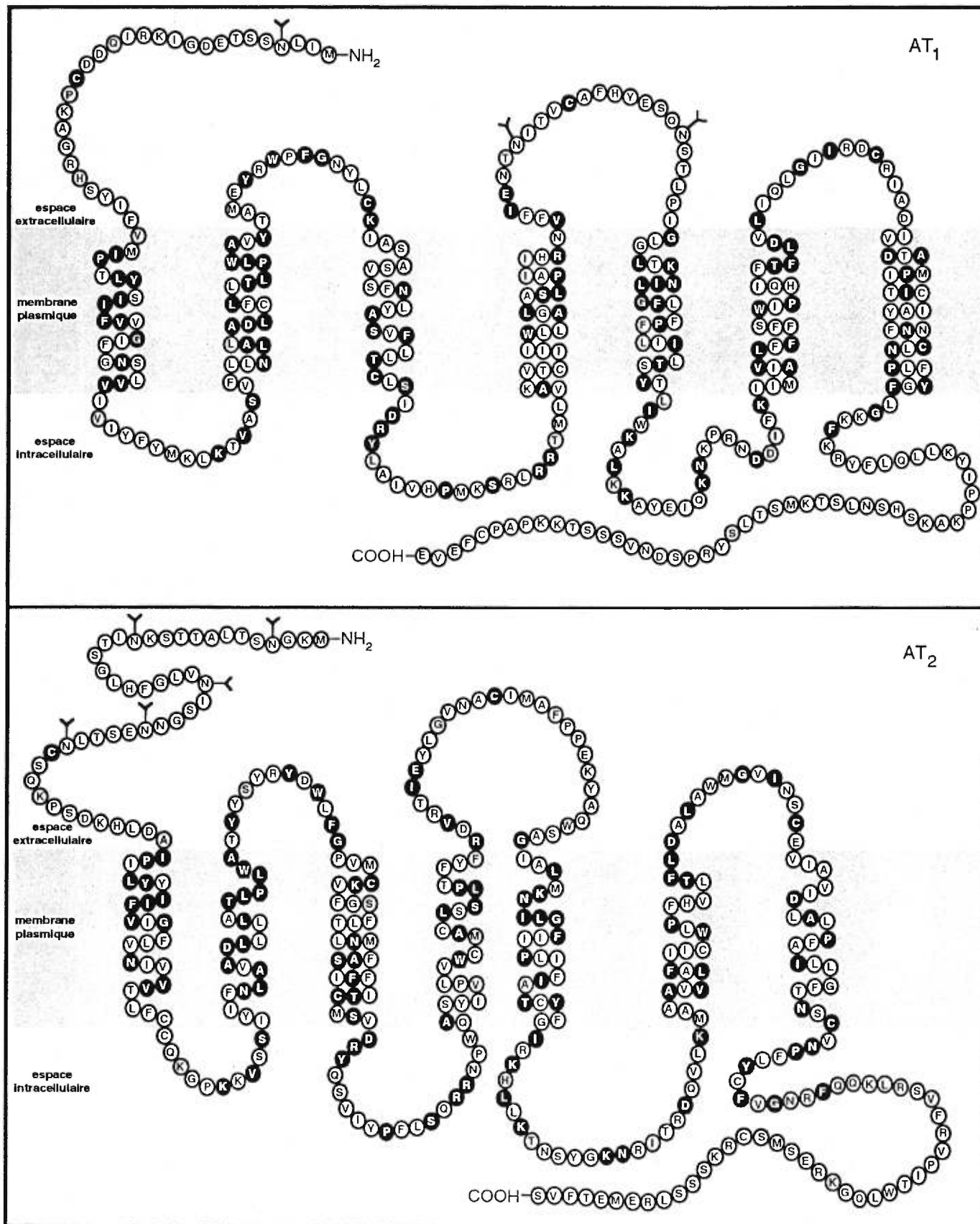
conversion de l'angiotensinogène en angiotensine II par des enzymes telles la cathepsine, la tonine et la kallikréine, ont de plus été décrites mais leur contribution dans la formation de l'angiotensine II demeure à déterminer (Phillips et coll., 1993).

Chez la plupart des espèces animales étudiées, la seule voie de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II est celle de l'ECA. Cependant, chez le hamster, le chien et l'humain, la formation d'angiotensine II semble dépendre de l'action de l'ECA et/ou de celle d'une enzyme de la famille des sérines protéases, la chymase. Cette dernière est une des enzymes des plus efficaces et des plus spécifiques pour la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (Urata et coll., 1990). L'importance physiologique de cette deuxième voie de formation n'est toutefois pas clarifiée.

1.3. Les récepteurs à l'angiotensine II: AT₁, AT₂, AT₄ et AT(1-7)

Les effets de l'angiotensine II sont relayés par des récepteurs situés sur la membrane plasmique des cellules. L'utilisation d'antagonistes sélectifs a permis la caractérisation de deux sous-types majeurs de récepteurs à l'angiotensine II, désignés par la suite AT₁ et AT₂ (Timmermans et coll., 1993). Les structures primaires obtenues par clonage moléculaire des récepteurs AT₁ et AT₂ sont maintenant connues (Inagami et coll., 1994; Nahmias et coll., 1995) (**figure 1.2**). La séquence des récepteurs AT₁ et AT₂ est faiblement homologue avec 30 à 35% de résidus identiques. Toutefois, ces deux sous-types possèdent des séquences très conservées susceptibles d'être impliquées dans la liaison du ligand. Dans toutes les espèces étudiées, le récepteur AT₁ possède des résidus cystéine distribués dans les domaines extracellulaires suggérant la présence de ponts disulfures. Ces derniers permettraient la stabilisation de la structure tertiaire du récepteur et ils expliqueraient sa sensibilité aux agents réducteurs responsables de leur interruption. Les caractéristiques biochimiques et pharmacologiques de ces deux sous-types de récepteurs sont bien décrites (**tableau I.I**) (Chassagne et coll., 1996). Des isoformes du récepteur AT₁ ont été retrouvées chez le rat et la souris mais pas chez l'homme. Elles ont été désignées AT_{1a} et AT_{1b}. Elles possèdent des caractéristiques fonctionnelles similaires avec toutefois une distribution tissulaire différente. Bien qu'identifiée dans plusieurs tissus, la structure primaire du récepteur AT₄ n'a pas été

Figure 1.2: Structure primaire et représentation schématique des récepteurs à l'angiotensine II. Les résidus identiques entre les deux protéines sont indiqués par des cercles foncés. Les sites^dde N-glycosylation sont représentés par le signe Y. Reproduit selon Chassagne et coll. (1996).



clonée jusqu'à maintenant. Des travaux récents de Bernier et coll. (1998) et de Zhang et coll. (1998) ont cependant permis de mettre en évidence quelques caractéristiques de ce récepteur présentées également dans le **tableau 1.1**. Le site de liaison de l'angiotensine (1-7) n'a pas encore été caractérisé cependant de nombreuses études suggèrent que les effets de l'angiotensine (1-7) sont relayés par un récepteur distinct du récepteur AT₁, AT₂ ou AT₄ (Ferrario et Iyer, 1998).

Tableau 1.1 Principales propriétés pharmacologiques et biochimiques des récepteurs AT₁, AT₂ et AT₄ de l'angiotensine II

	AT ₁	AT ₂	AT ₄ ¹
Ordre de puissance	Ang II > Ang III	Ang III > Ang II	Ang IV > Ang II
Antagonistes sélectifs	Losartan (Dup753); EXP3174; DuP532; GR117289;TCV116	PD123317; PD123319; PD121981;PD124125	divalinal-Ang IV
Agents réducteurs	Inactivation	Augmentation	?
Couplage aux protéines G	Oui	Oui/Non	?
Voies de signalisation	↓ Adénylyl cyclase ↑ PLC ↑ PLA ₂ ↑ PLD ↑ Canal Ca ²⁺ voltage- dépendant et opéré par un récepteur	↓ GMPc ↑ PLA2 ↑/↓ Tyrosine phosphatase	?
Structure	359 acides aminés 7 domaines transmembranaires	363 acides aminés 7 domaines transmembranaires	165-186 kDa glycoprotéine sous-unités multiples

Modifié selon Chassagne et coll. (1996). 1 = ajouts Bernier et coll, (1998) et Zhang et coll. (1998).

1.3.1 Distribution tissulaire des récepteurs aux angiotensines II, (1-7) et IV

La distribution des récepteurs à l'angiotensine II est hétérogène et elle varie selon l'organe, l'espèce et le stade de développement. Dans toutes les espèces étudiées, la presque totalité des fonctions physiologiques de l'angiotensine II est anatomiquement et fonctionnellement associée au récepteur AT₁ (Edwards et coll., 1994). Ainsi, ce récepteur est présent dans les principaux organes qui contribuent à l'homéostasie cardiovasculaire : les vaisseaux sanguins, les reins, le coeur, les surrénales et le cerveau. Ce récepteur est de plus retrouvé dans le foie et les poumons. La distribution du récepteur AT₂ diffère sensiblement de celle du récepteur AT₁ et elle est plus étendue dans les tissus foetaux et néonataux que dans les tissus adultes. À ces stades précoces, le récepteur AT₂ est abondamment retrouvé dans la peau, le tractus gastro-intestinal, le muscle squelettique, le coeur, l'aorte et le cerveau. Chez le rat, la proportion des récepteurs de l'angiotensine II, déterminée par le ratio AT₁:AT₂, est alors 20:80. Le niveau d'expression tissulaire du récepteur AT₂ diminue cependant drastiquement après la naissance (Edwards et coll., 1994). Chez l'adulte, l'expression du récepteur AT₂ est limitée à quelques organes et le ratio AT₁:AT₂ est généralement inversé (80:20).

Bien que le site de liaison de l'angiotensine (1-7) n'ait pas été caractérisé, des effets de ce peptide ont été observés dans les vaisseaux sanguins, les reins et le cerveau. La distribution exacte ainsi que son abondance tissulaire est présentement à l'étude puisqu'un antagoniste de ce site de liaison, le A-799, est maintenant disponible.

Le récepteur AT₄ a été identifié chez plusieurs espèces animales incluant le rat, le lapin, le porc, le singe et l'humain. Celui-ci est retrouvé abondamment dans le coeur, l'aorte, les reins, les surrénales et le cerveau (Zhang et coll., 1998). La distribution tissulaire des récepteurs AT₄ par rapport à celles des récepteurs AT₁ et AT₂ n'a pas encore été étudiée.

1.3.2 Voies de signalisation intracellulaire

Les récepteurs à l'angiotensine II sont couplés à différents systèmes de transmission du signal (Lassègue et coll., 1994). Le récepteur AT₁ appartient à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les voies de signalisation de ce récepteur sont multiples et elles dépendent du type cellulaire impliqué. La liaison de l'angiotensine II au

récepteur AT_1 active les phospholipases C, D et A_2 ainsi que les canaux calciques dépendants du voltage ou activés par un récepteur. Elle inhibe de plus l'adénylyl cyclase. L'activation de la phospholipase C permet la formation de deux seconds messagers, l'inositol triphosphate et le diacylglycérol. L'inositol triphosphate se lie aux récepteurs des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique induisant la relâche de calcium intracellulaire. Le calcium et le diacylglycérol agissent en synergie pour activer la protéine kinase C responsable de fonctions cellulaires spécifiques. Par ailleurs, l'activation de la phospholipase D produit l'hydrolyse de la phosphatidylcholine des membranes en acide phosphatidique et en choline. Bien que son rôle comme second messager demeure controversé, il est suggéré que l'acide phosphatidique soit convertie en diacylglycérol par une phosphohydrolase favorisant ainsi son accumulation intracellulaire (Lassègue et coll., 1994). Une fois activée, la phospholipase A_2 donne lieu à la formation de phospholipides et d'acides gras dont certains (l'acide arachidonique) sont impliqués dans la synthèse de prostaglandines et de leukotriènes. Enfin, l'inhibition de l'adénylyl cyclase par l'angiotensine II par l'intermédiaire de la protéine G_i diminue la génération du second messager AMPc (Lassègue et coll., 1994).

Les mécanismes de transmission du signal du récepteur AT_2 sont moins bien compris. Bien que le récepteur AT_2 possède une structure à sept domaines transmembranaires, son couplage à une protéine G n'a toutefois pas encore été démontré. Tout comme le récepteur AT_1 , ses mécanismes de transmission dépendent du type cellulaire et/ou tissulaire impliqué. En ce sens, il a été démontré que la liaison de l'angiotensine II au récepteur AT_2 conduit à une diminution de la production de GMPc et à une activation de la phospholipase A_2 et soit à une inhibition ou à une stimulation de l'activité d'une phosphotyrosine phosphatase. Les voies de signalisation du récepteur AT_2 ne semblent pas impliquer l'inositol triphosphate ou le calcium intracellulaire comme seconds messagers (Chassagne et coll., 1996).

Les voies de signalisation impliquées dans les effets de l'angiotensine (1-7) semblent différentes de celles de l'angiotensine II puisque ce peptide n'active pas la phospholipase C ou la relâche d'inositol triphosphate dans les astrocytes (Tallant et coll., 1997). De plus, elle ne stimule pas la phospholipase D, elle ne produit pas de diacylglycérol et enfin elle n'augmente pas le calcium intracellulaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Jaiswal et coll., 1993; Freeman et coll., 1995).

Les seconds messagers associés au récepteur AT_4 sont peu ou pas connus. Dans certains types cellulaires, une légère augmentation ou une absence d'effet sur le calcium intracellulaire est observée suite à une stimulation à l'angiotensine IV. Dans d'autres types cellulaires, l'angiotensine IV n'affecte pas la production basale de l'adénylyl et de la guanylate cyclases sans ou après stimulation avec la forskoline ou le peptide natriurétique (Moeller et coll., 1998). Une étude récente rapporte toutefois une élévation des niveaux de GMPc dans les cellules artérielles pulmonaires suite à une stimulation à l'angiotensine IV (Patel et coll., 1998). Enfin, l'angiotensine IV via l'activation du récepteur AT_4 ne semble pas affecter la voie de l'inositol triphosphate et des dérivés de l'acide arachidonique (Briand et coll., 1998).

1.3.3 Régulation des récepteurs à l'angiotensine II

Des modifications du niveau d'expression des récepteurs à l'angiotensine II peuvent être induites par différents mécanismes. Premièrement, il est reconnu que le mécanisme de régulation de l'expression des récepteurs à l'angiotensine II le plus puissant est l'agoniste lui-même (Gunther et coll., 1980). Dans la plupart des systèmes étudiés, la désensibilisation du récepteur en réponse à leur activation par l'angiotensine II survient par phosphorylation ou par internalisation du récepteur qui est, par la suite, dégradé ou recyclé à la membrane. Deuxièmement, le niveau d'expression des transcrits du récepteur peut contribuer à la régulation des sites de liaison de l'angiotensine II (Iwai et coll., 1992). Troisièmement, le système sympathique (noradrénaline), certains facteurs hormonaux (estrogènes, progestérones) et le monoxyde d'azote modulent l'expression des récepteurs à l'angiotensine II (; Cahill et coll., 1995; Hunt et coll., 1995; Iwami et coll., 1996; Kakar et coll., 1992).

1.3.4 Fonctions physiologiques du système rénine-angiotensine

1.3.4.1 Effets relayés par le récepteur AT_1

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du système rénine-angiotensine a contribué de façon majeure à la compréhension des effets de l'angiotensine II. Les fonctions les plus connues de l'hormone sont associées au maintien de la pression artérielle et de l'équilibre hydrosodé (**figure 1.3**). L'angiotensine II est un puissant peptide vasopresseur qui est approximativement 40 fois plus puissant que la noradrénaline (Jackson et coll., 1996). Elle augmente la résistance périphérique totale par ses actions vasoconstrictrices directe et indirecte sur l'ensemble du réseau artériel. Une large composante

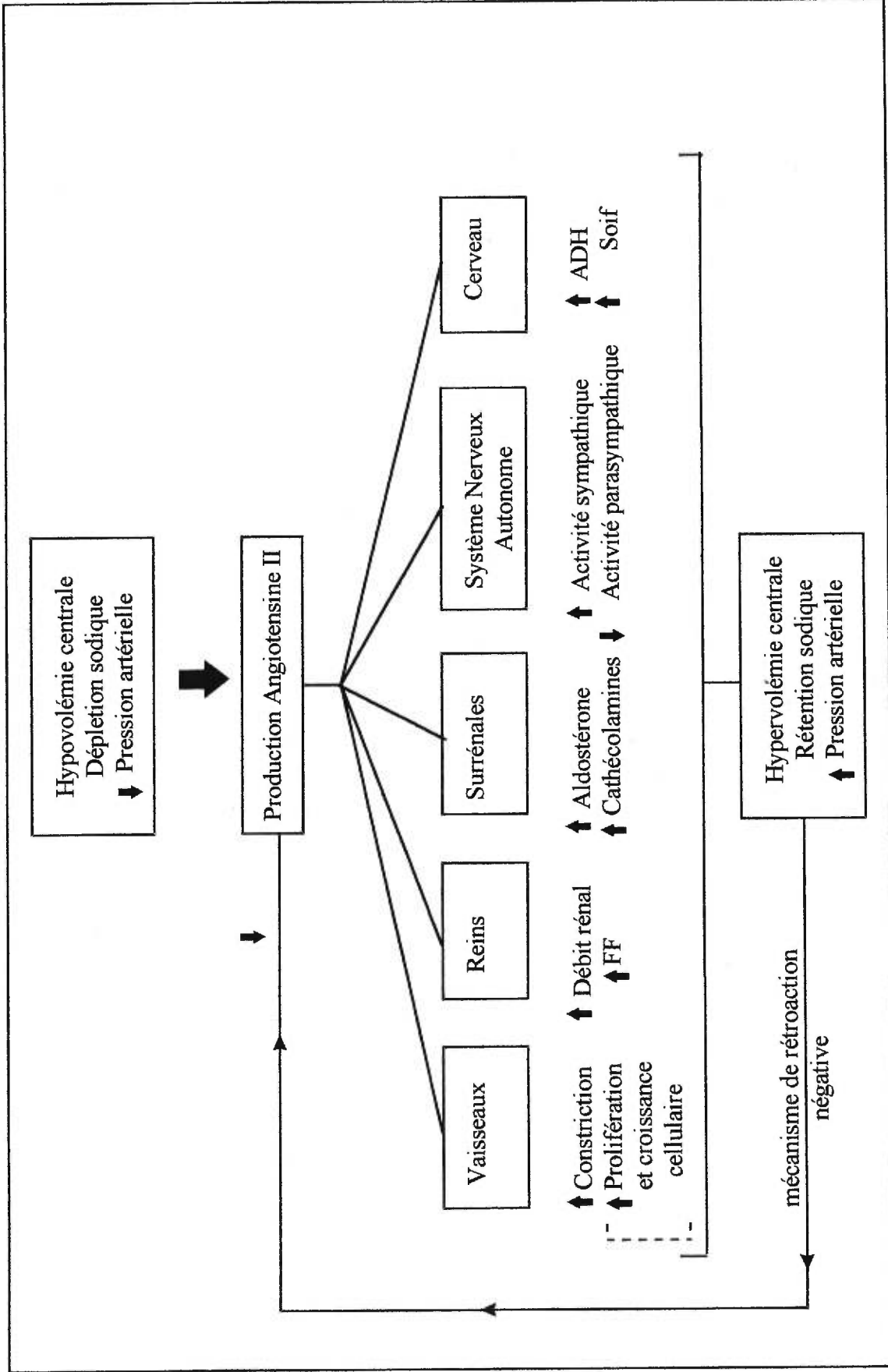


Figure 1.3: Principaux effets physiologiques du système rénine-angiotensine extra-cardiaques dans l'homéostasie cardiovasculaire. FF = fraction de filtration; ADH = hormone antidiurétique; La ligne pointillée indique que ces effets ne sont pas inclus dans le mécanisme de rétroaction négative. (Les effets cardiaques de l'angiotensine II sont présentés dans le tableau I.II)

de cette réponse pressive s'explique par la contraction des cellules musculaires lisses plus importante du côté artériel que veineux. La vasoconstriction directe est également importante au niveau des artérioles efférentes du rein permettant le maintien du débit rénal et de la fraction de filtration glomérulaire. De plus, l'angiotensine II induit la synthèse et la sécrétion par la glande surrénale de l'aldostérone qui favorise la réabsorption rénale d'eau et de sodium pour ainsi augmenter le volume sanguin et la pression artérielle (Baker, 1991, Jackson et coll., 1996).

L'angiotensine II interagit avec le système nerveux autonome. Elle facilite la transmission au niveau du système sympathique périphérique en favorisant la relâche de cathécolamines et en réduisant leur recaptage par les terminaisons nerveuses présynaptiques. De fortes concentrations d'angiotensine II peuvent également stimuler directement le ganglion sympathique. L'angiotensine II augmente de plus la synthèse ainsi que la relâche de cathécolamines par la glande surrénale (Jackson et coll., 1996). Au niveau du système parasympathique, elle atténue l'activité du barorécepteur sur le contrôle de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. L'angiotensine II exerce une action inotrope positive indirecte par la stimulation des terminaisons nerveuses sympathiques abondantes dans le myocarde. Une action chronotrope positive indirecte est également produite par l'angiotensine II via une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et une réduction de l'activité des fibres parasympathiques par le nerf vague aux noeuds sinusal et auriculaire. Au niveau du cerveau, l'angiotensine II stimule le centre de la soif et elle augmente la sécrétion de l'ADH ou vasopressine, l'hormone antidiurétique (Brooks et coll., 1994).

Enfin, des études réalisées dans des cellules en culture montrent que l'angiotensine II influence la croissance, prolifération cellulaire et la synthèse protéique des cellules musculaires lisses et des myocytes isolés d'aorte ainsi que des cardiomyocytes et que des fibroblastes cardiaques (Aceto et coll., 1990; Geisterfer et coll., 1988; Paquet et coll., 1990). Ces résultats suggèrent une implication potentiellement importante de l'angiotensine II dans le développement tissulaire via le récepteur AT₁.

Les fonctions physiologiques de l'angiotensine II au niveau du tissu cardiaque seront discutés plus particulièrement dans la section **1.4.3**.

1.3.4.2 Effets relayés par le récepteur AT₂

Les rôles physiologiques du récepteur AT₂ ne sont jusqu'à ce jour pas connus. Toutefois, l'expression transitoire de ces récepteurs au cours des stades développementaux a conduit à l'hypothèse d'une contribution aux processus de maturation et/ou de différenciation cellulaires. Cette hypothèse a cependant été fortement controversée par la démonstration que l'inactivation du gène AT₂ chez des souris transgéniques n'entraîne pas de mauvais fonctionnement ou de modification tissulaire au cours du développement embryonnaire (Hein et coll., 1995; Ichiki et coll., 1995).

Des études réalisées *in vitro* ont montré un effet inhibiteur du récepteur AT₂ sur la croissance cellulaire, en particulier dans des cellules endothéliales coronaires (Stoll et coll., 1995; Nakajima et coll., 1995), dans des cellules musculaires lisses vasculaires (Hayashida et coll., 1996) et dans des cardiomyocytes (Booz et coll., 1996). Cet effet a été mis en évidence alors que le récepteur AT₁ était inhibé par un antagoniste spécifique de ces récepteurs. Des données obtenues avec certaines lignées cellulaires indiquent de plus que l'effet inhibiteur du récepteur AT₂ s'exerce, entre autres, par l'induction d'apoptose (Yamada et coll., 1996).

1.3.4.3 Effets relayés par le récepteur à l'angiotensine (1-7)

Le rôle physiologique de l'angiotensine (1-7) n'est pas encore élucidé. Selon les connaissances actuelles, il semble que ce peptide est biologiquement actif et qu'il contrebalance les effets de l'angiotensine II. En effet, l'angiotensine (1-7) favorise la dilatation de plusieurs lits vasculaires et elle possède un effet antiprolifératif sur des cellules musculaires lisses vasculaires (Freeman et coll., 1996; Moeller et coll., 1998). Une stimulation de la relâche des prostaglandines et du monoxide d'azote ainsi qu'une potentialisation des effets de la bradykinine par l'angiotensine (1-7) ont également été rapportées (Ferrario et coll., 1998).

1.3.4.4 Effets relayés par le récepteur AT₄

Bien que le récepteur AT₄ est abondamment retrouvé dans plusieurs organes dont le coeur, l'importance physiologique de l'angiotensine IV n'est pas connue. Les premiers travaux sur ce sujet rapportaient notamment des effets sur la fonction cognitive. Par la suite, des augmentations du débit sanguin ont été observées et ce dans plusieurs lits vasculaires dont les poumons, les reins et le cerveau

(Swanson et coll., 1992; Coleman et coll., 1998; Patel et coll., 1998). Ces résultats demeurent toutefois controversés puisque certains auteurs ont plutôt noté une action vasoconstrictrice de l'angiotensine IV (Moeller et coll., 1998). Enfin, des études réalisées *in vitro* montrent que l'angiotensine IV stimule la synthèse d'ADN et d'ARN dans les fibroblastes (Wang et coll., 1995).

1.4.1 Système rénine-angiotensine cardiaque

Au cours des 30 dernières années, le concept du système rénine-angiotensine connu comme un système endocrinien a considérablement évolué. L'hypothèse de l'existence de systèmes rénine-angiotensine locaux a émergé suite à l'observation de concentrations tissulaires d'angiotensine II plusieurs fois supérieures aux concentrations plasmatiques, notamment dans le myocarde (Dansel et coll., 1996). Par la suite, de nombreux résultats expérimentaux provenant d'études moléculaires ont montré la présence des différentes composantes du système rénine-angiotensine dans le coeur suggérant une action paracrine et/ou autocrine de l'angiotensine II parallèlement à son action endocrine (Dostal et coll., 1993).

1.4.2 Localisation des composantes du système rénine-angiotensine cardiaque

Les preuves les plus convaincantes de la présence au niveau cardiaque des composantes du système rénine-angiotensine sont la mise en évidence de l'expression locale et de la synthèse tissulaire de leurs gènes: 1) les transcrits de l'angiotensinogène retrouvés dans les ventricules et plus abondamment dans les oreillettes et le système de conduction chez la souris, le rat ainsi que l'homme (Lindpainter et coll., 1991; Sawa et coll., 1992); 2) l'ARN messager de la rénine retrouvé dans les ventricules et les oreillettes du rat (Dzau et coll., 1987); 3) les transcrits de l'ECA retrouvés dans le myocarde chez l'homme et le rat. Des analyses par autoradiographie quantitative dans le coeur de rat montrent qu'ils sont plus particulièrement localisés dans les oreillettes, les ventricules, la vascularisation coronarienne et les valves cardiaques (Yamada et coll., 1991); et 4) des sites de liaison de l'angiotensine II retrouvés dans différentes portions du coeur dont les oreillettes, les ventricules, la couche médiane des gros vaisseaux et le système de conduction (Saito et coll., 1987; Rogg et coll., 1990; Baker et coll., 1988). Des études effectuées dans des cellules isolées de coeur de rat néonataux et adultes montrent l'expression des gènes de l'angiotensinogène, de la rénine et de l'ECA dans les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Zhang et coll., 1995; Naftilan et coll., 1991; Lilly et coll., 1984; Re et coll., 1982). Bien que les niveaux d'expression des gènes

cardiaques soient inférieurs (moins de 10 %) à ceux retrouvés dans les tissus classiquement associés au système rénine-angiotensine, il n'en demeure pas moins que des concentrations d'angiotensine II produites localement pourraient exercer un rôle physiologique important dans le tissu cardiaque.

Un système tissulaire fonctionnel suppose que la synthèse de ses composantes est accompagnée d'une interaction entre ces dernières. Linz et coll. (1986) ont montré, dans un coeur isolé et perfusé, la conversion d'angiotensine I en angiotensine II suggérant ainsi une activité du système local. D'autres auteurs ont observé, après néphrectomie chez le rat, une augmentation des concentrations d'angiotensine II dans les ventricules, suggérant une participation fonctionnelle du système cardiaque avec une activité modulable (Willhelm et coll., 1987).

Dans les coeurs d'hamster, de chien et d'homme, une autre voie de formation de l'angiotensine II implique une chymase spécifique, indépendante de l'ECA (section 1.2). Bien que cette chymase semble représenter la voie principale de formation de l'angiotensine II dans le coeur humain (80%), son rôle physiologique n'est toujours pas connu (Urata et coll., 1990). L'importance clinique de cette enzyme est discutée au chapitre du système rénine-angiotensine et de la défaillance cardiaque (chapitre 3).

1.4.3 Fonctions physiologiques du système rénine-angiotensine cardiaque

Compte tenu de l'étendue et de la complexité des actions de l'angiotensine II, les études relatives à ses effets physiologiques ont été conçues de façon à isoler chacune d'elles et à minimiser l'influence des systèmes neurohumoraux (animaux anesthésiés, coeurs isolés-perfusés, cellules isolées). La détermination des effets physiologiques du système rénine-angiotensine cardiaque se limite donc à l'extrapolation des données obtenues dans ces préparations expérimentales. Toutefois, l'accumulation importante des données ainsi que leur convergence soutiennent l'hypothèse d'une participation du système local à la modulation de la fonction cardiaque (**Tableau I.II**).

Dans des préparations myocardiques et des cardiomyocytes isolés, l'angiotensine II exerce des actions inotrope et chronotrope positives. Elle augmente de plus la résistance des artères coronaires dans les coeurs isolés perfusés. In vivo, l'administration d'angiotensine II produit une réponse chronotrope positive chez le chien et le rat indépendamment de l'influence du système sympathique

ou système nerveux central (Kobayashi et coll., 1978; Knape et coll., 1988; Lambert et coll., 1991).

Ces résultats suggèrent un effet direct de l'angiotensine II sur le muscle cardiaque en accord avec un rôle potentiellement important sur la fonction cardiaque.

Tableau I.II: Fonctions physiologiques possibles du système rénine-angiotensine cardiaque

Actions	Préparations expérimentales	Références
Inotropisme positif	muscle cardiaque muscle cardiaque cardiomyocytes	Freer et coll., 1976 Kobayashi et coll., 1978 Neysen et coll., 1989
Chronotropisme positif	oreillettes isolées cardiomyocytes animaux anesthésiés	Turker et coll., 1982 Allen et coll., 1988 Lambert et coll., 1991
Diminution du débit coronarien	animaux anesthésiés coeurs isolés	Ertl et coll., 1983 Xiang et coll., 1985
Croissance ou prolifération cellulaire	CML aortiques myocytes aortiques cardiomyocytes fibroblastes cardiaques	Geisterfer et coll., 1988 Paquet et coll., 1990 Aceto et coll., 1990 Aceto et coll., 1990

CML: cellules musculaires lisses

Dans les cellules musculaires lisses et les myocytes aortiques ainsi que dans les fibroblastes cardiaques et les cardiomyocytes en culture, l'angiotensine II induit la croissance, la prolifération et la synthèse protéique (Aceto and Baker, 1990; Geisterfer et coll., 1988; Paquet et coll., 1990). Tous ces effets sont relayés par le récepteur AT_1 puisqu'ils sont bloqués par un antagoniste spécifique de ce récepteur.

Bien que la connaissance des effets des angiotensines via les récepteurs AT_2 , $AT_{(1-7)}$ et AT_4 soit fragmentaire, des études récentes montrent que leurs stimulations inhibent la prolifération cellulaire induite par l'angiotensine II via le récepteur AT_1 dans des myocytes (Baker et Aceto, 1990) et des

cellules musculaires lisses vasculaires en culture (Freeman et coll., 1996). Ces résultats suggèrent une action antiproliférative s'opposant à celle via le récepteur AT₁ (Stoll et coll., 1995; Tsuzuki et coll., 1996).

2.0 Physiopathologie de la défaillance cardiaque

2.1 Introduction

La défaillance cardiaque est une des causes les plus fréquentes de morbidité et de mortalité des pays industrialisés nécessitant un très grand nombre d'hospitalisation. Cette pathologie n'est pas une maladie à origine unique mais plutôt l'aboutissement de plusieurs maladies cardiovasculaires primaires à évolution progressive dont par exemple l'hypertension, la maladie coronarienne, l'ischémie myocardique, l'infarctus du myocarde et la cardiomyopathie. L'établissement de la défaillance cardiaque s'échelonne sur plusieurs années mais le pronostic des patients diagnostiqués est très mauvais (Mc Call, 1995). Considérant le vieillissement de la population en Amérique du Nord, ce phénomène prend des proportions importantes. Une meilleure compréhension des mécanismes responsables du développement de cette pathologie est donc souhaitable afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2.2 Évolution de la défaillance cardiaque

2.2.1 Définition générale et signes cliniques

La défaillance cardiaque est un syndrome caractérisé par un travail du coeur insuffisant dans sa fonction de pompe pour fournir ou maintenir des pressions systémiques et tissulaires adéquates. Le volume circulant est alors redistribué et il y a accumulation dans le réseau veineux et les organes périphériques. Le fonctionnement de plusieurs organes tels le coeur lui-même, le rein, le poumon, le foie et les vaisseaux sanguins en est particulièrement affecté. L'oedème pulmonaire et périphérique, l'essoufflement, la fatigue, l'intolérance à l'exercice et les tachycardies secondaires aux altérations cardiaques fonctionnelles, sont les symptômes cliniques majeurs rencontrés chez les patients en défaillance (Katsung et coll., 1995).

2.2.2 Mécanismes neurohumoraux compensatoires

La dépression de la performance cardiovasculaire initie des mécanismes compensatoires dès les premiers stades de la défaillance. Les systèmes sympathique et rénine-angiotensine sont activés et des neuropeptides sont sécrétés. Tous ces éléments exercent des effets, constricteurs ou dilatateurs, sur l'ensemble du réseau vasculaire. C'est la balance entre ces

influences dilatatrices et constrictrices qui détermine le débit circulant (Katz, 1990) (**Tableau II.I**).

Tableau II.I: Mécanismes neurohumoraux compensatoires en réponse à une diminution de la fonction cardiaque.

Influence constrictrice	Influence dilatatrice
Système sympathique	Peptides natriurétiques
Système rénine-angiotensine	Bradykinine
Vasopressine	Prostaglandines

Sur l'ensemble des effets des peptides régulateurs, l'influence vasoconstrictrice prévaut, permettant ainsi le maintien de la perfusion des organes périphériques. Certains peptides natriurétiques (ANP, BNP, CNP), la bradykinine et les prostaglandines possèdent de plus une action natriurétique. Ils agissent pour contrecarrer la rétention d'eau causée par le système rénine-angiotensine, le système sympathique et la vasopressine. Notons finalement que les médiateurs des systèmes sympathique et rénine-angiotensine possèdent des effets inotrope et chronotrope positifs contribuant au maintien de la fonction mécanique dans les stades compensés de la défaillance cardiaque (Francis et coll, 1995).

L'activation du système rénine-angiotensine au cours de la défaillance cardiaque est présentée au chapitre 4.

2.2.3 Stade congestif

Bien que les mécanismes neurohumoraux aient pour but de compenser un travail cardiaque insuffisant, lorsqu'ils sont soutenus de façon chronique, ils perdent leur influence bénéfique et ils exacerbent même la défaillance cardiaque (Harris, 1983). D'un côté, l'augmentation de l'inotropie et le développement de l'hypertrophie engendrent, à long terme, une surcharge

énergétique (Katz, 1990). D'un autre côté, les réponses systémiques dominantes telles la vasoconstriction ainsi que la rétention d'eau et de sodium, conduisent à un cercle vicieux. Les augmentations du volume circulant résultantes amplifient la diminution du travail cardiaque et donc de la pression artérielle et de la perfusion tissulaire. La vasoconstriction soutenue est responsable de la diminution du débit sanguin aux organes et une congestion systémique s'ensuit (Patterson et coll., 1993). De plus, la diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche entraîne une redistribution du volume sanguin et cause une congestion pulmonaire.

2.3 Modèle expérimental de la défaillance cardiaque: le hamster Syrien cardiomyopathique

2.3.1 Intérêt du modèle

Le hamster Syrien cardiomyopathique de la lignée CHF 146, est un modèle génétique de cardiomyopathie intéressant pour plusieurs raisons (Chemla et coll., 1991):

- 1) Contrairement aux surcharges expérimentales aiguës de pression et de volume, il présente une évolution lente vers la défaillance cardiaque. Le développement de la cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée humaine s'échelonne sur plusieurs années. Ce modèle reflète donc adéquatement cette progression temporelle. Cette lente évolution permet de plus d'étudier les mécanismes physiopathologiques et d'évaluer les effets des interventions thérapeutiques débutées avant le développement des stades congestifs;
- 2) Le second avantage est la reproductibilité et le caractère prévisible des anomalies mécaniques, biochimiques et électrophysiologiques observées à chacune des étapes de cette affection. À ce titre, le modèle est connu depuis plus de 40 ans et une littérature abondante permet la comparaison des résultats obtenus par divers groupes de recherche et;
- 3) Le troisième est la réponse thérapeutique qui est similaire à celle retrouvée chez l'humain. En effet, en dépit de certaines différences physiologiques, l'ensemble des résultats obtenus suggère que les bénéfices thérapeutiques observés chez le hamster sont extrapolables à l'homme.

2.3.2 Évolution morphologique de la cardiomyopathie

La cardiomyopathie du hamster Syrien est caractérisée par plusieurs défauts métaboliques qui induisent des lésions dégénératives dans tous les muscles striés avec une intensité particulière dans le muscle cardiaque. Les événements morphologiques cardiaques observés se manifestent à différents âges et ils varient en intensité (**figure 2.1**) (Jasmin et coll., 1982). La première étape active est celle des phases de myolyse et nécrose cellulaire observées vers 70-75 jours. Elles sont suivies d'une phase de fibrose débutant vers 125 jours. Au même moment, les ventricules s'hypertrophient et ils se dilatent progressivement. Ces événements conduisent à une dépression de la fonction cardiaque et ultimement à la défaillance sévère vers 350 jours. À ce stade, les signes cliniques de la défaillance sont présents. Ils consistent principalement à de l'hépatomégalie ainsi qu'à la présence d'ascite, d'hydrothorax et d'oedème pulmonaire et périphérique (Bajusz, 1969).

En dépit d'une diminution du poids corporel chez les animaux porteurs du gène, leur apparence physique est normale et ce jusqu'à l'apparition d'oedème périphérique. La symptomatologie, tout comme chez l'humain, n'est donc observée qu'au cours des stades avancés de la défaillance. L'espérance de vie des animaux est tout comme chez l'homme significativement diminuée.

2.3.3 Lésions myocardiques primaires

Les lésions myocardiques affectent le tissu cardiaque de façon non homogène. Elles sont retrouvées en de multiples foyers dont la localisation et l'intensité sont aléatoires (Bajusz, 1969). La cardiomyopathie débute par de la myolyse active produisant une dissolution des myofilaments, éléments contractiles du muscle, sans perte d'intégrité de la membrane et sans évidence d'infiltration cellulaire. Cette affection peut cependant causer d'importantes altérations métaboliques aux cardiomyocytes comme une diminution drastique du pH intracellulaire ou une surcharge calcique (Farber, 1982). Si l'agression est suffisamment importante, la réponse sera la mort cellulaire par nécrose. Lors du processus nécrotique, la perte d'intégrité de la membrane plasmique libère le contenu cellulaire et initie la réponse

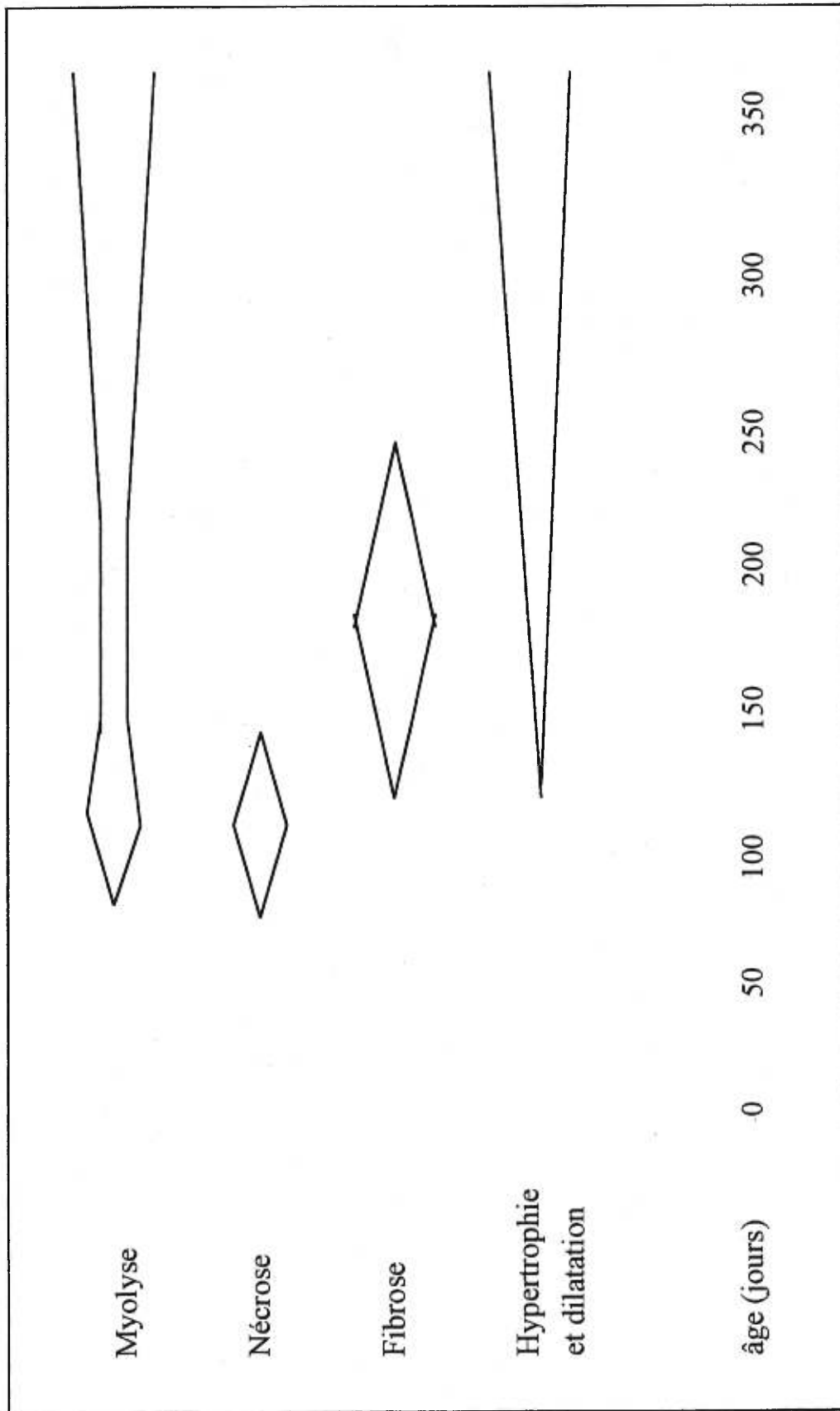


Figure 2.1 : Évolution morphologique de la cardiomyopathie du hamster syrien (CHF 146).
Modifié selon Jasmin et coll. (1982).

inflammatoire. Cette dernière implique l'infiltration cellulaire par les macrophages, les monocytes et les leucocytes ainsi que la relâche des médiateurs de l'inflammation, les cytokines (Bachetti et coll., 1995). Il y a résorption du tissu nécrotique mais des zones de calcification demeurent dans le myocarde et constituent le tissu cicatriciel. Bien que les mécanismes responsables de l'initiation des lésions ne soient pas connus, des altérations de la micro-vascularisation, caractérisées par des vasospasmes, sont retrouvées dans le coeur de hamster (Factor et coll., 1982). L'on a proposé que ces altérations soient responsables, en partie, des lésions nécrotiques. Cette possibilité est basée sur l'observation qu'un traitement avant l'apparition des lésions myocardiques, avec un antagoniste calcique, le vérapamil prévient l'hyperactivité des micro-vaisseaux ainsi que ce type de lésions (Factor et coll., 1982).

2.3.4 Fibrose

Le collagène est la composante la plus importante du tissu conjonctif et il se retrouve dans la fibrose interstitielle et périvasculaire normale du myocarde. L'architecture de ce tissu est hautement coordonnée assurant un alignement adéquat des cardiomyocytes propice à la contraction et à la relaxation sans résistance (Borg et coll., 1983). Les fibroblastes cardiaques résidant dans les interstices sont responsables de la production et de la dégradation des protéines de structure. Ils sont donc indispensables au maintien de l'architecture du tissu conjonctif (Weber et coll., 1991).

Suite à la phase de myolyse et de nécrose cellulaire observée chez le hamster cardiomyopathique, la cicatrisation des lésions primaires survient par le remplacement du tissu conjonctif. Une croissance non-myocytaire importante contribue à l'accumulation anormale de collagène et elle semble jouer un rôle dans le remodelage du coeur de hamster porteur (Makino et coll., 1994). La fibrose entourant les lésions de nécrose engendre des modifications prononcées de la structure du réseau interstitiel (Cohen-Gould et coll., 1987). L'intégrité de l'architecture du tissu conjonctif est altérée et les cardiomyocytes ne présentent plus l'alignement idéal pour la contraction et la relaxation. Les dépôts de collagène affaiblissent ainsi la fonction cardiaque en réduisant la flexibilité des ventricules et ils

contribuent vraisemblablement au développement de la cardiomyopathie (Ju et coll., 1994). En effet, le durcissement des ventricules amène une résistance au remplissage, ce qui favorise l'oedème et la congestion systémique et pulmonaire.

2.3.5 Hypertrophie ventriculaire

Grâce à leur versatilité, les cardiomyocytes sont capables de s'adapter à de nouvelles conditions aiguës et chroniques. Par exemple, suite à la perte cellulaire occasionnée par une atteinte primaire du myocarde, une diminution de la fonction contractile du myocarde est observée. Les cardiomyocytes intacts subissent alors un remodelage résultant à une augmentation de leur volume et de leur longueur (Patterson et coll., 1993). Cette croissance sans mitose des cardiomyocytes impliquant une augmentation de la synthèse protéique conduit à l'élévation de la masse et de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. L'ajout de nouveaux sarcomères permet ainsi d'augmenter la force de contraction des cardiomyocytes. Notons que lorsque l'ajout de sarcomères s'effectue en parallèle ceci favorise l'épaississement de la paroi et l'hypertrophie cardiaque tandis que l'ajout de sarcomères en série, c'est à dire sur la longueur, contribue à la dilatation des ventricules. Chez le hamster cardiomyopathique, l'ajout de sarcomères en parallèle est responsable de l'épaississement de la paroi ventriculaire expliquant la présence d'une hypertrophie cardiaque chez ces animaux. Néanmoins les cardiomyocytes hypertrophiés ne sont pas uniquement une version agrandie des cardiomyocytes normaux. Plusieurs modifications sous-cellulaires sont également observées et elles conduisent à des changements fonctionnels importants. Ces différents changements sont discutés dans la section 2.4 de ce chapitre.

Des stimuli autres que la perte myocytaire sont susceptibles d'initier la phase d'hypertrophie tels l'étirement soutenu des cardiomyocytes et la présence de facteurs de croissance (Lesch et coll., 1971; Simpson et coll., 1982; Wyllie, 1987). Plusieurs études montrent que ces stimuli initient une séquence d'événements complexes permettant la transmission du signal hypertrophique et conduisant à la production de protéines contractiles spécifiques. De plus, l'implication de gènes de réponse précoces tels *c-fos*, *c-myc* et *c-jun* semble nécessaire (Yasaki et coll., 1989). En effet, ces gènes qui codent pour des protéines régulatrices de la

croissance et de la différenciation cellulaires sont surexprimés pendant l'hypertrophie (Izumo et coll., 1988). Par ailleurs, une étude effectuée par immunohistochimie sur des sections de ventricules des hamsters cardiomyopathiques montre, une augmentation persistante de l'expression de la protéine *c-myc* entre 30 et 350 jours (Fujitani et coll., 1996). Cette élévation était localisée dans la portion myocytaire et non-myocytaire. Il est donc probable que les gènes participent à la modulation du processus hypertrophique survenant au cours de la défaillance cardiaque.

L'hypertrophie s'accompagne d'anomalies de la circulation coronarienne. Des diminutions de la densité des capillaires et des artérioles coronaires sont en effet observées dans les ventricules gauches de coeurs hypertrophiés suite à une surcharge pressive (Marcus et coll., 1987). Une diminution de la perfusion myocardique est également notée dans le coeur des patients présentant une défaillance d'origine ischémique et non-ischémique (Parodi et coll., 1993). Des défauts de la circulation coronarienne sont susceptibles de générer des zones myocardiques hypoperfusées diminuant ainsi l'apport d'oxygène aux cardiomyocytes. Ces altérations pourraient être associées aux défauts de contractilité ou aux épisodes ischémiques rencontrés au cours de la défaillance cardiaque (Parodi et coll., 1993; Sheridan et coll., 1993).

2.4 Altérations sous-cellulaires du myocarde

Des modifications dramatiques du métabolisme myocardique sont rapportées chez le hamster cardiomyopathique: 1) l'homéostasie calcique; 2) l'expression et la composition des protéines contractiles; 3) le métabolisme énergétique; 4) le système adrénergique et; 5) le système rénine-angiotensine. La plupart des altérations observées ne sont pas spécifiques au développement de la cardiomyopathie expérimentale du hamster Syrien et elles sont présentes dans d'autres modèles d'hypertrophie ou de défaillance cardiaque.

2.4.1 Anormalités de l'homéostasie calcique

Une brève revue du processus de contraction est présentée (**figure 2.2**) de façon à faciliter la compréhension des changements qui surviennent au cours de la cardiomyopathie. Le cycle d'excitation-contraction est initié par l'entrée rapide, de par le milieu extracellulaire, du Ca^{2+}

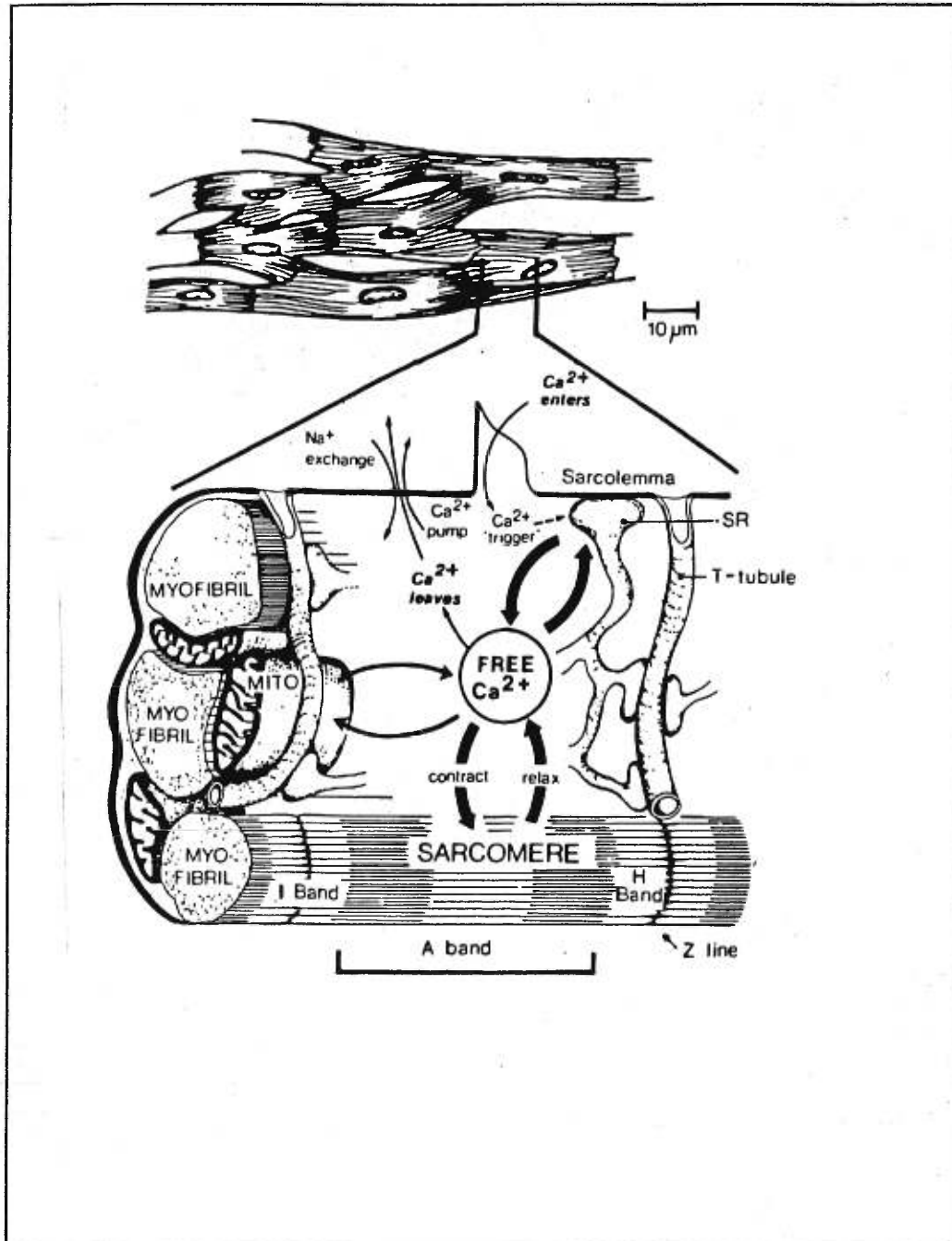


Figure 2.2 : Représentation schématique du mouvement calcique dans la sarcolemme. Reproduit de Opie, 1991.

par l'ouverture de canaux calciques du sarcolemme. Cette entrée induit la relâche de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique via des récepteurs sensibles au Ca^{2+} , les récepteurs de la ryanodine. L'élévation intracellulaire du Ca^{2+} libre permet sa liaison à la troponine. Cette liaison lève alors l'inhibition du complexe troponine-tropomyosine sur les fibres d'actine et de myosine. Il en résulte un glissement des filaments générant la contraction. Deux composantes des cardiomyocytes sont indispensables lors de ce processus. Premièrement, le sarcolemme qui joue un rôle important dans la génération et le maintien des gradients transmembranaires du Na^+ , du K^+ et du Ca^{2+} . Ces gradients sont essentiels à l'excitabilité des cellules musculaires ainsi qu'au processus de couplage excitation-contraction. Deuxièmement, le réticulum sarcoplasmique qui est responsable de la séquestration, du stockage du Ca^{2+} et de la relâche du Ca^{2+} pour favoriser la relaxation et initier la contraction respectivement. Ces fonctions sont assurées par des canaux calciques, des systèmes échangeurs de cations et des pompes ATPases (Opie, 1991). L'intégrité fonctionnelle du sarcolemme, du réticulum sarcoplasmique et bien entendu des myofilaments est donc essentielle à l'accomplissement normal de la contraction des cellules musculaires cardiaques.

Tel que résumé par Ver Donck et ses collaborateurs (1994), de nombreuses études ont rapporté des anomalies de la régulation calcique dans les cardiomyocytes de hamsters Syrien variant avec l'âge des animaux: 1) une perte de la capacité du sarcolemme à lier le Ca^{2+} (30-60 jours); 2) une diminution de la réponse des myofilaments au Ca^{2+} (60-120 jours); 3) une diminution de l'expression et de l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase du sarcolemme (30-280 jours), de l'activité de la pompe Ca^{2+} ATPase et de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (120-280 jours); 4) une diminution de l'activité Ca^{2+} ATPase des myofilaments (200 jours) et; 5) une augmentation de la densité des canaux calciques du sarcolemme (Finkel et coll., 1987). En dépit de ces altérations, le potentiel membranaire de repos ainsi que le potentiel d'action des cardiomyocytes présentent des caractéristiques normales au cours des phases de nécrose et d'hypertrophie. La force de contraction développée ainsi que la performance cardiaque sont toutefois remarquablement déprimées chez le hamster cardiomyopathique (Brink et coll, 1969). L'ensemble de ces résultats sous-entend que la dysfonction cardiaque est intimement liée aux anomalies de l'homéostasie calcique (Morgan, 1991).

En plus des anomalies fonctionnelles, Finkel et coll. (1987) ont observé une surcharge calcique dans les cardiomyocytes du hamster cardiomyopathique. Selon les mécanismes énumérés, il est concevable que l'extrusion du Ca^{2+} de la cellule soit ralentie résultant en une accumulation intracellulaire (Tsuruya et coll., 1994). Une autre hypothèse expliquant la surcharge calcique est l'augmentation du métabolisme inositolphosphate qui est observée dans les cardiomyocytes du hamster Syrien. En effet, ce second messager est responsable de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et, dans ce contexte, il participerait à l'accumulation du Ca^{2+} intracellulaire (Kawaguchi et coll., 1994). Les conséquences de la surcharge calcique sont importantes puisqu'elle peut causer des anomalies électrophysiologiques du myocarde et générer des arythmies mortelles chez les patients en défaillance cardiaque (Rosen et coll., 1981, Levy et coll., 1987).

2.4.2 Composition et activité des protéines contractiles

Par leurs propriétés contractiles et leur habilité à utiliser l'énergie, les myofilaments sont directement impliqués dans la génération de la force de contraction. La cardiomyopathie du hamster Syrien est associée à une dépression de la performance cardiaque. La possibilité que des défauts de conversion de l'énergie métabolique en travail de contraction existent est grande puisque d'importantes variations de la composition et de l'activité des protéines contractiles sont détectées. En effet, on note : 1) chez le hamster normal de 3 à 210 jours, l'expression des isoenzymes de la myosine de type V1 prédomine sur celles de type V2 et V3 alors que chez le hamster cardiomyopathique on note une prédominance de l'isoenzyme de type V3 de 120 à 210 jours (Malhotra, 1994). Mentionnons que l'isoenzyme de type V1 possède l'activité ATPase la plus importante parmi les trois isoenzymes; 2) une dégradation des chaînes légères de la myosine résultant à une diminution significative de l'activité ATPase de celle-ci; 3) une réduction du nombre de protéines (TnTm) impliquées dans le contrôle de la contraction musculaire associée à une perte de sensibilité des myofilaments; 4) des anomalies de la réponse des myofilaments mis en évidence par l'activité de la Mg^{2+} et Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase (Malhotra, 1994). Ces résultats suggèrent que de multiples composantes de l'appareil contractile sont modifiées dans ce modèle expérimental. Ces modifications ont des implications significatives sur la fonction contractile et donc possiblement dans la progression

de la défaillance cardiaque

2.4.3 Identification du gène responsable de la cardiomyopathie

Le défaut génétique primaire de la cardiomyopathie du hamster Syrien n'était jusqu'à tout récemment pas connu. Cependant, Nigro et coll. (1997) ont identifié des délétions de la séquence régulatrice et du premier exon du gène du delta-sarcoglycan, localisées sur le chromosome 9qa2.1-b1, qui semblent vraisemblablement responsables de la pathologie. L'expression de l'ARN messager du delta-sarcoglycan est grandement réduite et la protéine est totalement absente des muscles squelettiques et cardiaque chez les animaux porteurs. Le delta-sarcoglycan est une protéine associée au complexe distrophine-glycoprotéine. Bien que le rôle de ce complexe ne soit pas encore bien défini, il pourrait permettre l'interaction entre des protéines, dont l'actine, se trouvant de part et d'autre de la membrane du sarcolemme (Tinsley et coll., 1996).

2.4.4 Métabolisme énergétique

Des altérations au niveau de l'utilisation de l'énergie dans le myocarde contribuant à la progression de la défaillance cardiaque sont suggérées. Des études effectuées dans le coeur de hamster cardiomyopathique montrent qu'aux stades modéré et sévère de la pathologie, les niveaux de créatinine phosphate et d'ATP sont remarquablement diminués. Cependant, dans les stades précoces de la pathologie, les niveaux de créatinine phosphate sont inchangés. Puisqu'aucune modification du métabolisme énergétique n'est alors décelée, la déplétion énergétique ne semble pas impliquée dans l'initiation de la défaillance mais elle pourrait être une conséquence du défaut métabolique primaire (Dhalla et coll., 1994).

2.4.5 Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome joue un rôle marquant dans la régulation de la fonction cardiaque. Une grande partie des effets de ce système est relayée par les récepteurs β -adrénergiques couplés à l'adénylyl cyclase par une protéine G et par la production d'AMPc responsable de la régulation de divers événements fonctionnels et adaptatifs, comme la contractilité et l'hypertrophie (Homcy et coll., 1991). Chez les hamsters cardiomyopathiques,

des variations importantes de la réponse contractile des cardiomyocytes suite à la stimulation par des agonistes β -adrénergiques ont été observées (Sethi et coll., 1995). La majorité des auteurs observent des modifications, à différents degrés, de la densité des récepteurs, de l'activité de l'adénylyl cyclase et du contenu en mRNA ou de l'activité des protéines Gs et Gi. Des résultats opposés, e.g. augmentation et diminution de la densité du récepteur β -adrénergique, ont également été rapportés (Ikegaya et coll., 1992; Kessler et coll., 1989; Urasawa et coll., 1992). L'utilisation de différentes lignées de hamster pourrait être responsable de ces divergences car l'on observe des différences au niveau de l'étendue de la nécrose, de l'hypertrophie ainsi que la sévérité de la défaillance entre les différentes lignées (Sethi et coll., 1995). Néanmoins, la réponse inotrope aux cathécolamines est invariablement déprimée lors de la défaillance cardiaque expérimentale et humaine (Sethi et coll., 1995; Homcy et coll., 1991; Feldmand et coll., 1987). Il est suggéré que les élévations des cathécolamines circulantes observées au cours de la défaillance sont responsables de cette réduction de la réponse contractile en participant au phénomène de désensibilisation (Sethi et coll., 1995). La diminution de la réponse inotrope suite à une stimulation adrénérergique observée dans divers modèles expérimentaux suggère que le soutien adrénérergique à l'inotropie cardiaque n'est pas assuré dans les états chroniques de la défaillance favorisant ainsi le déclin de la fonction cardiaque.

Les récepteurs α -adrénérergiques possèdent de plus une influence sur la fonction cardiaque mais dans une moindre mesure que les récepteurs β -adrénérergiques. Toutefois, dans le coeur de hamster cardiomyopathique, une élévation de la réponse des récepteurs α_1 -adrénérergiques aux cathécolamines et une augmentation des ARN (α_{1A} et α_{1B}) messagers de ces récepteurs ont été observées (Karlner et coll., 1981; Beaulieu et coll., 1997). Les conséquences fonctionnelles de ces observations ne sont pas connues. Toutefois, il est possible que la stimulation des récepteurs α_1 -adrénérergiques, en empruntant la voie du phosphatidylinositol, potentialise la synthèse protéique et conduise à l'hypertrophie cellulaire. Un rôle potentiel des récepteurs α_1 -adrénérergiques dans l'hypertrophie cardiaque est à considérer (Kagiya et coll., 1991).

2.4.6 Peptides natriurétiques

Une contribution potentielle qu'il ne faut pas exclure dans la défaillance cardiaque est celle de d'autres peptides natriurétiques. Chez le hamster cardiomyopathique, il a été observé que la progression de la défaillance cardiaque sévère est accompagnée d'une augmentation de l'expression ventriculaire de l'ANP (Thibault et coll., 1989). De même, Haleen et coll. (1991) ont observé une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'ANP chez les hamsters cardiomyopathiques lorsque comparé aux hamsters témoins consanguins. Comme l'ANP entraîne une diminution des résistances vasculaires périphériques, une augmentation du volume d'éjection, de la natriurèse ainsi qu'une inhibition du système rénine-angiotensine et sympathique, l'augmentation de l'ANP est considérée bénéfique dans ce modèle.

Des variations des composantes du système rénine-angiotensine sont également observées chez le hamster cardiomyopathique. Les détails de ces altérations ainsi que leurs implications physiopathologiques dans la défaillance cardiaque sont discutés au chapitre 4.

2.5 Aspects thérapeutiques

Plusieurs agents pharmacologiques ont montré des effets thérapeutiques bénéfiques chez le hamster cardiomyopathique. Historiquement, les antagonistes des canaux calciques, tels le vérapamil et le gallopamil, ont été les premiers à prévenir les lésions cardiaques (Chemla et coll., 1991; Jasmin et coll., 1989). Des agents inotropes positifs tels l'isoprotérénol (agoniste β -adrénergique) (Jasmin et coll., 1983), la dénopamine (agoniste β -adrénergique partiel) (Kurosawa et coll., 1996) et la dobutamine se sont également avérés efficaces dans la prévention des lésions cardiaques et dans l'augmentation de l'espérance de vie des animaux cardiomyopathiques. De plus, Nakamura et coll. (1998) ont observé une augmentation de l'activité locomotrice des animaux ainsi qu'une amélioration des paramètres hémodynamiques en réponse à la dobutamine.

Les inhibiteurs de l'ECA sont une autre classe thérapeutique qui exerce des effets bénéfiques chez le hamster cardiomyopathique. Haleen et coll. (1991) ont d'abord montré que le quinapril prévient la dépression de la performance cardiaque et augmente l'espérance de vie

des animaux. Narita et coll. (1996) ont également observé après un traitement à l'imidapril une prolongation de la survie possiblement associée à une amélioration des paramètres hémodynamiques. Mansoor et coll., (1995) ont noté que l'administration d'énalapril est responsable d'une baisse des concentrations plasmatiques de cathécolamines (adrénaline, noradrénaline) et d'une diminution de la synthèse du collagène cardiaque suggérant que l'intégrité morphologique de ce tissu serait mieux préservée. D'autre part, les travaux de Trippodo et coll. (1993) ont montré des effets favorables sur le statut hémodynamique du hamster cardiomyopathique suite à l'inhibition de l'endopeptidase neutre - qui prévient la dégradation de l'ANP- combinée à l'inhibition de l'ECA. Finalement, il a été rapporté que la combinaison du captopril et de l'hydrochlorothiazide augmente la survie des animaux cardiomyopathiques et qu'elle diminue l'hypertrophie cardiaque (Hanton et coll. 1992).

Les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques, comme le nébivolol (Ver Donck et coll., 1991) et le céliprolol (Nakamura et coll., 1998) ont montré une augmentation de l'espérance de vie des hamsters cardiomyopathiques en défaillance cardiaque sévère congestive. Tant qu'aux antagonistes des récepteurs α -adrénergiques, tel le prazosin, il a été observé que l'administration chronique de prazosin entraîne une diminution des lésions de nécrose chez le hamster cardiomyopathique (Sole, 1987).

3.0 Apoptose et maladies cardiovasculaires

3.1. Apoptose: mécanismes, modulation et rôles physiologiques

3.1.1 Introduction

Le mécanisme fondamental responsable de la dégénérescence du tissu cardiaque au cours de la défaillance n'est toujours pas connu. Jusqu'à tout récemment, il était assumé que la mort cellulaire survenant dans le myocarde au cours de ce processus était associée à la nécrose. Des études récentes ont toutefois mis en évidence un autre type de mort cellulaire, l'apoptose, dont les caractéristiques morphologiques diffèrent de ceux de la nécrose. Les mécanismes morphologiques et biochimiques ainsi que les implications physiologiques du processus apoptotique sont présentés dans ce chapitre. Certaines évidences et conséquences du dérèglement de ce processus dans les désordres cardiovasculaires sont également discutées.

3.1.2 Apoptose versus nécrose

Les processus d'apoptose et de nécrose se distinguent entre autres par leurs caractéristiques morphologiques (**Figure 3.I**). La mort cellulaire par nécrose résulte le plus souvent, d'aggressions massives du milieu extérieur. Ce phénomène est donc considéré comme un événement accidentel et non-spécifique. Lorsque la cellule subit une mort par nécrose, elle perd rapidement son intégrité membranaire et le contrôle des flux ioniques. Des lésions importantes causées à la cellule par des conditions physiques ou des agents chimiques sont généralement responsables de cette perte d'intégrité responsable de la suite du processus nécrotique. Ainsi, l'eau pénètre librement dans la cellule entraînant le gonflement et l'éclatement de la membrane plasmatique (Vermes et coll., 1994). Un renflement typique des mitochondries et des organelles cellulaires est également observé. Le processus nécrotique s'accompagne d'une réduction fonctionnelle des mitochondries et d'une perte rapide de la production d'ATP. Après l'éclatement, des enzymes hydrolytiques telles les hydrolases, les phospholipases, les protéases, les RNAases et les DNAases sont activées accélérant la dégradation cellulaire. Le déversement du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire induit une réaction inflammatoire autour des centres nécrotiques et il peut également provoquer la nécrose des cellules avoisinantes. De façon générale et selon sa durée et son intensité, l'agression initiale peut provoquer la mort cellulaire d'un grand nombre de cellules

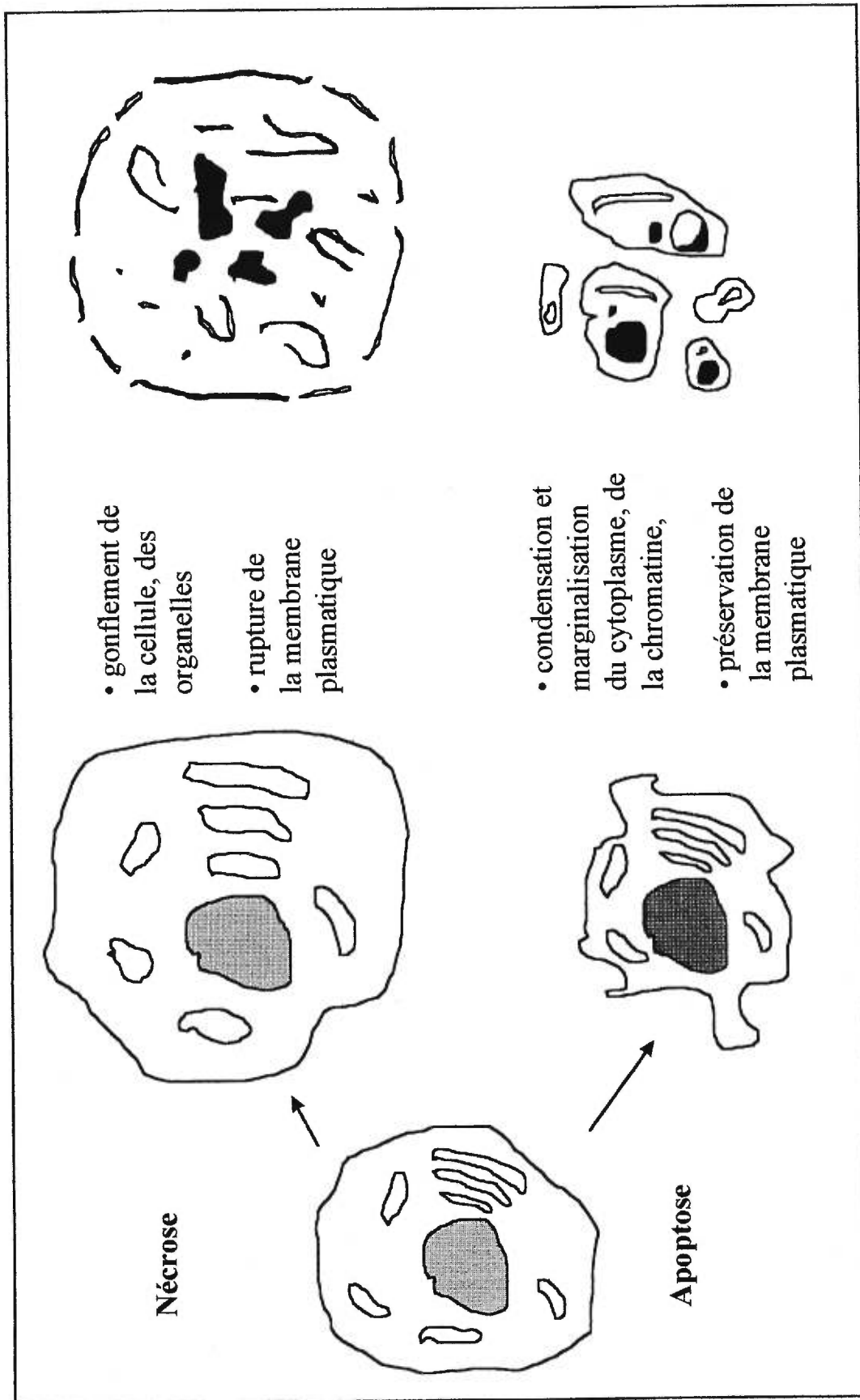


Figure 3.1 Différenciation morphologique entre la nécrose et l'apoptose

d'une même portion de tissu expliquant la présence de foyers de nécrose parfois très étendus et visibles au microscope à faible grossissement.

Par opposition, selon Kerr et coll. (1972), l'apoptose affecte les cellules une à une sans causer de dommage au tissu environnant. Les changements les plus précoces du processus apoptotique sont la perte des jonctions cellulaires ainsi que des structures membranaires spécialisées. Le cytoplasme et la chromatine se condensent alors en larges masses qui, par la suite, se brisent en de nombreux fragments. Le reticulum endoplasmique se transforme en vésicules, nommées corps apoptotiques, qui fusionnent avec la membrane cytoplasmique. Ces corps apoptotiques sont composés d'une membrane intègre et d'organelles cellulaires préservés. Ceux-ci sont phagocités par des macrophages environnants et ils sont rapidement dégradés. Une fois complété, le processus apoptotique ne laisse aucune trace alors que les vestiges de la nécrose sont remplacés par des lésions cicatricielles. L'apoptose de plus ne déclenche pas de réaction inflammatoire (Desoize et coll., 1992).

3.1.3 Mécanismes moléculaires de l'apoptose

Depuis le début des années 1990, l'identification de marqueurs moléculaires a permis la caractérisation des gènes et des protéines qui sont impliqués dans le processus apoptotique permettant une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents. Une des caractéristiques de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN qui constitue une étape irréversible vers la mort cellulaire et est ainsi l'élément central du processus apoptotique. La fragmentation est amorcée suite à l'activation d'endonucléases Ca^{2+} - Mg^{2+} -dépendantes qui digèrent l'ADN aux espaces internucléosomiaux (Walker et coll., 1994). Cette hydrolyse génère une multitude de fragments de taille multiple variant de 180-200 paires de bases. Cette fragmentation est observée par la formation typique d'échelles après électrophorèse sur gel d'agarose.

Une autre caractéristique du processus apoptotique récemment mis en évidence est l'implication de protéines de la famille de l'enzyme de conversion de l'interleukine, les caspases (Mignon et coll., 1998). Les caspases sont des protéases à cystéines qui clivent

leurs substrats protéiques à des sites contenant un résidu aspartate. L'activation et ou l'expression constitutive de la caspase-3, prototype de cette famille, se situe en amont de la fragmentation de l'ADN. La caspase-3 favorise la voie de l'apoptose en dégradant une enzyme spécifique, la poly (ADP-ribose)polymérase (PARP) (Miura et coll., 1993). Cette hydrolyse génère des fragments inactifs de PARP qui se détectent après électrophorèse et immunobuvardage (Lazebnik, 1994). PARP est une enzyme qui se lie normalement à l'ADN et qui reconnaît les brins d'ADN fragmentés. Elle est responsable de l'initiation de la réparation de l'ADN et elle contribue de ce fait au maintien de son intégrité (White et coll., 1995). La dégradation de PARP par l'activation et/ou l'expression constitutive de la caspase-3 prévient donc la réparation de l'ADN. Puisque l'intégrité de l'ADN ne peut être préservée, la cellule considère alors le suicide et elle déclenche le processus apoptotique. Le clivage protéolytique de PARP par la caspase-3 apparaît comme une étape-clé du processus de l'apoptose, un point de non-retour. Bien que le rôle de la caspase-3 soit le plus étudié, mentionnons que plusieurs autres membres de cette famille pourraient également participer au processus d'apoptose et que divers substrats (lamines nucléaires, topoisomérases, etc.) ont été jusqu'à ce jour identifiés.

Les cellules apoptotiques externalisent à la surface de leur membrane, des phospholipides phosphatidylsérines qui, dans des cellules intactes, sont localisés dans la membrane interne. Ces phospholipides, lorsqu'exposés à l'environnement externe, semblent associés à la reconnaissance des cellules en apoptose par les macrophages ou par les cellules du muscle lisse, favorisant ainsi leur digestion (Bennett et coll., 1995). Ces phospholipides à la surface membranaire peuvent être détectés dans des cellules isolées par marquage immunohistochimique et cette technique utilisée comme un indicateur de la présence d'apoptose.

3.1.4 Modulateurs extracellulaires de l'apoptose

L'initiation du processus apoptotique est contrôlée par une grande variété de signaux comme entre autres, des dommages causés à l'ADN par radiation UV, l'hyperthermie, l'hypoxie et les xénobiotiques. Plusieurs agents cytotoxiques induisent également l'apoptose et, à plus forte

concentration, la nécrose. L'on suggère que l'intensité du dommage initial causé à l'ADN détermine la décision de la cellule à s'engager dans la voie de l'apoptose ou la nécrose (Lennon et coll., 1995; Desoize, 1995). D'autres facteurs extracellulaires modulateurs du processus apoptotique ont été décrits mais ils ne sont pas spécifiques à cette réponse biologique - facteurs de croissance (TGF β , PDGF), interleukines (IL2-IL6), neurotransmetteurs (glutamate, dopamine), cytokines (TNF α , TNF β) (Thompson, 1995). Par ailleurs, selon les conditions expérimentales, des effets opposés ou une absence d'effet sont parfois observés suggérant que l'équilibre entre les facteurs présents dans le micro-environnement est important dans l'induction de l'apoptose.

La présence de facteurs neurohumoraux cardiovasculaires (**Tableau III.I**) est également susceptible de moduler l'apoptose. Mentionnons que l'angiotensine II peut s'opposer et favoriser à la fois l'apoptose suggérant que le type cellulaire est une composante déterminante, en plus de la présence des facteurs extracellulaires, dans l'induction de l'apoptose.

Tableau III.I: Facteurs neurohumoraux cardiovasculaires de l'apoptose

Facteurs s'opposant à l'induction de l'apoptose		
Angiotensine II	cellules musculaires lisses (AT ₁)	Pollman et coll., 1996
Endothéline-1	cellules endothéliales (ET _B)	Shichiri et coll., 1997
	fibroblastes (ET _A)	Shichiri et coll., 1998
	cellules musculaires lisses	Wuwong et coll., 1997
Facteurs favorisant l'induction de l'apoptose		
Angiotensine II	cardiomyocytes (AT ₁)	Kajstura et coll., 1997
	cellules PCW12 (AT ₂)	Yamada et coll., 1996
	cellules endothéliales (AT ₂)	Dimmeler et coll., 1997
Noradrénaline	cardiomyocytes (β)	Communal et coll., 1998
Cathécolamines	lymphocytes	Josefsson et coll., 1996
NO	cardiomyocytes	Pinski et coll., 1995
NO	cellules musculaires lisses	Pollman et coll., 1996
ANP	cardiomyocytes	Wu et coll., 1997
TNF α :	cardiomyocytes	Krown et coll., 1996

3.1.5 Modulateurs intracellulaires de l'apoptose

Le déclenchement de l'apoptose dépend de signaux intracellulaires qui, dans certains cas, ne lui sont pas spécifiques. Prenons l'exemple du Ca^{2+} qui joue vraisemblablement un rôle clé dans les signaux primaires de l'apoptose et qui est impliqué dans de nombreux autres processus cellulaires dont la croissance. Plusieurs groupes de recherche ont rapporté que des élévations soutenues des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire libre précèdent le processus apoptotique. C'est notamment le cas du groupe de Martin (1994) qui a montré que les ionophores du Ca^{2+} sont de puissants inducteurs de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires suggérant que l'influx de Ca^{2+} est important. Bien que le rôle du Ca^{2+} dans l'apoptose ne soit pas encore totalement déterminé, il semble impliqué dans l'activation d'endonucléases Ca^{2+} - Mg^{2+} -dépendantes. Cette implication ne semble pas universelle puisque selon le type cellulaire étudié, l'initiation du processus apoptotique n'est pas accompagnée d'élévations des niveaux intracellulaires de Ca^{2+} (Barry et coll., 1993).

Plusieurs seconds messagers intracellulaires peuvent de plus intervenir dans l'induction de l'apoptose. En outre, il a été observé qu'une variété d'agents, seuls ou en combinaison, produit des élévations d'AMP cyclique stimulant l'apoptose (Lanotte et coll., 1991). La transmission de ce signal ferait intervenir la protéine kinase A (Binder et coll., 1994). D'autre part, la protéine kinase C jouerait également un rôle important dans l'option prise la cellule de procéder au processus apoptotique. En effet, l'activation de la protéine kinase C par les esters de phorbol bloque le processus apoptotique alors que les inhibiteurs de cette protéine possèdent l'effet inverse. Les résultats provenant de divers modèles expérimentaux sont toutefois controversés puisque dans certains types cellulaires, l'apoptose n'est pas induite par l'activation ou par l'inhibition de la protéine kinase C (Lee et coll., 1993; Martin et coll., 1994). Ces résultats suggèrent certainement qu'il existe plus d'une voie de transmission responsable de l'induction de l'apoptose.

3.1.6 Régulation génétique de l'apoptose

Les cellules possèdent dans leur répertoire génétique la capacité de proliférer, de se différencier ainsi que de procéder au suicide cellulaire ou à l'apoptose (Isaacs, 1993).

L'existence d'une régulation génétique de l'apoptose a été mise en évidence par l'observation que certains gènes bloquent ou stimulent l'apoptose dans les tissus ou cellules où ils s'expriment.

Il existe une famille d'oncogènes dont certains membres, lorsqu'ils sont exprimés, possèdent des propriétés anti- (bcl-2, bcl-xL, bcl-x β , mcl-1) ou pro-apoptotique (bcl-xS, bac, bax). L'oncogène bcl-2 est le prototype de cette famille et par conséquent, le plus étudié. La suppression du processus apoptotique suite à l'activation de bcl-2 est observée dans presque tous les types cellulaires et dans presque toutes les conditions expérimentales. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas connu, l'on suggère que bcl-2 inhibe la voie d'activation de l'apoptase, qu'il est impliqué dans la régulation des flux de Ca²⁺ au travers de la membrane ou encore qu'il est associé à la régulation du métabolisme oxydatif (Nunez et coll., 1994). De plus, des interactions entre les protéines de cette famille, conduisant à l'homo- ou l'hétérodimérisation, sont importantes pour l'effet produit. En effet, l'homodimérisation de bax (bax-bax) donne lieu à la mort cellulaire alors que l'hétérodimérisation (bax-bcl-2) diminue la susceptibilité à l'apoptose (Oltvai et coll., 1993). En somme et sans pour autant exclure d'autres liens fonctionnels, la modulation de l'apoptose semble vraisemblablement déterminée par la proportion des protéines de la famille bcl-2 exprimée dans un tissu particulier.

De façon étonnante, l'oncogène *c-myc*, une des clés de la régulation de la prolifération cellulaire, intervient dans la régulation de l'apoptose. Le rôle de *c-myc* est donc double puisqu'il est à la fois un initiateur de la prolifération cellulaire et un inducteur de l'apoptose (Piechaczyk, 1992). Afin de résoudre ce paradoxe, des auteurs suggèrent que l'induction de l'apoptose est observée lors du découplage entre des niveaux élevés d'expression de *c-myc* et la disparition des signaux mitogéniques (Askew et coll., 1991). Par ailleurs, dans le cœur du hamster cardiomyopathique, des élévations de la protéine *c-myc* est observée (Fujitani et coll., 1996). Comme *c-myc*, p53 est un régulateur du cycle cellulaire qui, selon les signaux intra- ou extracellulaires, peut orienter la cellule vers l'apoptose. L'expression de p53 est induite principalement par des événements susceptibles d'endommager l'ADN et elle est considérée

comme un point de contrôle du cycle cellulaire (Lane, 1992).

En résumé, l'ensemble de ces observations soulignent l'importance du type cellulaire, de la présence et de l'intensité de facteurs intracellulaires ou extracellulaires environnants ainsi que de la présence des gènes régulateurs du processus dans la décision d'une cellule d'opter pour la voie de l'apoptose. En dépit de la nature des multiples signaux inducteurs, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires.

3.1.7 Importance physiologique de l'apoptose

L'apoptose est un processus fondamental qui concerne toutes les espèces animales. En effet, le développement des organismes multicellulaires tout comme l'homéostasie cellulaire sont le résultat d'une régulation précise et coordonnée des processus de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. L'apoptose est, dans ce contexte, responsable de l'élimination de cellules improprement différenciées ou en surplus. Elle est impliquée dans les processus biologiques tels la différenciation, le développement et la maturation cellulaire ainsi que la fonction immunitaire (Wyllie, 1987; Goldstein et coll., 1991). Par ailleurs, des anomalies dans le phénomène d'apoptose -stimulation ou inactivation-, accompagnent diverses pathologies notamment le cancer, les maladies virales et autoimmunes et certaines dégénérescences du système nerveux (Desoize, 1995).

En ce qui a trait au tissu cardiaque, le processus apoptotique intervient dans les phases précoces de la maturation de ce tissu suivant la naissance lorsque les ventricules s'adaptent à leur charge de travail (Kajstura et coll., 1995). L'apoptose est également impliquée lors de la morphogénèse post-natale du noeud sinusal et atrioventriculaire et du faisceau de His. Selon, James (1994), l'apoptose est mise en branle afin d'éliminer les cellules en surplus prévenant ainsi les courts-circuits et les routes de réentrées potentielles. Dans ce contexte, les transformations morphogéniques induites par le processus d'apoptose semblent essentielles et il ne faut pas négliger les effets délétères que pourrait impliquer un dérèglement du

processus apoptotique dans le tissu cardiaque (James, 1994).

3.2 Apoptose et maladies cardiovasculaires

3.2.1 Perte myocytaire après dommage au myocarde

La perte myocytaire progressive par nécrose a longtemps été considérée, en partie tout au moins, responsable de la disfonction cardiaque qui survient dans la défaillance cardiaque. À la lumière de récents travaux, il s'avère que le processus apoptotique puisse également être impliqué dans la perte de la fonction cardiaque. En effet, les travaux de Gottlieb et coll. (1994) ainsi que Fliss et coll. (1996) montrent que la reperfusion du myocarde suite à une ischémie entraîne une apoptose et une nécrose myocytaires. Ces résultats suggèrent la présence simultanée des signaux inducteurs de l'apoptose et de la nécrose. Le processus apoptotique est de plus décrit dans d'autres modèles expérimentaux et chez l'homme après un infarctus du myocarde (Kasjtura et al., 1996; Misao et coll., 1996). Kajstura et coll. (1996) observent de l'apoptose myocytaire avant l'apparition des lésions de nécrose supportant l'hypothèse que l'apoptose contribue de façon indépendante à la taille de l'infarctus et/ou à la détérioration de la fonction ventriculaire. Ces auteurs suggère l'existence de mécanismes compensatoires après avoir noté des augmentations des niveaux d'expression du récepteur Fas (pro-apoptotique) et de l'oncogène bcl-2 (anti-apoptotique). Ces résultats sous-entendent qu'il existe un mécanisme compensatoire relayé par bcl-2 afin d'augmenter la survie des cardiomyocytes suivant l'atteinte du myocarde (Misao et coll., 1996).

3.2.2 Perte myocytaire, hypertrophie et défaillance cardiaque

Le développement de l'hypertrophie cardiaque est caractérisé par la croissance des cellules musculaires et la prolifération des cellules non-myocytaires. Les travaux des dernières années montrent que l'apoptose peut également participer au remodelage cardiaque. En effet, des études effectuées par Teiger et coll. (1996) montrent une activation transitoire de l'apoptose lors de la phase d'hypertrophie induite par une surcharge pressive chez le rat. Dans le coeur de rats spontanément hypertendus, l'apoptose myocytaire est décrite au cours du stade hypertrophique ainsi qu'au cours de la transition de l'hypertrophie à la défaillance cardiaque (Diez et coll., 1997, Fortuno et coll., 1998; Hamet et coll., 1996, Li et coll., 1996). Les

modèles de défaillance cardiaque par entraînement électrique ventriculaire rapide et micro-embolisation coronarienne chez le chien présentent également des évidences du processus apoptotique dans le myocarde et elle est accompagnée d'une augmentation de la protéine Fas (Sharov et coll. 1996; Liu et coll, 1995). Dans les coeurs d'humains atteints de défaillance cardiaque sévère, un scénario similaire est observé: la fragmentation de l'ADN détectée par électrophorèse et immunomarquage *in situ* des fragments d'ADN (Olivetti et coll., 1997; Narula et coll, 1996; Ino et col., 1997). Dans la cardiomyopathie dilatée humaine, l'augmentation de l'apoptose est observé en présence d'une élévation de la protéine Fas (Yamamura et coll., 1999). Tel que proposé par Ino et coll. (1997), ces résultats suggèrent que l'apoptose et la croissance cellulaire sont des événements qui déterminent la masse des ventricules ainsi que l'architecture du myocarde au cours du développement de la défaillance cardiaque.

Bien que les mécanismes responsables de l'induction l'apoptose soient encore mal connus, la possibilité qu'une surcharge de travail cardiaque soit un élément déclencheur est une hypothèse intéressante. En effet, des études *in vitro* montrent une augmentation de l'apoptose myocytaire et de l'expression de Fas lorsque des muscles papillaires de lapin étaient soumis à un étirement mécanique (Sonnenblick et coll., 1995). Ces résultats indiquent qu'une augmentation substantielle de la charge de travail du muscle cardiaque pourrait consister un mécanisme de l'induction de l'apoptose.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les stades d'hypertrophie et de défaillance cardiaque sévère sont caractérisés par une perte myocytaire de nature apoptotique expliquant, tout au moins en partie, la perte fonctionnelle progressive du muscle cardiaque. Bien que ces observations supportent fortement une association entre le processus apoptotique et des pathologies cardiovasculaires, la contribution relative de l'apoptose dans le développement de ces désordres et dans l'effet thérapeutique demeure à déterminer.

4.0 Système rénine-angiotensine et défaillance cardiaque

4.1 Introduction

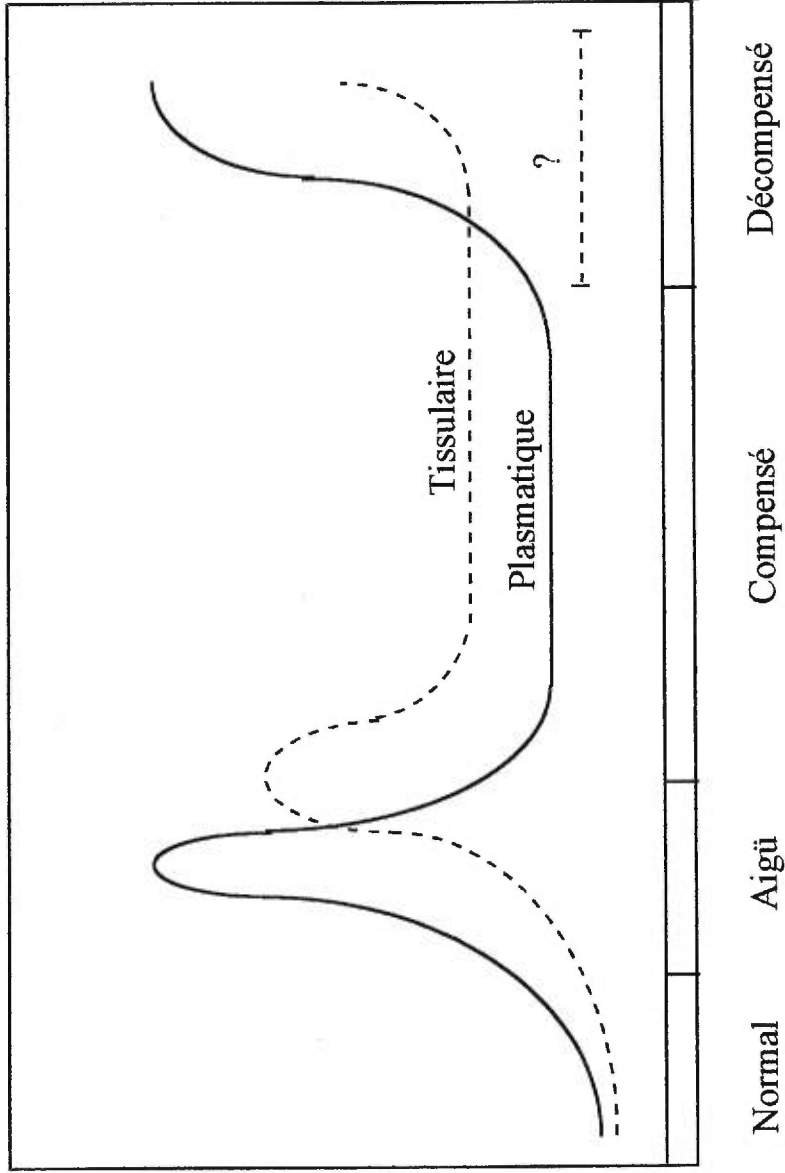
Des systèmes rénine-angiotensine existent dans plusieurs tissus cibles du système cardiovasculaire et la possibilité qu'ils produisent localement de l'angiotensine II a certainement des implications physiopathologiques importantes. Si l'évolution de la défaillance cardiaque est influencée par l'action de systèmes locaux, ces derniers devraient accentuer la détérioration de la fonction cardiaque alors que leur inhibition serait bénéfique. Ce chapitre rapporte les évidences expérimentales qui supportent l'importance de ces systèmes dans la progression de la défaillance cardiaque.

4.2 Modulation du système rénine-angiotensine

4.2.1 Concentrations d'angiotensine II plasmatique et tissulaires

La progression de la défaillance implique l'activation de mécanismes compensatoires relayés par les systèmes neurohumoraux. Ainsi, Watkins et coll. (1976) montrent, dans un modèle de défaillance cardiaque canin, une activation du système rénine-angiotensine plasmatique variant en fonction des stades de la pathologie (**Figure 4.1**). Au cours de la phase aigüe, l'activité du système rénine-angiotensine est augmentée de façon importante. Puis, elle retourne à un niveau normal pendant les stades compensés, et ce, jusqu'à la phase de décompensation cardiaque, où il y a alors réactivation soutenue. Les systèmes rénine-angiotensine tissulaires connaissent également des variations de leur niveau d'activité. Il sont activés au cours de la phase aigüe de la défaillance et cette activation est maintenue même lors du stade compensé. Le niveau d'activation du système cardiaque lors de la décompensation n'a pas été déterminé cependant il semble avoir un profil comparable à celui du système circulant. Des profils similaires de ce système sont également décrits dans d'autres modèles expérimentaux dont celui du hamster cardiomyopathique de même que chez les patients avec une défaillance cardiaque (Hodsman et coll., 1988; Nakamura et coll., 1994; Dargie et coll., 1987; Dzau et coll., 1981).

Figure 4.1 : Profils d'activité des systèmes rénine-angiotensine plasmatique et cardiaque au cours de la défaillance chez le chien



Stades de la défaillance cardiaque

4.2.2 Le système rénine-angiotensine cardiaque

L'on suggère que le système rénine-angiotensine cardiaque contribue au développement de la défaillance cardiaque et ce, depuis la mise en évidence d'une modulation de ses composantes. Les évidences proviennent de différents modèles expérimentaux progressant vers la défaillance cardiaque. Par exemple, l'infarctus du myocarde induit par la ligature de l'artère coronaire, la sténose aortique, la fistule aortocavale au niveau rénale ainsi que l'entraînement électrique ventriculaire rapide sont des interventions conduisant à une dysfonction cardiaque accompagnée des manifestations classiques de la défaillance cardiaque. Les évidences d'une modulation du système rénine-angiotensine cardiaque obtenues à l'aide de ces modèles sont :

1) une augmentation transitoire de l'expression de l'ARN messenger de l'angiotensinogène au cours de la phase précoce de la défaillance après un infarctus du myocarde (Lindpainter et coll., 1993), après un entraînement électrique ventriculaire rapide (Finckh et coll., 1990) ou lors du développement de l'hypertrophie cardiaque chez le rat (Dostal et coll., 1993).

2) une activité élevée de l'ECA dans les ventricules de hamsters cardiomyopatiques (Haleen et coll., 1991). Des augmentations de l'expression de l'ARN messenger et de l'activité de l'ECA cardiaque sont également observés dans un modèle d'infarctus du myocarde (Hirsch et coll., 1991). Dans ce modèle, suite à la création d'une fistule aortocavale, l'augmentation de l'ARN messenger de l'ECA était proportionnelle à la sévérité de la défaillance (Pieruzzi et coll., 1995). Chez les rats spontanément hypertendus, on rapporte également, une augmentation de l'activité de l'ECA (Diez et coll., 1998). Enfin, chez l'humain en insuffisance cardiaque, des augmentations de l'expression de l'ARN messenger de l'ECA cardiaque sont été notées (Studer et coll., 1994).

3) des augmentations de l'expression du récepteur AT₁ à l'angiotensine II sont rapportées au cours de tous les stades du développement de la cardiomyopathie du hamster Syrien (Lambert et coll., 1995) et suite à un infarctus du myocarde chez le rat (Reiss et coll., 1993). Dans le

coeur hypertrophié de rat suite à un bandage aortique, une prédominance du récepteur AT_2 (60%) suggère une diminution de la densité du récepteur AT_1 (Lopez et coll., 1994). Chez l'humain, la proportion des récepteurs $AT_1:AT_2$ exprimés dans des coeurs normaux (73:27) est inversée lorsque comparés à la proportion retrouvée dans des coeurs de patients présentant une défaillance cardiaque (36:64)(Asano et coll., 1997; Nozawa et coll., 1996).

4.2.3 Voies de synthèse alternatives de l'angiotensine II

Jusqu'à présent, les données supportant l'importance physiopathologique de la formation de l'angiotensine II par des voies indépendantes de l'enzyme de conversion ne font pas l'unanimité. Chez le hamster cardiomyopathique, l'activité et le niveau d'expression de l'ARN messager de la chymase sont significativement augmentés lors du développement de la fibrose myocardique et de l'hypertrophie alors que l'activité de l'ECA demeure inchangée (Shiota et coll., 1997). Chez l'homme, une étude montre que le niveau d'expression de l'ARN messager de l'ECA est augmenté alors que celui de la chymase n'est pas modifié au cours de la défaillance cardiaque (Studer et coll., 1994). Bien que ces résultats suggèrent une spécificité d'espèces, il n'en demeure pas moins que la chymase, dans le coeur humain normal, représente environ 80% de la voie de formation de l'angiotensine II (Urata et coll., 1990; Wolny et coll., 1997). L'implication de la chymase dans des situations cliniques n'est pas encore établie, néanmoins un rôle dans le développement de la défaillance est toutefois difficile à exclure.

4.3 Contributions du système rénine-angiotensine dans la défaillance cardiaque

4.3.1 Contribution extra-cardiaque du système rénine-angiotensine

Depuis la publication des résultats de Watkins (1976), il est proposé que l'angiotensine II plasmatique soit responsable des vasoconstrictions veineuse et artérielle induisant l'élévation de la pré- et de la post-charge cardiaques. La pré-charge est déterminée par la pression de remplissage des ventricules et elle est influencée par le volume sanguin circulant ainsi que par le tonus du réseau veineux. La post-charge correspond à la force que doit exercer le coeur pour expulser le sang dans la circulation périphérique et elle est influencée par le tonus du réseau artériel. L'angiotensine II en favorisant la rétention rénale d'eau et de sodium et en

ayant un effet vasoconstricteur direct contribue à augmenter ces deux paramètres. L'intervention des systèmes rénine-angiotensine et sympathique au cours des stades précoces permet un rétablissement temporaire de l'homéostasie cardiovasculaire (Levine et coll., 1982). Toutefois, l'activation chronique de ce mécanisme a un effet délétère par l'augmentation excessive du volume circulant et du tonus vasoconstricteur favorisant la phase de décompensation cardiaque.

4.3.2 Contribution aux lésions primaires

En présence d'un stimulus approprié, il est proposé que des élévations des concentrations circulantes d'angiotensine II causent des lésions primaires du myocarde. En effet, Kabour et coll. (1994) ont observé, suite à la perfusion d'angiotensine II chez des rats, des lésions multifocales de nécrose au niveau myocardique. Cette hypothèse est de plus supportée par le fait que ces lésions sont prévenues par l'administration simultanée d'un antagoniste spécifique du récepteur AT₁, le losartan (Kabour et coll., 1995). Dans le même ordre d'idée, Factor et coll. (1982) ont proposé que la constriction de la micro-circulation observée chez le hamster cardiomyopathique soit responsable de l'apparition des lésions multifocales et ceci possiblement en association avec la présence de substances vasoconstrictrices. Puisque l'on observe des élévations des concentrations cardiaques d'angiotensine II au cours de défaillance cardiaque, il est donc possible que les lésions myocardiques soient, en partie tout au moins, attribuables à l'angiotensine II tissulaire.

4.3.3 Effet sur le remodelage ventriculaire

L'hypothèse voulant que l'angiotensine II influence la fonction cardiaque par un effet direct sur les cardiomyocytes est supportée par de nombreuses données expérimentales. En outre, l'étude du phénotype cardiaque réalisée trois semaines après un infarctus du myocarde chez le rat a révélé que, dans la portion non-ischémique du myocarde, le poids des ventricules ainsi que le niveau d'expression des ARN messagers de l' α -actine squelettique et de la β -myosine à chaînes lourdes étaient significativement augmentés (Hanatani et coll., 1995). Les gènes de ces deux dernières sont impliqués dans la régulation de la performance cardiaque et leur profil d'expression est modifié au cours du développement de l'hypertrophie.

L'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur AT₁ dans ce modèle, inhibe l'hypertrophie ventriculaire de même que la surexpression des ARN messagers de l' α -actine squelettique et de la β -myosine à chaînes lourdes. Dans une étude effectuée suite à une ligature coronaire chez le rat, Meggs et coll. (1993) ont évalué la relation existant entre la dimension des myocytes isolés survivants et la densité des récepteurs à l'angiotensine II. Des augmentations significatives de la longueur et de la largeur des myocytes étaient accompagnées d'élévations de l'expression du récepteur AT₁. Par ailleurs, le groupe de Dostal (1992) a rapporté que l'augmentation de la masse du ventricule gauche en réponse à la perfusion d'angiotensine II à des doses sans effet presseur, était inhibée par le blocage du récepteur AT₁. Ces résultats suggèrent que l'angiotensine II produite localement est responsable de la transmission du signal hypertrophique via le récepteur AT₁ et, par conséquent, qu'elle contribue au remodelage ventriculaire observé lors de la défaillance cardiaque.

Les mécanismes de transmission du signal hypertrophique par le récepteur AT₁ sont également évalués. Une étude effectuée à l'aide de myocytes isolés provenant de coeurs hypertrophiés de rat suite à un infarctus du myocarde montre une augmentation de la densité des récepteurs à l'angiotensine II. Cette augmentation s'accompagne d'une surexpression des gènes de réponse précoce, *c-myc* et *c-jun* (Reiss et coll., 1993). L'induction de ces gènes expliquerait la croissance cellulaire après l'infarctus du myocarde. Un mécanisme probable de la transmission du signal hypertrophique par l'angiotensine II est l'activation de la protéine kinase C responsable de l'induction de la transcription de ces gènes (Aceto et coll., 1990; Schelling et coll., 1991).

L'intervention du système rénine-angiotensine se fait également au niveau de la croissance des cellules non-myocytaires. Il est reconnu, dans les fibroblastes cardiaques en culture, que l'angiotensine II induit leur prolifération ainsi que la synthèse de collagène suite à l'activation du récepteur AT₁ (Aceto et coll., 1990, Schorb et coll., 1993). *In vivo*, l'inhibition de l'ECA chez les hamsters cardiomyopathiques inhibe la synthèse de collagène dans le réseau interstitiel suggérant que l'angiotensine II peut être responsable de l'induction de la synthèse

de collagène mais également de la prolifération des fibroblastes (Azaki et coll., 1994). Des résultats similaires ont été obtenus par Kato et coll. (1990) qui ont rapporté une diminution de la fibrose myocardique suite à des évaluations histologiques chez des hamsters traités avec des inhibiteurs de l'ECA.

4.3.4 Induction d'arythmies

Dans le coeur isolé et perfusé de rat, l'angiotensine II aggrave les arythmies causées par des ischémies transitoires et ces arythmies sont abolies par un traitement avec un inhibiteur de l'ECA, le ramipril. Ces résultats suggèrent un effet arythmogénique de l'angiotensine II (Linz et coll., 1986). L'hypothèse voulant que l'angiotensine II produite localement génère des arythmies ventriculaires est également soutenue par les travaux de Webster et coll. (1985) qui ont rapportés une réduction des arythmies chez les patients présentant une défaillance cardiaque après un traitement avec des inhibiteurs de l'ECA.

4.3.5 Interaction avec d'autres systèmes neurohumoraux

Au cours de la défaillance cardiaque, l'angiotensine II produite localement peut influencer la fonction cardiaque indirectement par l'activation ou l'inhibition de d'autres systèmes neurohumoraux. En effet, selon Brilla et coll. (1994), dans cette pathologie il existe une interaction complexe entre les différents médiateurs où le système rénine-angiotensine constitue vraisemblablement l'élément central (**Figure 4.2**).

L'interaction la plus importante est celle de l'angiotensine II avec le système sympathique. L'angiotensine II facilite la relâche de cathécolamines des surrénales, par les terminaisons nerveuses mais également par l'activation de la sécrétion de rénine de l'appareil juxtaglomérulaire. Cette interaction accentue la réponse constrictrice du réseau vasculaire ainsi que la contractilité du myocarde. Par ailleurs, les médiateurs du système sympathique possèdent également des effets paracrines. Par exemple, l'augmentation de la relâche de cathécolamines induite par l'angiotensine II pourrait constituer un mécanisme indirect de l'hypertrophie et/ou de la fibrose cardiaque. En effet, des études *in vitro* montrent une stimulation de la synthèse protéique dans les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques en

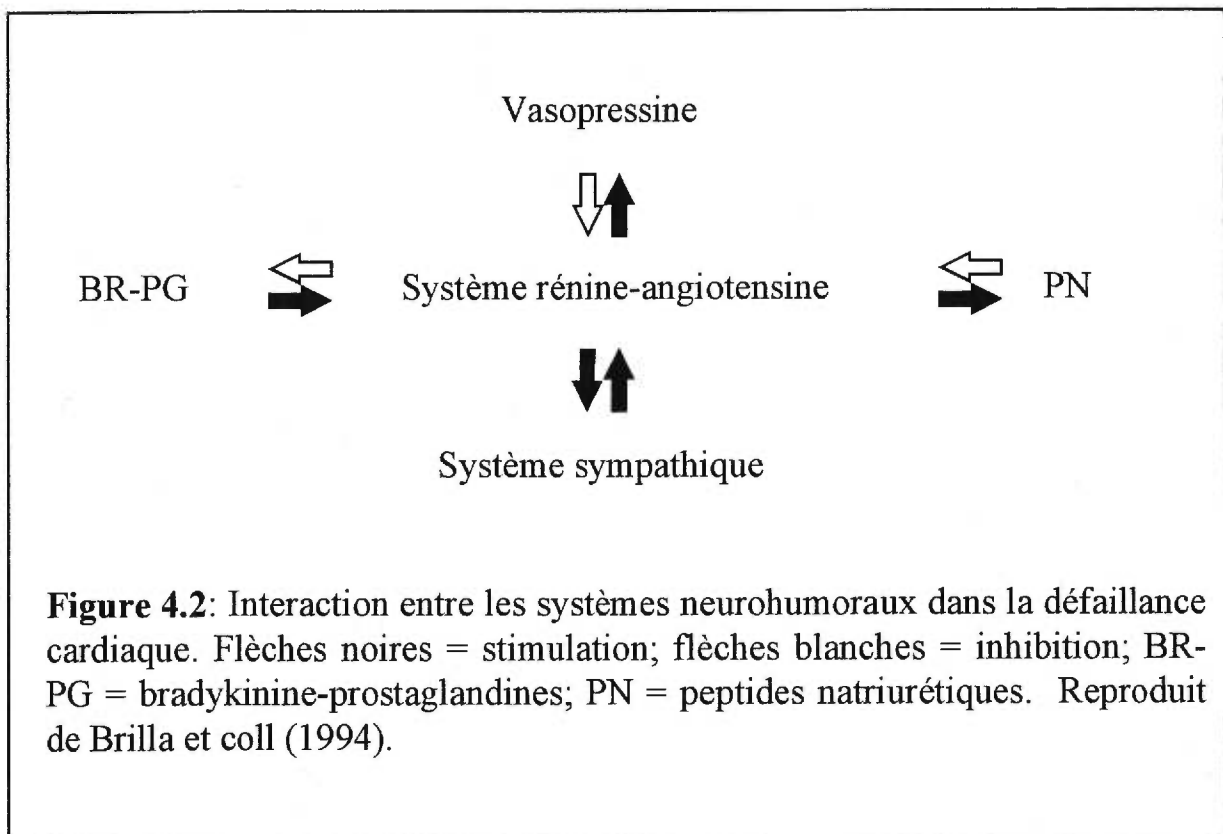


Figure 4.2: Interaction entre les systèmes neurohumoraux dans la défaillance cardiaque. Flèches noires = stimulation; flèches blanches = inhibition; BR-PG = bradykinine-prostaglandines; PN = peptides natriurétiques. Reproduit de Brilla et coll (1994).

culture suite à l'administration de noradrénaline (Allo et coll., 1992; Simpson et coll., 1990; Bhambi et coll., 1991). Ce concept est supporté par des données *in vivo* où l'administration de noradrénaline chez le lapin produit de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque (Gavras et coll., 1975).

4.3.6 Altération fonctionnelle du myocarde

En plus des variations du niveau d'activité du système rénine-angiotensine, les effets de l'angiotensine II sur la contractilité du myocarde semblent être altérés. En effet, des études électrophysiologiques effectuées par la technique de patch-clamp dans des cardiomyocytes isolés de hamsters cardiomyopathiques montrent une dépression de la réponse contractile induite par l'angiotensine II lorsque comparée aux cellules normales (Yamashita et coll., 1994). Des anomalies de l'homéostasie calcique des cardiomyocytes pourrait être à l'origine de cette diminution de réponse. Dans un modèle canin de défaillance cardiaque induit par entraînement électrique ventriculaire rapide, la réponse contractile à l'angiotensine II est également déprimée (Cheng et coll., 1996). Selon ces auteurs, cette diminution de la réponse est possiblement associée à une exacerbation des anomalies de l'homéostasie calcique déjà présentes dans la défaillance cardiaque.

Le **tableau IV.1** résume l'ensemble des effets potentiels du système rénine-angiotensine élaborés à la section 4.2.

Tableau IV.1 Contributions potentielles des systèmes rénine-angiotensine cardiaque et extra-cardiaques dans la physiopathologie de la défaillance cardiaque.

SRA	Effets potentiels	Conséquences physiopathologiques
Cardiaque	Contraction déprimée Arythmies Hypertrophie myocytaire Prolifération des fibroblastes Vasospasmes	↓ travail cardiaque ↓ travail cardiaque Hypertrophie du ventricule gauche Fibrose intersticielle Nécrose multifocale
Vasculaire	↑ la résistance vasculaire ↓ compliance des vaisseaux	↑ post-charge ↑ pré-charge
Rénal	↓ filtration glomérulaire	↓ débit glomérulaire ↑ volume plasmatique Rétention d'eau et de sodium

Reproduit et modifié de Hirsch et coll., (1995). SRA = système rénine-angiotensine

4.3.7 Implication potentielle des récepteurs AT₂ dans la défaillance cardiaque

La plupart des études impliquant des modèles animaux et l'homme ont décrit des effets de l'angiotensine II relayés par les récepteurs AT₁. L'implication du récepteur AT₂ dans la physiopathologie de la défaillance cardiaque est beaucoup moins connue. Toutefois, les études des dernières années ont permis d'énoncer quelques hypothèses. La première est celle d'un effet inhibiteur de la croissance cellulaire, démontré dans des cellules endothéliales coronaires (Stoll et coll., 1995; Nakajima et coll., 1995), dans des cellules musculaires lisses des vaisseaux (Hayashida et coll., 1996) et dans les cardiomyocytes (Booz et coll., 1996). La deuxième est l'induction de l'apoptose, tel que démontrée dans des cellules musculaires lisses (Yamada et coll., 1996). La troisième est une contribution des récepteurs AT₂ au développement de la défaillance cardiaque. Cette hypothèse est proposée suite à l'observation de la modulation des niveaux d'expression des récepteurs AT₂ dans des modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde (Nio et coll., 1995), d'ischémie (Wiemer et coll., 1993) et d'hypertension (Lopez et coll., 1994). Puisque dans ces modèles, l'élément commun

au développement vers la défaillance est la phase de remodelage ventriculaire, il est donc probable que l'augmentation de la densité des récepteurs AT_2 soit impliquée à cette étape.

Chapitre 5: Traitement de la défaillance cardiaque: stratégies thérapeutiques

5.1 Introduction

De façon à optimiser les bénéfices d'une intervention thérapeutique chez un patient présentant une défaillance cardiaque, il est important d'évaluer ses symptômes cliniques de même que son degré d'incapacité à fournir un effort physique. En pratique clinique, la classification de la New York Heart Association permet la catégorisation (**tableau V.I**) de la sévérité de la défaillance cardiaque sachant que le pronostic du patient diminue alors que la classe augmente. La détermination de la sévérité de la défaillance oriente la stratégie thérapeutique dans le but d'en optimiser les bénéfices. Les bénéfices sont, entre autres, la diminution des symptômes et de la fréquence d'hospitalisation, le ralentissement ou même la modification de l'évolution de la maladie et bien sûr, l'augmentation de la survie. Pour que de tels bénéfices soient observés, la stratégie thérapeutique actuelle vise une réduction de la charge de travail du coeur. Cette stratégie comprendra premièrement la diminution de la pré- et de la post-charge (vasodilatateurs, section 5.2), deuxièmement, le contrôle de la rétention d'eau et de sodium (diurétiques, section 5.3) et troisièmement, l'augmentation de la contractilité du myocarde (agents inotropes, 5.4).

Tableau V.I: Classification de la New York Heart Association

Asymptomatique	I	Asymptomatique à l'activité physique normale
Légère-Modérée	II	Symptomatique à l'activité normale
Modérée-Grave	III	Symptomatique à l'activité physique légère
Grave	IV	Symptomatique au repos

Reproduit de la Société cardiovasculaire canadienne (1994).

5.2 Vasodilatateurs

5.2.1 Inhibiteurs de l'ECA

Tel que précédemment discuté, l'activation compensatoire du système rénine-angiotensine au cours de la défaillance est responsable de la rétention d'eau et de sodium ainsi que de l'augmentation de la résistance périphérique et de la vasoconstriction augmentant la charge de travail du coeur. L'approche rationnelle de l'utilisation des inhibiteurs de l'ECA dans le traitement de cette pathologie est donc l'inhibition de la formation de l'angiotensine II et donc de ses effets. En augmentant la capacité systémique, les inhibiteurs de l'ECA redistribuent le volume sanguin et ils diminuent la pression de remplissage des ventricules et, en conséquence, ils réduisent la pré-charge (Kelly et coll, 1996). De plus, puisqu'ils possèdent également un effet dilatateur sur le tonus artériel, ces inhibiteurs diminuent la résistance contre laquelle le coeur doit travailler. Ils réduisent donc la post-charge et globalement ils augmentent le débit cardiaque.

Parmi les thérapies pharmacologiques établies, seul le blocage du système rénine-angiotensine par l'inhibition de l'ECA est associé à une diminution de la mortalité des patients en défaillance cardiaque. En fait, actuellement les inhibiteurs de l'ECA constituent la classe thérapeutique de première ligne pour tout patient dont la fraction d'éjection est égale ou inférieure à 35 %. Les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA semblent être un effet de classe, et aucun autre médicament ne s'est encore révélé supérieur (Société cardiovasculaire canadienne, 1994). Lorsqu'administrés en défaillance cardiaque, ces inhibiteurs améliorent la fonction cardiaque, diminuent le remodelage ventriculaire et réduisent la mortalité chez des patients qui présentent une dysfonction du ventricule gauche avec ou sans symptômes ou chez des patients présentant une atteinte modérée ou sévère après un infarctus du myocarde et traités (CONSENSUS II, 1987; SOLV, 1992; AIRE, 1993; SAVE, 1992).

Les effets cardioprotecteurs associés à l'administration chronique chez l'homme des inhibiteurs de l'ECA sont également rapportés dans plusieurs modèles expérimentaux. Avec ces agents, dans l'infarctus du myocarde suite à une ligature de la coronaire chez des rats, on observe: 1) une amélioration des indices hémodynamiques (Nishikimi et coll., 1995; Thuillez

et coll., 1990); 2) une amélioration de la performance cardiaque (Raya et coll., 1991); 3) une diminution du remodelage ventriculaire avec une régression de l'hypertrophie (Schieffer et coll., 1994; Mulder et coll., 1997) et; 4) une augmentation de la survie des animaux (Milavetz et coll., 1996; Pfeffer et coll., 1985; Mulder et coll., 1997). Des effets bénéfiques importants et comparables à ceux observés chez le rat après infarctus du myocarde sont également notés lors de l'administration chronique de ces agents chez le hamster cardiomyopathique (Haleen et coll., 1991; Narita et coll., 1996;). Nakamura et coll. (1994) de plus montrent que le traitement avec un inhibiteur de l'ECA, le cilazapril, prévient en partie les lésions histologiques typiques de ces animaux. Par contre, d'une façon inexplicée, une étude ne montre pas de régression de l'hypertrophie induite par surcharge pressive par sténose de l'aorte chez des rats après un traitement de 14 jours au ramipril (1mg/kg/jour) (Zierhut et coll., 1991).

Bien que les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA soient bien documentés, leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement éclairci. Leurs effets cardioprotecteurs pourraient être associés à deux mécanismes d'action: 1) l'inhibition des effets de l'angiotensine II par le blocage de sa synthèse et/ou 2) l'inhibition de la dégradation des kinines endogènes due à l'inactivation de l'ECA qui dégrade normalement ces peptides.

En ce qui a trait à la deuxième hypothèse, il semble que les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA puissent être relayés par la bradykinine. Il est reconnu que la bradykinine exerce des effets vasodilatateurs par la relâche de monoxyde d'azote et de prostaglandines (Liu et coll., 1996). Ces effets pourraient donc diminuer la charge de travail grâce à une pré-charge moins importante. Certaines études de plus montrent que les effets de la bradykinine ne se limiteraient pas qu'à ses effets hémodynamiques. Dans ce sens, les travaux de Linz et Scholkens (1992) montrent chez les rats hypertrophiés par ligature de l'aorte abdominale, une régression de l'hypertrophie ventriculaire suite à l'administration d'un inhibiteur de l'ECA, le ramipril pendant 6 semaines (1mg/kg/jour et 10 ug/kg/jour). Cette régression est abolie par l'administration simultanée d'un antagoniste du récepteur B₂ de la bradykinine, le HOE 140 et est indépendante de la diminution de la pression artérielle. Ces mêmes auteurs rapportent

des effets cardioprotecteurs vraisemblablement reliés aux kinines suite à une ischémie/reperfusion chez le rat (Liu et coll., 1996). D'autres études réalisées chez des rats après infarctus du myocarde par ligature de la coronaire indiquent que la plupart des effets cardioprotecteurs à moyen terme des inhibiteurs de l'ECA ne sont pas observés lorsque le récepteur B₂ de la bradykinine est inhibé (Liu et coll., 1997). Ces résultats sont fortement appuyés par la démonstration de la présence de récepteurs à la bradykinine dans le tissu cardiaque (Minshall et coll., 1995).

5.2.2 Antagonistes du récepteur AT₁ à l'angiotensine II

L'on suggère que l'administration chronique des antagonistes du récepteur AT₁, présente un avantage sur les inhibiteurs de l'ECA. Bien que la stratégie de cette intervention thérapeutique soit également basée sur la neutralisation du système rénine-angiotensine, le blocage spécifique des sites de liaison permet de plus en théorie l'inhibition des effets de l'angiotensine II produite par des voies indépendantes de l'ECA. Tel que déjà mentionné, des chymases endogènes, qui hydrolysent une variété de substances dont l'angiotensine I en angiotensine II, sont retrouvées chez plusieurs modèles expérimentaux tel le hamster cardiomyopathique (Shiota et coll., 1997) et l'humain (Urata et coll., 1990; Wolny et coll., 1997). Bien que le rôle physiopathologique des chymases ne soit pas encore établi, cette voie alternative pourrait représenter une voie de formation importante de l'angiotensine II. Le blocage direct du récepteur AT₁ n'affecte toutefois pas la voie de la bradykinine (Linz et coll., 1992).

De nombreuses études ont comparé les effets des inhibiteurs de l'ECA et des antagonistes AT₁ et elles ont décrit des effets cardioprotecteurs comparables dans la plupart des modèles expérimentaux. Jusqu'à ce jour, l'administration chronique des antagonistes AT₁ montre chez des rats après infarctus du myocarde: 1) une amélioration des variables hémodynamiques (Raya et coll., 1991; Liu et coll., 1997); 2) une amélioration de la performance cardiaque (Liu et coll., 1997); 3) une réduction du remodelage ventriculaire (Schieffer et coll., 1994; Liu et coll., 1997) incluant l'hypertrophie (Timmermans et coll., 1993; Dixon et coll., 1997) et; 4) une augmentation de la survie (Milavetz et coll., 1996). Chez les rats spontanément

hypertendus, le blocage du récepteur AT_1 prévient la progression de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Kojima et coll., 1994) tout comme chez les rats hypertrophiés suite à une surcharge pressive (Bruckschlegel et coll., 1995). Quelques études ne montrent pas de régression de l'hypertrophie ventriculaire dans certains modèles expérimentaux comme par exemple l'hypertrophie cardiaque induite chez des rats Dahl par surcharge sodique (Sugimoto et coll., 1996). Chez le rat avec une hypertrophie induite par surcharge pressive suite à une sténose aortique, il n'y a pas de réduction de l'hypertrophie cardiaque suite au blocage du récepteur AT_1 mais une amélioration des paramètres hémodynamiques est notée (Weinberg et coll., 1997).

Dans plusieurs modèles expérimentaux et chez l'humain, les antagonistes du récepteur AT_1 exercent des effets antihypertenseurs comparables à ceux de l'inhibition de l'ECA et ces agents sont présentement commercialisés pour le traitement clinique de l'hypertension (Timmermans et coll., 1995). Les résultats obtenus avec les antagonistes du récepteur AT_1 dans des modèles expérimentaux progressant vers la défaillance proviennent d'études à court terme et peu de résultats sur les effets d'un blocage à long terme sont disponibles jusqu'à ce jour. Des études aiguës réalisées chez des patients en défaillance cardiaque indiquent que des effets vasodilatateurs et des réponses neurohumorales favorables sont obtenues par l'inhibition du récepteur AT_1 (Dickstein et coll., 1994; Gottlieb et coll., 1993; Sweet et coll., 1994). Une étude récente rapporte une diminution de la mortalité (mort soudaine d'origine arythmique) des patients après infarctus du myocarde par un traitement avec un antagoniste des récepteurs AT_1 , le losartan, lorsque comparé au groupe recevant un inhibiteur de l'ECA, le captopril (ELITE, 1997).

L'implication du récepteur AT_2 dans le développement de la défaillance cardiaque n'est présentement pas connue. Cependant, la capacité du tissu cardiaque à moduler l'expression du récepteur AT_2 dans des pathologies cardiovasculaires expérimentales et humaines telles la défaillance cardiaque et l'hypertrophie (Asano et coll., 1997; Nozawa et coll., 1996) suggère fortement une implication de ce récepteur. Cette hypothèse est soutenue par des études réalisées chez le rat après un infarctus du myocarde où les effets cardioprotecteurs des

antagonistes du récepteur AT₁, étaient partiellement bloqués par un antagoniste du récepteur AT₂, le PD123319 (Liu et coll., 1997). L'on suggère présentement que l'administration des antagonistes du récepteur AT₁ en bloquant la liaison de l'angiotensine II au récepteur AT₁, induisent une hypersécrétion de rénine, ce qui augmente l'angiotensine II plasmatique/tissulaire et favorisant ainsi la liaison de cette dernière au récepteur AT₂. Les effets bénéfiques des antagonistes AT₁ seraient donc possiblement relayés par la stimulation non-masquée du récepteur AT₂ (Nakajima et coll., 1995; Stoll et coll., 1995). Une étude effectuée avec des coeurs isolés de rats ayant subi une période d'ischémie suivie d'une reperfusion indiquent des effets opposés des antagonistes du récepteur AT₁ et du récepteur AT₂ sur la récupération de la fonction mécanique. En effet, il semble qu'un traitement à court terme avec un antagoniste du récepteur AT₂ protège le coeur alors que l'antagonisme AT₁ est délétère (Ford et coll., 1996). Une meilleure récupération de la fonction cardiaque après infarctus du myocarde consisterait le premier rôle documenté du récepteur AT₂ dans la pathologie cardiovasculaire.

5.2.3 Autres substances vasodilatatrices

Bien que les inhibiteurs de l'ECA aient un avantage marqué dans le traitement de la défaillance cardiaque, l'association hydralazine-dinitrate d'isosorbide peut être administrée chez les patients intolérants ou mal contrôlés par les inhibiteurs de l'ECA. Des études cliniques ont d'ailleurs montré une augmentation de la survie des patients traités chroniquement avec cette association (Cohn et al., 1986). D'autres vasodilatateurs tels les nitrates et les antagonistes des canaux calciques sont également utilisés. Les nitrates sont administrés surtout pour le traitement de l'angine qui survient dans plus de 60 % des cas de défaillance. Des études réalisées par McDonald et coll. (1994) ont montré, dans un modèle canin, que ces composés réduisent le remodelage ventriculaire. Il convient de mentionner que les antagonistes des canaux calciques sont contreindiqués dans la défaillance cardiaque grave puisqu'ils exacerbent la dépression de la fonction cardiaque (Société cardiovasculaire canadienne, 1994). Finalement, des études cliniques ont rapporté des bénéfices chez les patients présentant une défaillance cardiaque suite au blocage chronique des récepteurs β -adrénergiques (Packer et coll., 1996). Les résultats obtenus soulignent que le carvedilol est

associé à un ralentissement de la progression de la maladie et à une diminution de la fréquence d'hospitalisation. Il convient de mentionner que le carvedilol est un antagoniste non-spécifique des récepteurs β_1 , β_2 et α_1 -adrénergiques. Il possède de plus une activité anti-oxidante qui peut potentiellement protéger des dommages causés au myocarde par les radicaux libres. Son effet bénéfique ne peut être entièrement attribué à son action vasodilatatrice.

5.3 Diurétiques

Plusieurs des manifestations cliniques de la défaillance cardiaque sont secondaires à une surcharge volumique et à une expansion du compartiment interstitiel. Les diurétiques s'opposent à ces effets en permettant l'excrétion d'eau et de sodium ce qui réduit le volume plasmatique et donc les congestions pulmonaire et systémique. Bien que les diurétiques diminuent la charge volumique et qu'ils améliorent la symptomatologie, ils stimulent toutefois le système rénine-angiotensine. Ceci exacerbe le cercle vicieux de la défaillance en augmentant la résistance vasculaire et en diminuant le débit cardiaque. Bien que l'efficacité des diurétiques à réduire les symptômes congestifs ait été établie, ils ne ralentissent toutefois pas la progression de la défaillance cardiaque et ils n'égalent donc pas l'efficacité des agents inhibant le système rénine-angiotensine. Les diurétiques sont administrés chez les patients en défaillance cardiaque modérée ou sévère à une dose minimale maîtrisant les symptômes et adaptées à la fonction rénale de chaque individu (Société cardiovasculaire canadienne, 1994).

5.4 Agents inotropes

Les inhibiteurs de l'ECA consistent le traitement "standard" chez les patients avec une défaillance cardiaque. Toutefois, ces agents n'exercent pas d'effet sur la contractilité du myocarde. Les glycosides digitaliques, qui possèdent un effet inotrope positif, sont utilisés dans le traitement de la défaillance cardiaque depuis plus de 200 ans. Ces substances sont des inhibiteurs de la pompe Na^+/K^+ ATPasique. L'inhibition de l'activité de cette pompe résulte en une réduction de l'extrusion du Na^+ et une accumulation de Na^+ cytosolique. Ceci conduit à l'expulsion du Na^+ et l'entrée du Ca^{2+} via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et donc à une élévation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} . L'augmentation de la disponibilité du Ca^{2+} favorise

l'interaction des protéines contractiles augmentant ainsi la force de contraction du coeur (Kelly et coll., 1996). Malgré ces effets théoriquement bénéfiques dans le maintien de la fonction cardiaque, une diminution de la mortalité des patients traités avec des agents inotropes positifs n'a pas encore été démontrée. Selon une étude effectuée avec des patients en défaillance cardiaque recevant de la digoxine, une diminution de la fréquence d'hospitalisation est observée sans modifications toutefois de la mortalité par rapport aux patients recevant le placebo (Garg et coll., 1995). D'autres agents inotropes positifs tel les inhibiteurs de la phosphodiastérase sont également à considérer. Ces composés, en inhibant la phosphodiastérase III, empêchent l'hydrolyse de l'AMP cyclique en AMP. L'augmentation de la disponibilité de l'AMP cyclique permet une activation accrue de la voie de la protéine kinase A. La protéine kinase A phosphoryle à son tour le canal calcique qui s'ouvre et permet l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule. Chez le patient en défaillance cardiaque, le traitement chronique avec la vesnarinone a montré une amélioration de la morbidité et de la mortalité (Feldman et coll., 1993). De plus, il a été démontré qu'un traitement à long terme au pimobendan prolonge la vie des hamsters cardiomyopathiques (van Meel et coll., 1989). L'efficacité des agents inotropes sur le pronostic des patients positifs en défaillance cardiaque est cependant considérée douteuse depuis la publication de résultats négatifs sur la mortalité obtenus avec les inhibiteurs de la phosphodiastérase III (Packer et coll. 1991).

6.0 Hypothèses et objectifs de travail

Les rôles physiologiques les mieux connus de l'angiotensine II sont associés au maintien de la pression artérielle et de l'équilibre hydrosodée. Les travaux de 20 dernières années ont permis de mettre en évidence l'influence du peptide, via des mécanismes autocrines et/ou paracrines, sur la croissance d'une variété de types cellulaires tels les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques mais aussi sur la modulation de la contractilité, de la fréquence cardiaque et du débit coronarien. Ces résultats indiquent que l'angiotensine II semble contribuer au maintien de la fonction cardiovasculaire. Par ailleurs, au cours de la défaillance cardiaque, une modulation importante de l'activité des systèmes rénine-angiotensine circulant et cardiaque est observée. Dans le tissu myocardique, l'activation du système rénine-angiotensine contribue vraisemblablement à l'initiation des lésions primaires, au remodelage ventriculaire et à la détérioration de la fonction cardiaque. La présence d'une surexpression cardiaque du récepteur AT_1 avant l'apparition des lésions histologiques typiques chez le hamster cardiomyopathique suggère un rôle du système rénine-angiotensine dans le développement et/ou le maintien de la cardiomyopathie. Par ailleurs, aucune autre étude ne s'est intéressée jusqu'à présent aux effets d'un blocage spécifique du récepteur AT_1 sur l'évolution de la cardiomyopathie du hamster Syrien. Puisque l'angiotensine II peut être produite dans le coeur de hamster Syrien par des voies indépendantes de l'ECA, le blocage spécifique du récepteur AT_1 pourrait produire une meilleure protection que celle offerte par les inhibiteurs de l'ECA.

Dans une première série d'expériences, nous avons pour objectif d'étudier la sévérité des lésions histologiques, le degré d'hypertrophie cardiaque ainsi que la survie d'animaux témoins consanguins et cardiomyopathiques ayant reçu le placebo, un antagoniste spécifique du récepteur AT_1 , le losartan ou un inhibiteur de l'ECA, le quinapril. Les traitements ont débuté à 50 jours d'âge et ont été administré par voie orale quotidiennement. À 175 jours ou 325 jours des hamsters ($N = 12$ /groupe) ont été sacrifiées pour la détermination du degré d'hypertrophie. Les lésions histologiques cardiaques ont été évaluées chez les hamsters âgés de 325 jours. Parallèlement à l'étude de survie, l'objectif était d'évaluer, par des études de liaison, l'effet du blocage chronique du système rénine-angiotensine - inhibition de l'ECA et antagonisme du récepteur AT_1 - sur les concentrations d'angiotensine II et la densité des récepteurs cardiaques à l'angiotensine II.

Bien que les altérations morphologiques et biochimiques qui se développent au cours de la cardiomyopathie du hamster Syrien soient bien décrit, le(s) mécanisme(s) précis responsable(s) du développement de cette pathologie est(sont) mal connu(s). D'autre part, puisqu'il est clairement établi que des augmentations de Ca^{2+} intracellulaire sont observées dans les cellules cardiomyopathiques et que des augmentations soutenues de Ca^{2+} intracellulaire peuvent induire l'apoptose, il est possible que le processus apoptotique soit impliqué dans le développement de la cardiomyopathie. Nous avons donc, dans cette troisième étude, examiné la présence de ce processus dans le myocarde de hamster cardiomyopathique. La détection et quantification de l'apoptose ont été effectuées dans les ventricules gauches des hamsters témoins consanguins et cardiomyopathiques âgés de 50, 175 et 350 jours à l'aide de la technique immunohistochimique "TUNEL" qui identifie les fragments d'ADN générés par le processus apoptotique ainsi que l'identification des caractéristiques ultrastructurales de l'apoptose par microscopie électronique.

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DES ARTICLES

ARTICLE 1

Accepté dans Cardiovascular Research

Mars 1999

CHRONIC AT₁ RECEPTOR BLOCKADE AND ACE INHIBITION**IN (CHF 146) CARDIOMYOPATHIC HAMSTERS:****Effects on cardiac hypertrophy and survival**

Natacha R. Bastien, Anne-Véronique Juneau, Julie Ouellette and Chantal Lambert

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Correspondence to: Dr. Chantal Lambert, B.Pharm., Ph.D., Department of
Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P.
6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
Tel : (514) 343-6506
Fax : (514) 343-2291
E-mail : lambec@ere.umontreal.ca

Natacha R. Bastien, Anne-Véronique Juneau, Julie Ouellette and Chantal Lambert
Chronic AT₁ receptor blockade and ACE inhibition in (CHF 146) cardiomyopathic hamsters: Effects on cardiac hypertrophy and survival

Objective We have reported that angiotensin II AT₁ receptors are upregulated and there are no AT₂ receptors in the ventricles of cardiomyopathic hamsters. Since the upregulation was already present when no histological lesions are detectable, these results suggested that angiotensin II plays a role in the genesis/maintenance of this pathology. A survival study was conducted to compare the effects of an angiotensin II AT₁ receptor antagonist, losartan (L), to those of a placebo (P). Since the ACE inhibitor quinapril (Q) has been shown to have beneficial effects in this animal model, a Q group was included. **Methods** Male Syrian cardiomyopathic hamsters (CHF 146, N=360) were orally administered P, low- (30 mg/kg/day) or high-dose (100 mg/kg/day) L or Q (100 mg/kg/day) starting at day 50 of life. Inbred control hamsters (CHF 148, N=180) were treated with P or L (100 mg/kg/day) as controls. Animals were sacrificed at intervals to evaluate cardiac hypertrophy. Kaplan-Meier analysis was performed to assess differences in survival. **Results** High-dose L had no effects on the survival of control hamsters. There was an unexpected dose-dependent decrease in the survival of cardiomyopathics treated with L (low-dose, P=0.14; high-dose, P=0.0015) compared to an increase with Q (P=0.0003). Cardiac hypertrophy compared to P was increased with L but significantly decreased with Q in cardiomyopathics. **Conclusions** In this model, losartan did not improve survival compared to placebo and quinapril and, if anything, have increased mortality. Our results suggest that AT₁ receptor antagonists and ACE inhibitors are not necessarily equivalent or interchangeable in terms of their effects on cardiac hypertrophy and survival in selected progressive heart failure models.

KEY WORDS

Discipline: experimental
Object of study: heart
Level: pathophysiology – pharmacology

ACE inhibitors, cardiomyopathy, hypertrophy, AT₁ receptors, renin-angiotensin system

INTRODUCTION

Syrian golden hamsters of the cardiomyopathic strain have a non-pressure-overload cardiac disease that originates from a genetically-transmitted metabolic anomaly which induces degenerative lesions in all striated muscles, with particular consistency and intensity in the heart [1]. The animals have a common defect in a gene for delta-sarcoglycan, a dystrophin-associated glycoprotein, which is functionally involved in stabilizing sarcolemma [2]. The development of the pathology is characterized by the occurrence of focal myocardial degeneration and it can be divided into four temporal phases: pre-necrotic (25 to 30 days), necrotic (70 to 75 days), hypertrophic (125 to 150 days) with progressing dilatation (225 to 250 days), and severe heart failure (325 to 350 days) [3]. The clinical course and pathological aspects of the hamster's chronic cardiac condition resembles hypertrophic cardiomyopathy observed in clinics. As in humans, the resulting depression of cardiac function is associated with a significant decrease in life expectancy.

Compared with normal animals, it has been shown that the cardiomyopathic hamsters display an activated renin-angiotensin system which is characterized by higher plasma and ventricular angiotensin II concentrations, as well as higher ventricular angiotensin-converting enzyme (ACE) activity [4-6]. Shiota et al. [7] have also reported that heart chymase is activated in the cardiomyopathic hamster during the necrotic and hypertrophic stages. It has been demonstrated that ACE inhibitors such as quinapril, cilazapril, imidapril, indopril, enalapril and captopril improve myocardial collagen metabolism and decrease cardiac remodeling [8-10], preserve contractile function [4, 5, 11], prevent the progression

of left ventricular failure and/or increase the probability of survival [4, 12, 13] of these animals.

Many studies have demonstrated that angiotensin II, via AT₁ receptors, stimulates myocardial cell hypertrophy as well as growth of the cardiac interstitium [4, 14]. The cardioprotective effect of chronic ACE inhibition that has been observed in several hypertrophic experimental models [15-17] and in human progressive cardiac failure [18, 19], has been attributed to the inhibition of cardiac ACE activity and mainly to the resulting decrease in AT₁ receptor activation. Studies from our laboratory have shown significant increases in ventricular angiotensin II AT₁ receptor expression in cardiomyopathic hamsters whereas AT₂ receptors have not been detected [20]. Since the upregulation was present before the appearance of the cardiac histological lesions, this strongly suggested that the renin-angiotensin system and more specifically the AT₁ receptors, are involved in the development and/or the maintenance of the cardiomyopathy in Syrian hamsters. In this case, since it has been established that angiotensin II might be produced in the heart of hamsters via alternate pathways that are independent of the converting enzyme [7], a specific blockade of AT₁ receptors should offer greater protection than the inhibition of the converting enzyme.

The first aim of this study was therefore to evaluate the effects of a chronic blockade of AT₁ receptors on the survival of cardiomyopathic hamsters compared with those of a placebo as well as of a chronic ACE inhibition used as a positive control. The second aim was to

correlate the animals' survival with the development of the cardiac histological lesions and/or the degree of ventricular hypertrophy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Losartan was supplied by Merck & Co. (Rahway, NJ) and Quinapril by Parke-Davis (Ann Arbor, MI).

Animals and experimental groups

Male Syrian inbred control (CHF 148, N = 180) and cardiomyopathic (CHF 146, N = 360) hamsters aged 40 days were purchased from the Canadian Hybrid Farm (Nova Scotia, Canada). The animals were housed individually in a temperature-controlled room, with a 6:00 a.m. to 6:00 p.m. light:dark cycle. The animals were given a regular rat chow and had access to tap water ad libitum. At 50 days of age, the hamsters were equally divided (N = 90) and randomly assigned to one of the experimental groups (Figure 1).

Drug administration

The low-dose of losartan (30 mg/kg/day) was determined as a dose that significantly shifts to the right the angiotensin II pressor dose-response curves obtained in anesthetized hamsters [21]. Figure 2 presents the results obtained in untreated animals as well as in treated hamsters 24-hours following oral administration of a single dose of losartan (30 mg/kg). The dose-response curves were statistically analyzed using AllFit for Windows

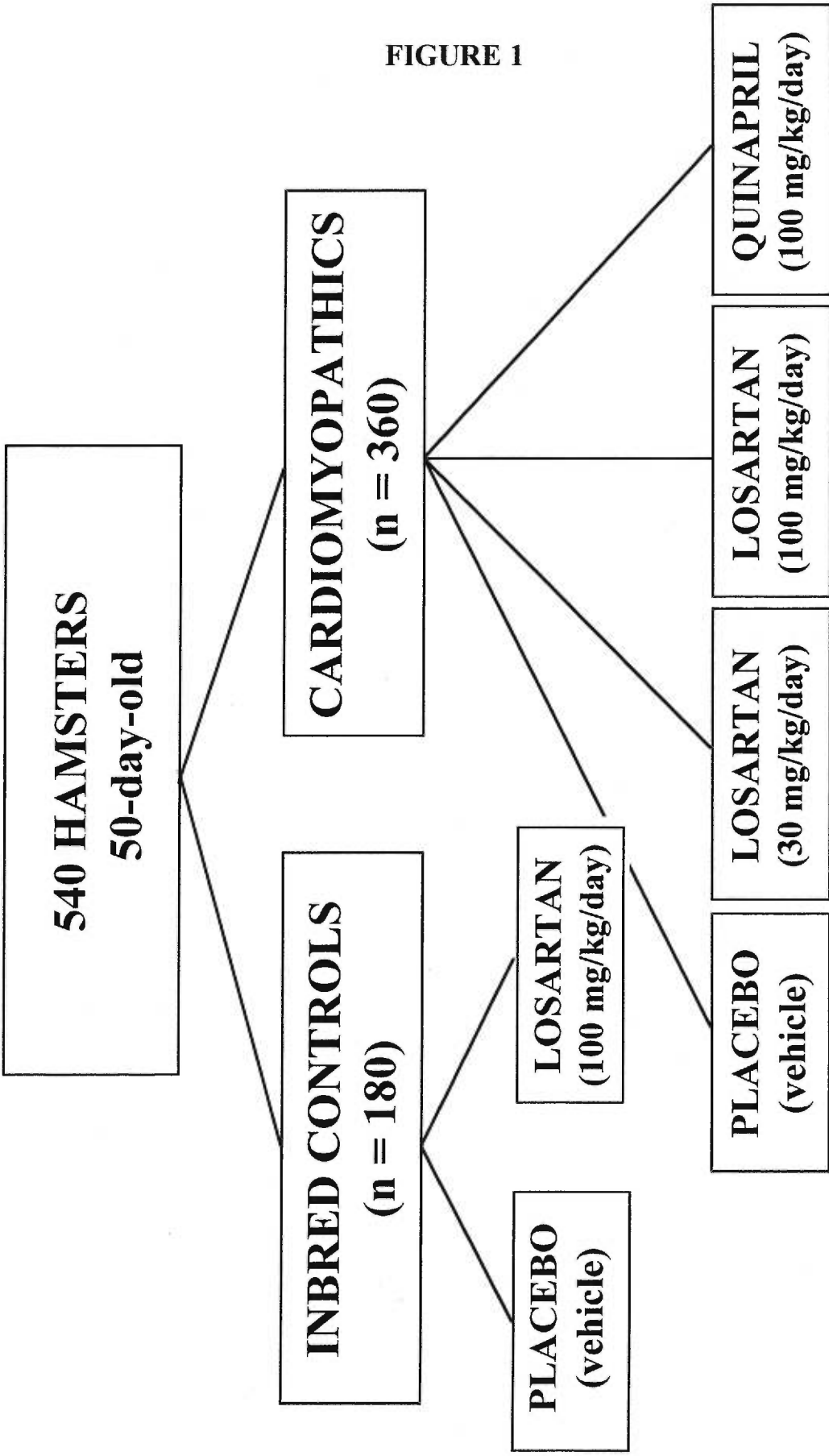
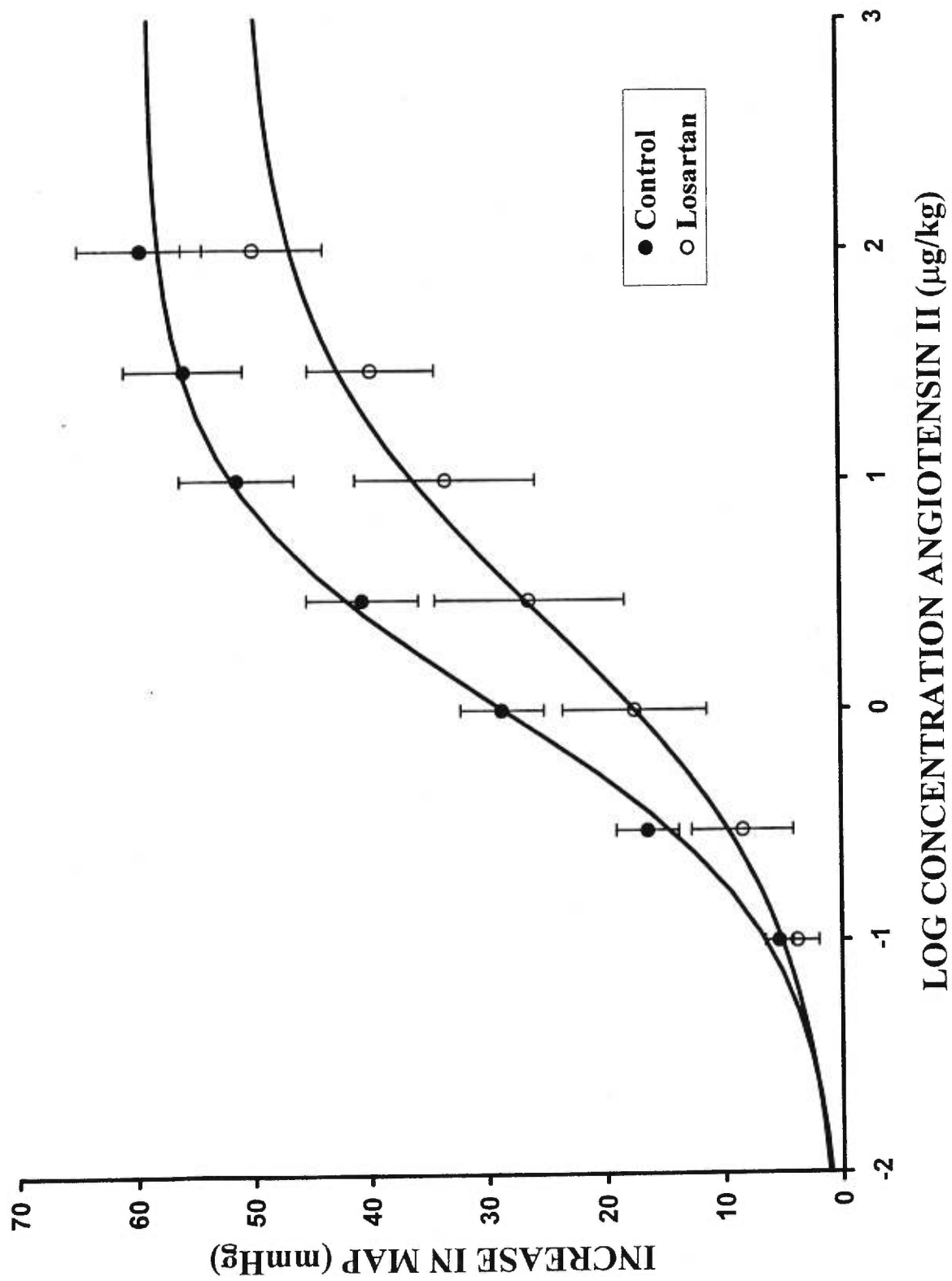


FIGURE 1

FIGURE 2



(22) and indicate a significant ($P \leq 0.001$) blockade of AT_1 receptors. A high-dose of losartan (100 mg/kg/day) was administered to eliminate false negative results (data not shown). To offset the bitter taste of losartan, the powder was dissolved in a flavoured commercial jelly (pH adjusted at 7.5). The placebo (jelly alone) and the drug were administered orally between 8:00 and 10:00 a.m. everyday, in 200 μ l-aliquots using a micropipette.

The dose of quinapril (100 mg/kg/day) was chosen on the basis of the results of Haleen et al. [4] who demonstrated that at this dosage, quinapril significantly prevented the progression of left ventricular failure and increased the probability of survival of cardiomyopathic hamsters. The powder was dissolved and administered in drinking water sweetened with a sugar alternative (1%). The concentration of the solution was determined based on a previous study in which cardiomyopathic hamsters drank 5-7 ml water/day [23]. The solutions were prepared daily and given to the hamsters at 8:00 a.m

All animals were weighed every two weeks and the concentration of drugs was adjusted to the average weight of the treatment group.

Survival

Of the 90 hamsters in each group, 12 animals were sacrificed at 175 and 325 days of age for the evaluation of cardiac histological lesions and hypertrophy. Twelve (12) inbred control and 12 cardiomyopathic hamsters were also sacrificed at 50 days of age for heart and body weight baseline determinations.

Of the remaining animals (66/group), the hamsters that died from non-cardiac causes (wet tail, accident, etc.) were excluded from the survival study. Based on this criteria, the final number of hamsters in each treatment group was as follows: 61 in the inbred controls-placebo group; 63 in the inbred controls-losartan (100 mg/kg/day) group; 65 in the cardiomyopathics-placebo group; 65 in the cardiomyopathics-losartan (30 mg/kg/day) group; 64 in the cardiomyopathics-losartan (100 mg/kg/day) group; and 64 in the cardiomyopathics-quinapril group.

Cardiac mortality was either spontaneous or provoked by the sacrifice of the animal when the following serious signs of distress were all present (peripheral oedema, dyspnea, lethargy, coldness and water consumption ≤ 3 ml/day). The decision to sacrifice an animal when it was clear that survival was only a question of few hours, was dictated by our Deontological Committee in order to eliminate unnecessary suffering. In both cases (spontaneous or provoked), a gross necropsy was always performed to confirm the presence of the characteristic symptoms of heart failure (ascites, pleural effusion, hepatomegaly/hepatic congestion, ventricular hypertrophy and/or dilatation). The end point of the study was the death of $\geq 50\%$ of the placebo-treated cardiomyopathic hamsters as well as the confirmation of a significant difference between cardiomyopathic placebo- and quinapril-treated groups. All procedures for animal experimentation conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were monitored by an institutional animal care committee.

The probability of survival of placebo-, losartan- (low- and high-dose) and quinapril-treated hamsters was determined using the Kaplan-Meier approach to survival distributions, the log-rank test.

Cardiac histological lesions and hypertrophy

As already mentioned, 12 hamsters per group were sacrificed at 175 days of age and 12 at 325 days of age. The animals were anesthetized with thiopental (50 mg/kg, i.p.). Their hearts were rapidly removed and allowed to beat in ice-cold PBS. After they were washed, the left and right ventricles were dissected, weighed and cut in half between the base and apex with a disposable blade. Ventricles were fixed in 10% neutral formalin for 24-48 hours. Seven micron sections were cut and stained using the von Kossa technique for the evaluation of calcification and the Masson's Trichrome technique for the evaluation of fibrosis.

The quantification of the lesions was done on the septum and left ventricular free walls of 325-day-old hamsters. A four-grade semi-quantitative scoring method was used to characterize the intensity and extent of tissular alterations. The scores, which were attributed according to the intensity and extent of the lesions, were expressed as very slight, slight, moderate or severe. The quantification was performed by an independent blinded pathologist (ClinTrial BioRecherches, Montréal, Canada).

Cardiac hypertrophy was evaluated in 175- and 325-day-old animals as the ventricle/body weight ratio. Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were

determined using two-way analysis of variance and Bonferroni *t* tests. The critical level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Plasma biochemical analyses

Plasma sodium, potassium, ALT and creatinine concentrations were evaluated in 450-day-old inbred control hamsters as well as in cardiomyopathic hamsters at end-stage of failure (\cong 450 day-old, $N = 15/\text{group}$). Routine laboratory tests were performed at Sainte-Justine Hospital. Plasma sodium and potassium concentrations were analyzed with selective electrodes (CX-7 Analyser, Beckman). Plasma ALT activity was measured by an enzymatic rate method using ALT Reagent (Synchron CX Systems). Plasma creatinine concentrations were determined by means of the Jaffé rate method (Synchron CX Systems). Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were determined using two-way analysis of variance and Bonferroni *t* tests. The critical level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Hemodynamic study

As hemodynamic parameters were not monitored during the survival study, the contribution of peripheral effects of the drugs on blood pressure and heart rate is unknown. Since it is well established that cardiomyopathic hamsters have low blood pressure [24, 25], we believed that additional preload and afterload reductions would have provided little effect. Nevertheless, in order to rule out this possibility, an **a posteriori** hemodynamic study was performed. To do so, 350-day-old inbred control ($N = 14$) and cardiomyopathic ($N = 21$) hamsters were equally divided and randomly assigned to one of the experimental groups :

inbred controls-placebo; inbred controls-losartan (100 mg/kg/day); cardiomyopathics-placebo; cardiomyopathics-losartan (100 mg/kg/day) and; quinapril (100 mg/kg/day). The treatments were administered for 3 weeks.

On study day, the hamsters were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (90 and 5 mg/kg i.m., respectively) and supplemented with the anesthetic when required. A polyethylene catheter (PE 50) filled with heparin sodium (1000 U/ml) was inserted into the right carotid artery, and pushed into the aorta to continuously monitor the arterial blood pressure with a transducer connected to a blood pressure analyzer (Harvard apparatus). At the beginning of each experiment, an average of 30 min equilibration period was allowed to ensure stabilization of the preparation. Systolic and diastolic blood pressures and heart rate were then monitored. Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were determined using two-way analysis of variance and Bonferroni *t* tests. The critical level of significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Effects of treatments on survival

The survival study ran for 490 days, beginning with 50-day-old animals and ending at 540 days of age. A total of 29 (6 spontaneous and 23 provoked), 39 (7 spontaneous and 32 provoked), 43 (3 spontaneous and 40 provoked) and 10 (2 spontaneous and 8 provoked) cardiac deaths has been noted in the cardiomyopathic groups treated with the placebo, losartan (30 mg/kg/day), losartan (100 mg/kg/day) or quinapril, respectively.

Figure 3 presents the probability of survival for the four cardiomyopathic groups only, since no cardiac deaths were observed in the inbred control groups treated with either the placebo or the high-dose of losartan.

Results for the cardiomyopathic hamsters treated with the placebo represent a typical survival curve for these animals and correspond to a median probability of survival of 489 days. As already reported by Haleen et al. [4], quinapril significantly increased the life expectancy with a median probability of survival of more than 540 days. In fact, when the study was stopped, 77% of the hamsters included in the quinapril group were still alive. An unexpected result was that low- and high-doses of losartan decreased life expectancy when compared with the placebo ($P = 0.14$ and $P = 0.0015$, respectively) as well as with quinapril ($P = 0.0001$ for both doses of losartan). The resulting median probabilities of survival were of 449 days for the low-dose of losartan and of 433 days for the high-dose.

Effect of treatments on cardiac histological lesions

To explain or correlate the results obtained in the survival study, ventricular histological lesions and hypertrophy were evaluated. Table 1 shows the incidence and intensity of calcification and fibrosis in the septum and left ventricular free walls of 325-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters.

Myocardial calcification lesions were absent in both groups of inbred control hamsters whereas, as expected, the occurrence of these lesions was significantly increased in the

FIGURE 3

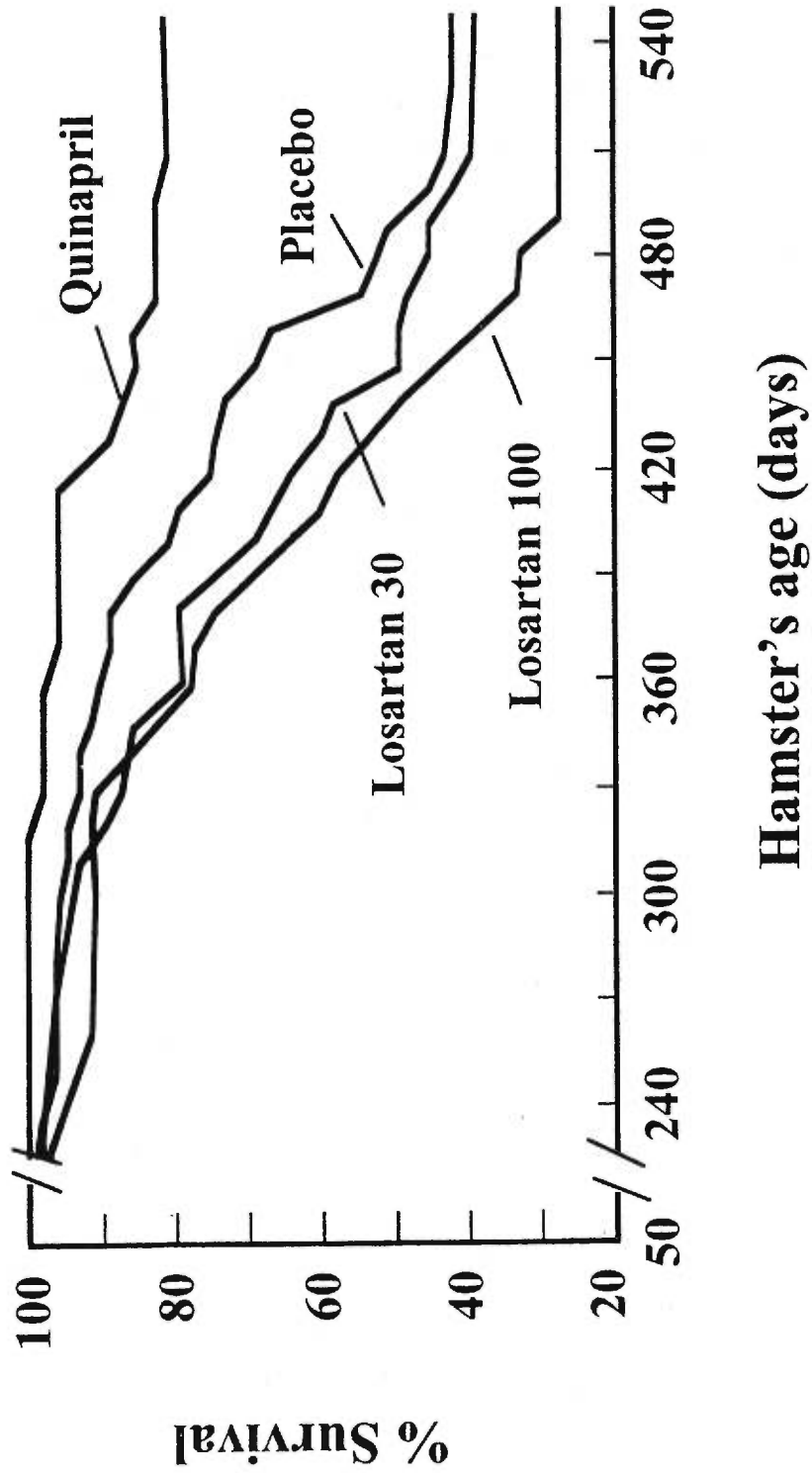


TABLE 1

**INCIDENCE AND INTENSITY OF CALCIFICATION AND
FIBROSIS IN SEPTUM AND LEFT VENTRICULAR FREE
WALLS OF INBRED CONTROL AND CARDIOMYOPATHIC
HAMSTERS OF 325-DAY-OLD.**

	INBRED CONTROLS		CARDIOMYOPATHICS			
	Placebo	Losartan (100mg)	Placebo	Losartan (30mg)	Losartan (100mg)	Quinapril (100mg)
N =	11	12	12	12	12	12
CALCIFICATION / FIBROSIS						
Very Slight	0 / 0	0 / 1	4 / 0	1 / 0	1 / 0	1 / 0
Slight	0 / 0	0 / 0	5 / 3	7 / 5	6 / 1	7 / 1
Moderate	0 / 0	0 / 0	1 / 8	2 / 6	4 / 10	0 / 9
Severe	0 / 0	0 / 0	1 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Total with Lesions	0 / 0	0 / 1	11 / 11	10 / 11	11 / 11	8 / 10

cardiomyopathic animals. In all the cardiomyopathic groups, the severity and extent of the lesions appear to be mainly of slight/moderate intensity with an incidence independent of the treatment administered.

Myocardial fibrosis was almost absent in both groups of inbred control hamsters with the exception of one hamster in which non-significant lesions of very slight intensity were observed. As expected, the intensity and extent of fibrotic lesions were significantly increased in the cardiomyopathic animals. In all the cardiomyopathic groups, the severity of the lesions appears to be mainly of slight/moderate intensity with an incidence independent of the treatment administered.

Effect of treatments on cardiac hypertrophy

Figure 4 presents the body weights measured in 50-, 175- and 325-day-old animals. At 175 and 325 days of age, inbred controls presented significant increases compared with the cardiomyopathic groups. In these animals, the high-dose of losartan had no effect. Cardiac hypertrophy was determined as the ventricle/body weight ratio of 175- and 325-day-old hamsters. Figure 5 presents the values obtained at 325 days of age in both groups of animals. A similar pattern was already present at 175 days of age although significance was not reached (data not shown). The high-dose of losartan had no effect in inbred control animals. As expected, significant increase was observed in the placebo-treated cardiomyopathic group confirming the development of cardiac hypertrophy. This increase was not reversed and was even accentuated by both doses of losartan. On the contrary,

FIGURE 4

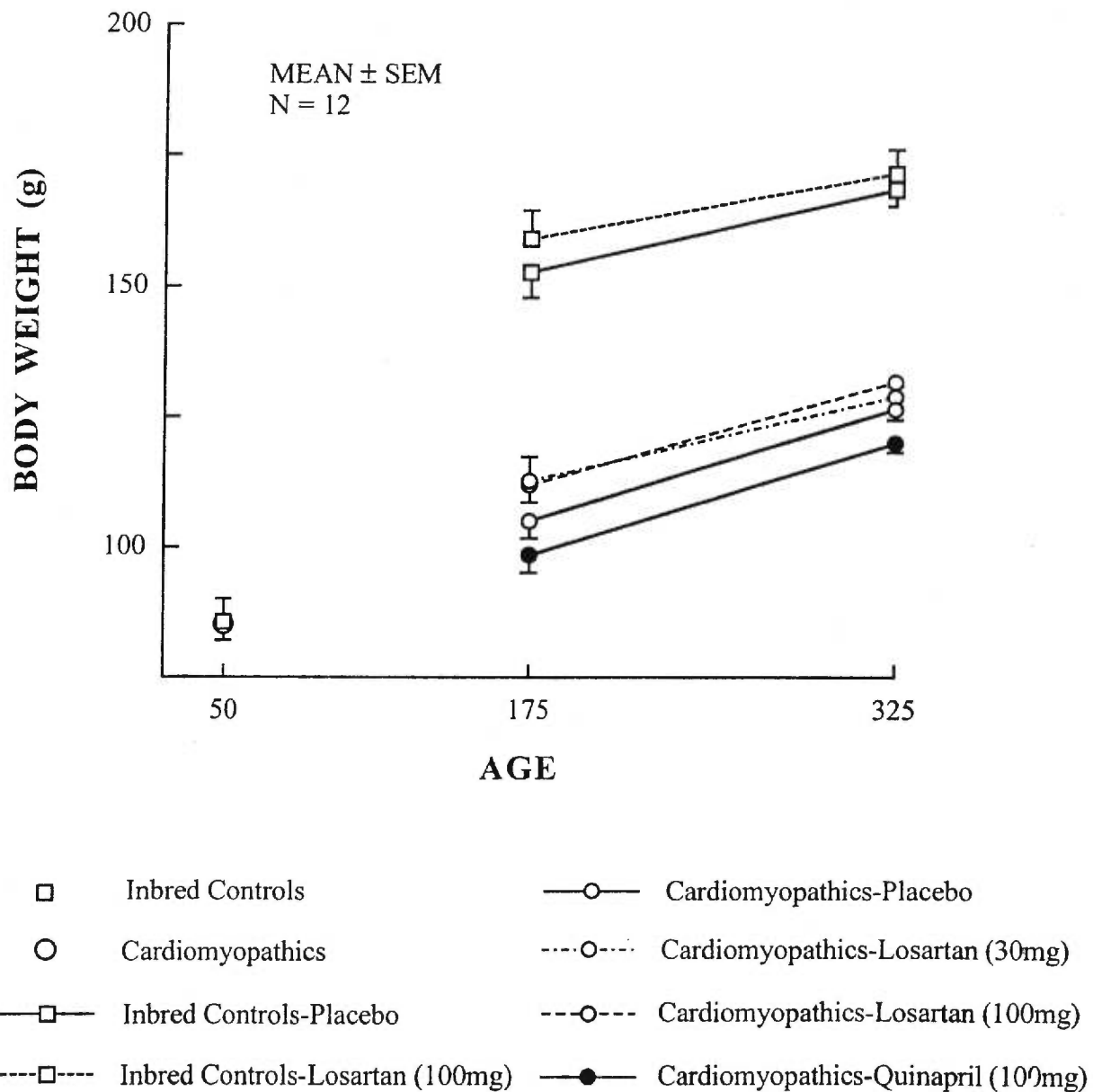
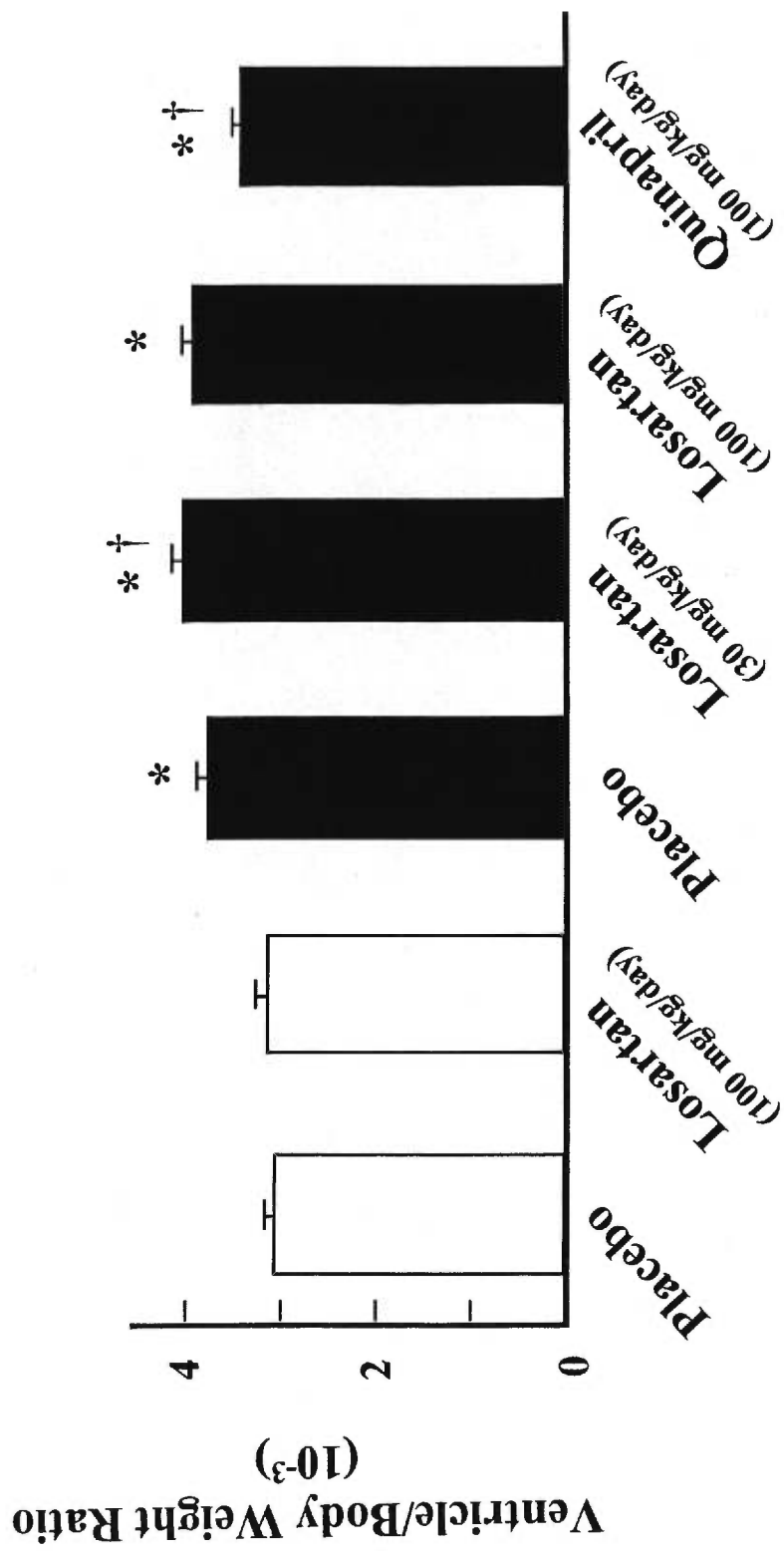


FIGURE 5



quinapril significantly decreased the ventricle/body weight ratio when compared with both losartan-groups and the placebo-group.

Plasma analyses

Table 2 presents the plasma sodium, potassium, ALT and creatinine concentrations evaluated in 450-day-old inbred control hamsters and cardiomyopathic hamsters at end-stage of failure (\cong 450-day-old). The high-dose of losartan had no effects on these parameters in inbred control animals. Compared with inbred control groups, significant increases in sodium, potassium and ALT concentrations were retrieved in the cardiomyopathic group treated with the placebo, whereas no differences were noted in the creatinine concentrations. Losartan had no effects on these values with the exception of a significant increase of creatinine concentrations related to the administration of the high dose. Quinapril significantly decreased the sodium levels and significantly increased the potassium and creatinine concentrations. These drug-induced changes were not related to the progression of cardiac hypertrophy or to life expectancy.

Pressor and chronotropic effects of treatments

Table 3 presents the hemodynamic parameters determined in an **a posteriori** study using 350-day-old anesthetized hamsters following 22 ± 2 days of treatment. As expected, significant decreases were observed in systolic and diastolic blood pressures of cardiomyopathic hamsters compared with the values noted in inbred control animals. Losartan or quinapril had no effect on blood pressure in either groups of hamsters. No

TABLE 2

**SERUM VARIABLES MEASURED FOLLOWING PLACEBO-,
LOSARTAN- OR QUINAPRIL-TREATMENT
TO INBRED CONTROL (450-DAY-OLD) AND
CARDIOMYOPATHIC (END-FAILURE STAGE) HAMSTERS**

	Na ⁺ (mmol/l)	K ⁺ (mmol/l)	ALT (U/l)	Creatinine (μmol/l)
INBRED CONTROLS				
Placebo	144 ± 0 ^a	4.6 ± 0.2	72 ± 6	19 ± 1
Losartan (100mg)	144 ± 2	4.7 ± 0.1	74 ± 6	20 ± 1
CARDIOMYOPATHICS				
Placebo	153 ± 1	5.2 ± 0.3	158 ± 24	19 ± 1
Losartan (30mg)	154 ± 1	5.9 ± 0.4	174 ± 25	23 ± 3
Losartan (100mg)	155 ± 1	6.0 ± 0.4	209 ± 27	44 ± 10*
Quinapril (100mg)	146 ± 1*	7.3 ± 0.8*	129 ± 16	47 ± 11*

a Mean ± SEM, N=15

** p ≤ 0.05 vs cardiomyopathics treated with placebo*

TABLE 3

**PRESSOR AND CHRONOTROPIC EFFECTS
OF LOSARTAN AND QUINAPRIL IN 350-DAY-OLD
INBRED CONTROL AND CARDIOMYOPATHIC HAMSTERS**

(TREATMENT DURATION = 22 ± 2 DAYS)

	SYSTOLIC PRESSURE (mmHg)	DIASTOLIC PRESSURE (mmHg)	HEART RATE (beats/min)
INBRED CONTROLS			
Placebo	136 ± 14 ^a	98 ± 7	202 ± 10
Losartan (100 mg)	140 ± 11	102 ± 7	213 ± 11
CARDIOMYOPATHICS			
Placebo	54 ± 2 *	44 ± 3 *	213 ± 14
Losartan (100 mg)	51 ± 3 *	41 ± 3 *	226 ± 9
Quinapril (100 mg)	51 ± 5 *	39 ± 4 *	208 ± 8

^a Mean \pm SEM, N = 7 / group

* P \leq 0.05 compared with the corresponding inbred control group

differences were noted in heart rate between the inbred control and cardiomyopathic animals and again, no differences were observed with the administration of losartan or quinapril.

DISCUSSION

Our results demonstrate that chronic blockade of AT₁ receptors is associated with a significant reduction in the survival of cardiomyopathic hamsters whereas ACE inhibition improves their life expectancy. Moreover, ventricular hypertrophy is not affected by selective AT₁ antagonism whereas ACE inhibition significantly decreases its development. Compared with the placebo-treated group, the evaluation of the cardiac histological lesions in the four cardiomyopathic groups shows that neither losartan (low- and high-dose) nor quinapril had any effect on the extent and intensity of typical calcification and fibrosis. Although a slight decrease in the number of calcification lesions was observed in animals treated with quinapril, the difference among the groups was not significant. These results indicate that the probability of survival of the cardiomyopathic hamsters retrieved following the different interventions on the renin-angiotensin system, is independent of the development and/or intensity of the primary cardiac histological lesions. This strongly suggests that the role of the renin-angiotensin system in the progression of the cardiomyopathy is more likely that of an adaptative process rather than a causative mechanism involved in the genesis of the pathology.

Hemodynamic parameters were not evaluated during the survival study and therefore, the contribution of peripheral effects of the drugs on blood pressure and heart rate is

unknown. Nevertheless, the very low systolic and diastolic blood pressures of the cardiomyopathic hamsters as well as the lack of hemodynamic effects of losartan or quinapril that were determined in the **a posteriori** study, strongly support that preload and afterload reductions have played minor roles, if any, in the overall effects of the different treatments. While there is no definitive explanation for interpreting our results, they do suggest the following hypotheses: (1) the cardioprotective effect of quinapril is related to the blockade of the renin-angiotensin system as well as to the accumulation of endogenous kinins and more specifically of bradykinin; (2) the beneficial effects of the AT₁ receptor antagonists already reported using other experimental models are related to the blockade of AT₁ receptors but also to the activation of AT₂ receptors ; and, (3) in this experimental model, the upregulation of AT₁ receptors is an adaptative phenomenon and in this case, the inotropic effect of angiotensin II is essential to support the failing heart.

Beneficial effects in experimental models of heart failure have been described with the administration of ACE inhibitors. For example, in myocardial infarcted rats induced by coronary ligation, amelioration of hemodynamic parameters with delapril [26], improvement of cardiac performance with captopril [16], decrease in ventricular remodeling with enalapril and lisinopril [17, 27], and increase in survival with captopril, enalapril and lisinopril, have been reported [15, 27, 28]. The increase in the probability of survival that was observed with quinapril was expected since an increase in life expectancy has already been reported in cardiomyopathic hamsters by Haleen et al. [4]. In their study, the treatment was started in 180-day-old CHF 146 hamsters and quinapril (100 mg/kg/day) increased the median probability of survival of the animals by 33%

compared with the untreated group. The major effect on survival occurred during the first 210 days of treatment, and thereafter the mortality rate of the groups was comparable. In our study, the improvement in life expectancy (\downarrow 73% in risk of cardiac death, $P = 0.0003$) related to quinapril was greater and more sustained, with 77% of the hamsters included in this group still alive at the end of the study. This greater effect is certainly related to the fact that quinapril was started in younger animals (50-day-old) before the appearance of cardiac histological lesions and the development of hypertrophy.

In the study by Haleen et al. [4], the improved survival of the cardiomyopathic hamsters associated with quinapril was accompanied by an increase in coronary flow and left ventricular performance, and a decrease in left ventricular dilatation. A cause/effect relationship cannot be established on the basis of our data only. However, the significant decrease in the development of ventricular hypertrophy that was obtained with the administration of quinapril strongly suggests that ACE inhibition increased the life expectancy of the hamsters by decreasing the cardiac remodeling process. This possibility is further strengthened by the fact that the harmful effect observed following AT_1 receptor blockade was related to the absence of effects and even to an increase in the development of cardiac hypertrophy.

The mechanism(s) by which quinapril decreased the development of cardiac hypertrophy is(are) still unclear. One of the most common hypotheses is that the beneficial effects of ACE inhibitors may result not only from a reduced angiotensin II- AT_1 receptor interaction but also from bradykinin potentiation [29]. Studies by Bao et al. [30] as well as by Linz and

Scholzens [31] have shown that ventricular hypertrophy induced in spontaneous and aortic-banded hypertensive rats is reduced by treatment with the ACE inhibitor, ramipril. In these models, the regression of cardiac hypertrophy was abrogated by the concomitant administration of HOE-140, a highly potent bradykinin B₂ receptor antagonist. Similar results have also been obtained by McDonald et al. [32] using a model of ventricular remodeling induced by transmural direct current shock in dogs, as well as by Liu et al. [33] using a model of heart failure induced by coronary ligation in rats. Altogether, these results support the hypothesis that the accumulation of endogenous bradykinin, resulting from ACE inhibition, plays a role in the benefit of this therapy in the case of progressive heart failure and more particularly in the cardioprotective effect that we and others have observed in the cardiomyopathic hamster.

Treatment with AT₁ antagonists causes elevation of plasma angiotensin II, which may selectively bind to unblocked AT₂ receptors. So far, the roles of AT₂ receptors in physiopathology have not been clarified. However, until now, an inhibitory effect of these receptors on cellular proliferation has been observed using coronary endothelial cells [34], vascular smooth muscle cells [35] as well as cardiomyocytes [36]. It has been suggested by Masaki et al. [37] that AT₂ receptors have an anti-AT₁ effect on cell proliferation and may play a role in development and/or differentiation.

The level of expression of AT₂ receptors is generally low in the adult cardiovascular system and the involvement of these receptors in the progression of heart failure is presently highly speculative. Nevertheless, since their expression is increased in remodeling hearts such as in

cardiac hypertrophy and infarction [38, 39] and since AT_2/AT_1 ratio is increased in failing human hearts [40, 41], these observations suggest that AT_2 receptors might be involved in the effect of angiotensin II. This possibility is supported by the results of Liu et al. [33] who, using a model of cardiac failure induced by coronary ligation in rats, reported that the cardioprotective effect of the AT_1 receptor antagonist, L-158,809, was partially abolished by the blockade of AT_2 receptors by PD123319. We have reported that there are no AT_2 receptors in ventricular membranes of adult cardiomyopathic hamsters (from 30 to 350 days of age) [20]. It is therefore tempting to postulate that the lack of influence of AT_1 receptor blockade on ventricular hypertrophy as well as the negative effect on survival observed in cardiomyopathic hamsters were related, at least in part, with the absence of AT_2 receptor activation and thereby of their resulting antiproliferative effect.

In the last two decades, it has become evident that tissular renin-angiotensin systems exist including in the myocardium [42]. It is now acknowledged that locally-produced angiotensin II may act either in an autocrine or a paracrine fashion to directly modulate cardiac function through a mechanism independent of its peripheral action [43, 44]. Despite an apparent lack of inotropic response to angiotensin II in the myocardium of the guinea pig and the adult rat, a positive inotropic response to angiotensin II has been demonstrated in cardiac muscle from several species such as the cat, rabbit, calf, and chicken and in isolated perfused hearts from normal and cardiomyopathic hamsters [45, 46]. It has also been reported that angiotensin II exerts positive inotropic effects in human atrial preparations but not in right or left ventricular preparations (47). When present, physiological studies with specific AT_1 antagonists have proven that the inotropic effect of angiotensin II is mediated

by AT₁ receptors [48, 49]. The contribution of angiotensin II to the maintenance of the contractile status of a physiological and/or pathological heart is still however not known. Nevertheless, it may be hypothesized that the upregulation of AT₁ receptors observed in the cardiomyopathic hamster heart represents an adaptative mechanism that compensates for the altered contractility and the development of cardiac dysfunction that is secondary to the primary genetic defects. In such a case, the complete inhibition of AT₁ receptors would be detrimental, especially for the failing heart. This would in turn explain the negative results that we obtained following their chronic blockade.

Conclusions

In the cardiomyopathic hamster, losartan did not improve survival compared to placebo and quinapril and, if anything, have increased mortality. Major particularities of this experimental model such as a significant upregulation of cardiac AT₁ receptors and the lack of cardiac AT₂ receptors, may have had a major impact on our findings and care must be exercised in the interpretation of our results. Nevertheless, they certainly suggest that AT₁ receptor antagonists and ACE inhibitors are not necessarily equivalent or interchangeable in terms of their effects on cardiac hypertrophy and survival in selected progressive heart failure models.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mrs Marie-France Legault for her excellent technical assistance and Mrs Elizabeth Pérès for the art work.

REFERENCES

- [1] Chemla D, Scalbert E, Desché P, Lecarpentier Y. La cardiomyopathie du hamster Syrien. *Arch Mal Coeur*. 1991;84:85-87.
- [2] Sakamoto A, Ono K, Abe M et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:13873-13878.
- [3] Hunter EG, Hugues V, White J: Cardiomyopathic hamsters, CHF 146 and CHF 147: a preliminary study. *Can J Physiol Pharmacol*. 1984;62:1423-1428.
- [4] Haleen SJ, Weishaar RE, Overhiser RW et al. Effect of quinapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster. Hemodynamics, morphological, and biochemical correlate. *Circ Res*. 1991;68:1302-1312.
- [5] Nakamura F, Nagano M, Kobayashi R et al. Effects of an angiotensin-converting inhibitor, cilazapril, on congestive heart failure in cardiomyopathic hamsters. In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic heart*. New York, Raven Press; 1994:145-156.
- [6] Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Renin-angiotensin system and the congenital cardiomyopathic hamsters. Singal PK, Dixon IM, Beamish RE, Dhalla NS (eds). In *Mechanisms of heart failure*. Boston, Kluwer Academic Publishers;1995:203-214.

- [7] Shiota N, Fukamizu A, Takai S, Okunishi H, Murakami K, Miyazaki M. Activation of angiotensin II forming chymase in the cardiomyopathic hamster heart. *J Hypertension*. 1997;15:431-440.
- [8] Mansoor AM, Honda M, Kuramochi T, Tanaka K, Morioka S, Takabatake T. Effects of ACE inhibition and beta-blockade on collagen remodeling in the heart of Bio 14.6 hamsters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:43-49.
- [9] Masutomo K, Makino N, Marymaya T, Shimada T, Yanaga T. Effects of enalapril on the collagen matrix in cardiomyopathic Syrian hamsters (Bio 14.6 and 53.58). *Jpn Circ J*. 1996;60:50-61.
- [10] Davison G, Hall CS, Miller JG, Scott M, Wickline SA. Cellular mechanisms of captopril-induced matrix remodeling in Syrian hamsters cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;90:1334-1342.
- [11] Hirakata H, Fouad-Tarazi FM, Bumpus FM et al. Angiotensins and the failing heart. Enhanced positive inotropic response to angiotensin I in cardiomyopathic hamster heart in the presence of captopril. *Circ Res*. 1990;66:891-899.
- [12] Narita H, Kaburaki M, Doi H et al. Prolonging action of imidapril on the life expectancy of cardiomyopathic hamsters. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27:861-871.
- [13] Chemla D, Scalbert E, Desché P, Lerebours G, Suard I, Lecarpentier Y. Effects of early and late therapy with perindopril on survival and myocardial inotropic state in experimental dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994; 24:151-157.
- [14] Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865.

- [15] Milavetz JJ, Raya TE, Johnson CS, Morkin E, Goldman S. Survival after myocardial infarction in rats: captopril versus losartan. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:714-719.
- [16] Raya TE, Fonkel SJ, Lee RW, Daugherty S, Goldman S, Wong PC, Timmermans PBMWM. Hemodynamic effects of direct angiotensin blockade compared to converting enzyme inhibition in rat model of heart failure. *Am J Hypertension*. 1991;4:3345-3405.
- [17] Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M et al. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:2273-2282.
- [18] The CONSENSUS Investigators. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Result of the cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med*. 1987;316:1429-1435.
- [19] The SOLVD investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med*. 1992;327:678-689.
- [20] Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Upregulation of cardiac angiotensin AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ Res*. 1995;77:1001-1007.
- [21] Wong PC, Tam SW, Herblin WF, Timmermans PB. Further studies on the selectivity of DuP 753, nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1991;196:201-203.

- [22] De Léan A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol.* 1978;235:E97-E102.
- [23] Wikman-Coffelt J, Sievers R, Parmley WW, Jasmin G. Verapamil preserves adenine nucleotide pool in cardiomyopathic Syrian hamsters. *Am J Physiol.* 1986;250:H22-H28.
- [24] Lanza GM, Scott MJ, Davison G et al. Angiotensin II receptor blockade in Syrian hamsters (T0-2) cardiomyopathy does not affect microscopic cardiac material properties: implications for mechanisms of tissue remodeling. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997;11:521-529.
- [25] Mitchell SF, Marks ES, Patterson RE, Speir EH, Steadman KA, Keiser HR. Correlation of changes in cardiac calcium channels with hemodynamics in Syrian hamster cardiomyopathy and heart failure. *Life Sciences.* 1987;41:153-159.
- [26] Nishimiki T, Yamagishi H, Takeuchi K, Takeda T. An angiotensin II receptor antagonist attenuates left ventricular dilatation after myocardial infarction in hypertensive rat. *Cardiovasc Res.* 1995;29:856-861.
- [27] Mulder P, Devaux B, Richard V et al. Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure: effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling. *Circulation.* 1997;95:1314-1319.

- [28] Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circ Res.* 1985;72:406-412.
- [29] Gravas H, Gravas I. Cardioprotective potential of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Hypertens.* 1991;9:385-392.
- [30] Bao G, Gohlke P, Qadri F, Unger T. Chronic kinin receptor blockade attenuates the antihypertensive effect of ramipril. *Hypertension.* 1992;20:74-79.
- [31] Linz W, Scholkens BA. A specific B₂-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol.* 1992;105:771-772.
- [32] Mc Donald K, Mock J, D'Aloia A et al. Bradykinin antagonism inhibits the antigrowth effect of converting enzyme inhibition in the dog myocardium after discrete transmural myocardial necrosis. *Circulation.* 1995;91:2043-2048.
- [33] Liu YH, Yang XP, Sharov VG et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors angiotensin II type 1 receptor antagonists with heart failure. *J Clin Invest.* 1997;99:1926-1935.
- [34] Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂ mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95:651-657.
- [35] Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M et al. The angiotensin type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10663-10667.
- [36] Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 1996;28:635-640.

- [37] Masaki H, Kurihara T, Yamaki A et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂ receptor causes attenuated response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest.* 1998;101:527-535.
- [38] Lopez JJ, Lorell BH, Ingerfinger JR et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁ and AT₂-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol.* 1994;267:H844-H852.
- [39] Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1995;95:46-54.
- [40] Asano K, Dutcher DL, Port D et al. Selective downregulation of the angiotensin II AT₁-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation.* 1997;95:1193-1200.
- [41] Nosawa Y, Mikaye H, Haruno A et al. Down-regulation of angiotensin II receptors in hypertrophied human myocardium. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:514-518.
- [42] Dostal DE, Baker KM. Evidence of a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends Cardiovasc Med.* 1993;3:67-74.
- [43] Lambert C, Godin D, Fortier P, Nadeau R. Direct effects in vivo of angiotensins I and II on the canine sinus node. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991;69:389-392.
- [44] Lindpainter K, Lu W, Niedermayer N et al. Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression on post-infarction ventricular remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:133-143.

- [45] Schomisch-Moravec C, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz, Bond M. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation*. 1990;82:1973-1984.
- [46] Mattiazzi A. Positive inotropic effect of angiotensin II. Increase in intracellular Ca^{2+} or changes in myofilament Ca^{2+} responsiveness ? *J Pharmacol Toxicol Meth*. 1997;37:205-214.
- [47] Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Just H. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation* 1993;88:1228-1237.
- [48] Scott A, Chang RSL, Lotti VJ, Siegl PKS. Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II receptor antagonists, DUP 753 and PD 121981, in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261:931-935.
- [49] Ishihata A, Endoh M. Pharmacological characteristics of the positive chronotropic effect of angiotensin II in the rabbit ventricular myocardium. *Br J Pharmacol*. 1993;108:999-1005.

LEGENDS TO FIGURES

FIGURE 1

Experimental groups.

FIGURE 2

Dose-response curves to angiotensin II in untreated anesthetized hamsters (Control, N = 9) as well as in treated anesthetized animals 24-hour following oral administration of a single dose (30 mg/kg) of losartan (N = 5). The values are mean \pm SEM. Losartan significantly ($P \leq 0.001$) shifts to the right the dose-response curve indicating significant blockade of AT₁ receptors.

FIGURE 3

Graph showing the effects of chronic treatment with placebo, low-dose (30 mg/kg/day) or high-dose (100 mg/kg/day) of losartan and quinapril (100 mg/kg/day) on the probability of survival of cardiomyopathic hamsters. Quinapril significantly lowered the risk of cardiac death by 73% ($P=0.0003$) based on Proportional Hazard Model. The low- ($P= 0.14$) and high-dose ($P= 0.0015$) of losartan decreased the life expectancy compared with placebo as well as with quinapril ($P=0.0001$ for both doses of losartan).

FIGURE 4

Graph showing body weights of inbred control hamsters (□) treated with placebo (—□—) or losartan 100 mg/kg/day (- □ -) and cardiomyopathic hamsters treated with placebo (—○—), losartan 30 mg/kg/day (○), losartan 100 mg/kg/day (- ○ -) or quinapril 100 mg/kg/day (—●—) determined at 50, 175 and 325 days of age. The values are mean ± SEM, N = 12 per group. * P < 0.05 vs inbred control animals.

FIGURE 5

Graph showing ventricle/body weight ratio in 325-day-old inbred control (white bars) and cardiomyopathic (black bars) hamsters. The values are mean ± SEM, N = 12 per group. * P < 0.05 vs inbred controls, † P < 0.05 vs cardiomyopathics-placebo.

ARTICLE 2

Accepté dans Journal of Cardiovascular Pharmacology

Avril 1999

**DOWN-REGULATION OF CARDIAC AT₁ RECEPTOR EXPRESSION AND
ANGIOTENSIN II CONCENTRATIONS AFTER CHRONIC BLOCKADE OF THE
RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN CARDIOMYOPATHIC HAMSTERS**

Natacha R. Bastien,¹ Marc J. Servant,² Jolanta Gutkowska,² Sylvain Meloche^{1,2}
and Chantal Lambert¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

² Research Center, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Hôtel-Dieu
campus, 3850 St-Urbain street, Montréal, Québec, Canada H2W 1T8

KEY WORDS: AT₁ receptors, cardiac angiotensin II, cardiomyopathic hamsters,
cardiac hypertrophy

Address correspondence to: Dr Chantal Lambert, B.Pharm., Ph.D., Department of Pharmacology,
Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6506

Fax : (514) 343-2291

E-mail : lambec@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

This project investigated the involvement of AT₁ receptors in the development of ventricular hypertrophy in cardiomyopathic hamsters. Cardiac angiotensin II concentration and receptor density were evaluated following chronic blockade of the renin-angiotensin system in inbred control hamsters treated with placebo or losartan (100 mg/kg/day) and cardiomyopathic hamsters treated with placebo, low- (30 mg/kg/day) or high-dose (100 mg/kg/day) of losartan or quinapril (100 mg/kg/day). Treatments were started at 50 days of age. Angiotensin II receptor density and affinity were measured by radioligand binding assays whereas ventricular angiotensin II concentration was determined by radioimmunoassay. After 125 and 275 days of treatment, both doses of losartan significantly reduced AT₁ receptor density whereas quinapril had no effect. The administration of both drugs resulted in significant reductions in ventricular angiotensin II concentration. The chronic administration of losartan was associated with an increase in cardiac hypertrophy suggesting that angiotensin II signaling is not directly involved or at least does not play a major role in the remodeling process observed in cardiomyopathic hamsters.

INTRODUCTION

The demonstration that a tissular renin-angiotensin system is present in the heart, and therefore that angiotensin II can be produced locally, suggests that angiotensin II exerts, via autocrine and/or paracrine mechanisms, a significant influence on cardiac contractility and frequency, coronary flow as well as cardiac myocyte and fibroblast growth [1]. It has been reported that the increase in left ventricular mass induced by constricting the abdominal aorta is completely prevented by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition without any effect on the arterial pressure [2]. These observations are consistent with the hypothesis that locally synthesized angiotensin II may play a role in the etiology of heart diseases. It is therefore important to study the expression profile of angiotensin II receptor subtypes and to monitor cardiac angiotensin II concentrations following chronic pharmacological interventions on the renin-angiotensin system.

Syrian golden hamsters of the cardiomyopathic strain have a non-pressure-overload cardiac disease that originates from a genetically transmitted metabolic anomaly which induces degenerative lesions in all striated muscles, with particular intensity in the heart. These hamsters have an activated renin-angiotensin system characterized by higher plasma and ventricular angiotensin II concentrations, increased ACE and chymase activity, as well as upregulation of cardiac AT₁ receptors [3-5]. We have recently reported that chronic blockade of AT₁ receptors with a specific antagonist (losartan, 100 mg/kg/day) is associated with a significant reduction in the survival of cardiomyopathic animals whereas chronic ACE inhibition (quinapril, 100 mg/kg/day) significantly improved their life expectancy (↓ 73% risk of cardiac death) [6]. In this survival study, ACE inhibition caused a significant decrease in cardiac hypertrophy whereas AT₁ antagonism did not

prevent and even accentuated its development. While there is no definitive explanation for interpreting our results, they do suggest, among other hypotheses, that cardiac AT₁ receptors are not directly involved or at least do not play a critical role in the progression of cardiac remodeling and /or hypertrophy.

The aim of this study was to further investigate the relationship of AT₁ receptors with cardiac hypertrophy. Cardiac angiotensin II receptor density and affinity were therefore measured following chronic AT₁ blockade and ACE inhibition in inbred control and cardiomyopathic hamsters. Ventricular angiotensin II concentrations were also determined. The results are discussed in parallel with those obtained in a survival study in which the progression of ventricular hypertrophy was monitored.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Losartan was supplied by Merck & Co (Rahway, PE). Quinapril and PD123319 were supplied by Parke-Davis (Ann Arbor, MI). [Sar¹,Ile⁸] Angiotensin II (sarile) was purchased from Hukabel Scientific and iodinated in our laboratory as previously described [5]. The protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, phenanthroline and pepstatin A were obtained from Sigma Chemical Co; Iodo-Beads from Pierce Chemical Co., sodium ¹²⁵I from Amersham and human angiotensin II from Peninsula.

Animals and experimental groups

This study was part of a survival study aiming to compare the effects of chronic AT₁ receptor blockade and ACE inhibition. In brief, male Syrian inbred control (CHF 148) and cardiomyopathic (CHF 146) hamsters of 40 days of age were purchased from the Canadian Hybrid Farm (Nova Scotia, Canada). The animals were housed individually in a temperature controlled room with a 6:00 a.m. to 6:00 p.m. light:dark cycle. They received a regular rat chow and had access to tap water ad libitum. At 50 days of age, the hamsters were equally divided and randomly assigned to one of the experimental groups (Figure 1). For this specific project, at 175 and 325 days of age (hypertrophic and failure stages), 12 animals per group were sacrificed and ventricular membranes were prepared for angiotensin II receptor binding assays [5]. For baseline determinations, randomly chosen 50-day-old inbred control and cardiomyopathic animals (N = 12/per group) were sacrificed. Six 450-day-old inbred controls (placebo-treated group) and 6 cardiomyopathics at end-stage failure (450-day-old placebo-, losartan- 100 mg/kg/day-, and quinapril-treated groups) were also sacrificed for determination of ventricular angiotensin II concentration.

All procedures for animal experimentation conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were monitored by an institutional animal care committee.

Drug administration

The placebo and losartan (30 and 100 mg/kg/day) were administered orally between 8:00 and 10:00 a.m. each day in 200 μ l aliquot using a micropipette. To offset the bitter taste of losartan, the powder was dissolved in a flavoured commercial jelly (pH adjusted at 7.5). Quinapril (100 mg/kg/day) was dissolved and administered in drinking water sweetened with a sugar alternative

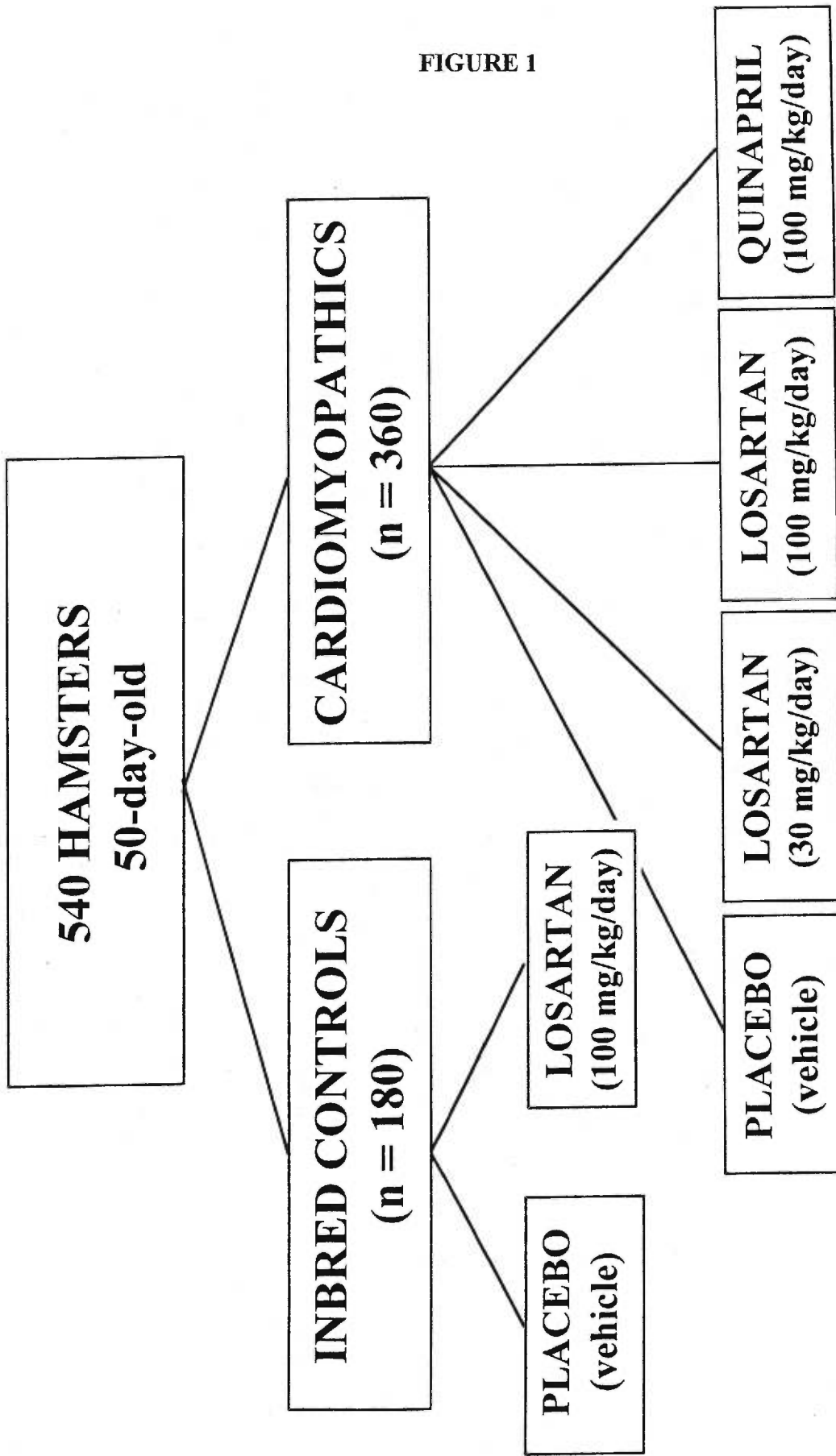


FIGURE 1

(1%). Quinapril solution was prepared daily and provided to the hamsters at 8:00 a.m. All animals were weighed every two weeks and concentration of drugs was adjusted to the average weight of treatment group.

Receptor binding assays

The animals were anesthetized with thiopental (50 mg/kg, i.p.). The hearts were quickly removed and allowed to beat in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). After removal of the atria, the ventricles were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until assayed. The hearts were weighed and minced with scissors. Cardiac membranes were prepared as previously described by Lambert et al. [5]. Protein concentration was determined by the colorimetric method of Lowry [7]. The ventricular membranes were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used.

For binding assays, cardiac ventricular membranes (250 μg) were incubated with 0.2 nmol/L ^{125}I -sarile with or without unlabeled ligands for 60 min at 25°C in a total volume of 250 μL of 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MgCl_2 , and 0.1% heat-inactivated bovine serum albumin (BSA). Bound ^{125}I -sarile was separated from free ligand by rapid filtration through GF/B filters presoaked with 0.2% BSA, followed by washing with 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl. The radioactivity present in the filters was counted in a Cobra Auto-Gamma (Canberra-Packard) counter with 74% efficiency. Averages of duplicate determinations of bound ^{125}I -sarile were used for data analysis. Competition binding curves were analyzed by non-linear least-squares curve fitting using the Allfit computer program [8]. Equilibrium binding constants are reported as K_d (nM) and receptor concentrations are expressed as fmol/mg of protein. For the determination of K_d values, ventricular membranes from individual

animals were pooled (N = 2 pool/group) for the construction of full binding curves.

Determination of cardiac angiotensin II concentrations

Six hearts per experimental group were analyzed. The ventricles were isolated, frozen on dry ice and stored at -80°C until assayed. They were thawed, pooled (N = 3/assay) and homogenized using a Polytron (Brinkman Instruments, West Bury, N.Y.) in 7 mL of 0.1 mol/L HCl containing protease inhibitors in final concentration of 10^{-5} mol/L PMSF, 10^{-5} mol/L pepstatin, 40 mg/100ml phenanthroline, 5×10^{-3} mol/L EDTA and 10^{-6} mol/L leupeptin. The homogenates were centrifuged at 18,000 g for 30 min at 4°C . Angiotensin II was extracted from the supernatant by Sep-Pak [9] prewashed sequentially with 10 mL each of methanol, tetrahydrofurane, hexane, methanol and bidistilled water. The tissue homogenates (5 ml) were applied to activated Sep-Pak, which were then washed with 10 mL bidistilled water and 3 mL of 10% acetonitrile in 0.1% TFA. Angiotensin II was eluted by 3 mL of 30% acetonitrile in 0.1% TFA and lyophilized using a SPEED-VAC. The amount of angiotensin II was measured by radioimmunoassay (RIA) using an antibody and iodinated tracer produced in our laboratory. The crossreactivity of the antibody with angiotensin I was below 0.1%. Antibody bound tracer was separated from free tracer using Dextran-500 coated Charcoal (NORIT A). The recovery during extraction ($\cong 76\%$) was estimated by adding ^{125}I -angiotensin II and cold standards to tissue homogenates. The sensitivity of the RIA was < 1 fmol. The protein concentration was determined and results are reported as fmol/mg protein.

Statistical analysis

In 50-day-old hamsters, the difference in the density of angiotensin II receptor was determined using Student's unpaired *t*-test. In 175- and 325-day-old animals, differences in angiotensin II

receptor density and affinity were determined using two-way analysis of variance and Bonferroni *t*-tests. In 50-day-old hamsters, differences in ventricular angiotensin II concentrations were determined using Student's unpaired *t*-test. The critical level of significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Angiotensin II receptor expression

The specific binding of ^{125}I -sarile to ventricular membranes obtained from 50-day-old animals was 3.1 ± 0.1 and 3.9 ± 0.1 fmol/mg of protein in inbred control and cardiomyopathic hamsters, respectively. In accordance with our previous laboratory report [5], a significant increase ($\uparrow 26\%$) in angiotensin II specific binding was observed in cardiomyopathic animals. In both groups of hamsters, only the selective AT_1 receptor antagonist losartan inhibited the binding of ^{125}I -sarile, indicating the absence of AT_2 receptors (data not shown).

The density of AT_1 receptors was also significantly increased in 175- and 325-day-old cardiomyopathic hamsters ($\uparrow 47\%$ and 70%), as compared with their respective inbred control group (Table 1). AT_2 receptors were undetectable in both groups of hamsters, regardless of the treatment administered (data not shown). In inbred controls of 175 and 325 days of age, AT_1 receptor blockade significantly decreased angiotensin II receptor density by 25% and 31%, respectively. In cardiomyopathics, losartan treatment also produced a significant decrease ($\downarrow 34\%$ and 29%) in receptor density compared to placebo-treated animals. This decrease was independent of the dose of losartan administered. The observation that similar reductions in angiotensin II receptor density are induced by losartan in both inbred control and cardiomyopathic animals

TABLE 1

Specific binding of ^{125}I -sarile to ventricular angiotensin II AT₁ receptors in inbred control and cardiomyopathic hamsters after chronic AT₁ blockade and ACE inhibition

	175-day-old	325-day-old
<i>Inbred controls</i>		
placebo (vehicle)	3.2 ± 0.2 ^a	3.2 ± 0.2
losartan (100mg/kg)	2.4 ± 0.2*	2.2 ± 0.3*
<i>Cardiomyopathics</i>		
placebo (vehicle)	4.7 ± 0.4**	5.1 ± 0.6**
losartan (30mg/kg)	3.1 ± 0.3*	3.8 ± 0.3*
losartan (100mg/kg)	3.1 ± 0.2*	3.4 ± 0.2*
quinapril (100mg/kg)	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.3

= fmol/mg protein, N = 12/per group, data are expressed as mean ± SEM.

° ≤ 0.05 vs corresponding vehicle treated group;

p ≤ 0.05 vs corresponding inbred control group.

suggests that the effect is not disease-related. In contrast, chronic ACE inhibition had no significant effect on angiotensin II receptor binding in either group of cardiomyopathic animals.

AT₁ receptor affinity

Radioligand binding studies were performed to measure the affinity of losartan for ventricular AT₁ receptors in all groups of hamsters. In 50-day-old animals, the K_ds were 106 ± 20 nM and 94 ± 14 nM for inbred control and cardiomyopathic animals. Figure 2 shows representative competition binding curves of losartan to ventricular membranes of 175-day-old inbred control (panel A) and cardiomyopathic (panel B) hamsters. In 175-day-old animals, the receptor affinity was unchanged in all groups, regardless of receptor density and/or the treatment administered: inbred controls receiving placebo, 64 ± 6 nM; or losartan (100 mg/kg), 70 ± 15 nM; cardiomyopathics receiving placebo, 45 ± 11 nM; losartan (30 mg/kg), 71 ± 13 nM; losartan (100 mg/kg), 53 ± 9 nM; or quinapril (100 mg/kg), 52 ± 8 nM. In 325-day-old animals, the calculated K_ds were also comparable regardless of receptor density and /or the treatment administered: inbred controls receiving placebo, 32 ± 7 nM; or losartan (100 mg/kg), 31 ± 6 nM; cardiomyopathics receiving placebo, 32 ± 3 nM; losartan (30 mg/kg), 33 ± 3 nM; losartan (100 mg/kg/day), 36 ± 5 nM; or quinapril (100 mg/kg/day), 27 ± 5 nM.

Ventricular angiotensin II concentrations

Table 2 shows the ventricular concentrations of angiotensin II determined in inbred control (450-day-old) and cardiomyopathic hamsters at end-stage heart failure (\cong 450-day-old) after chronic treatment with placebo, losartan (100 mg/kg/day) and quinapril. There was an increase, although not significant, in angiotensin II concentrations in the cardiomyopathic hamsters compared with the

FIGURE 2

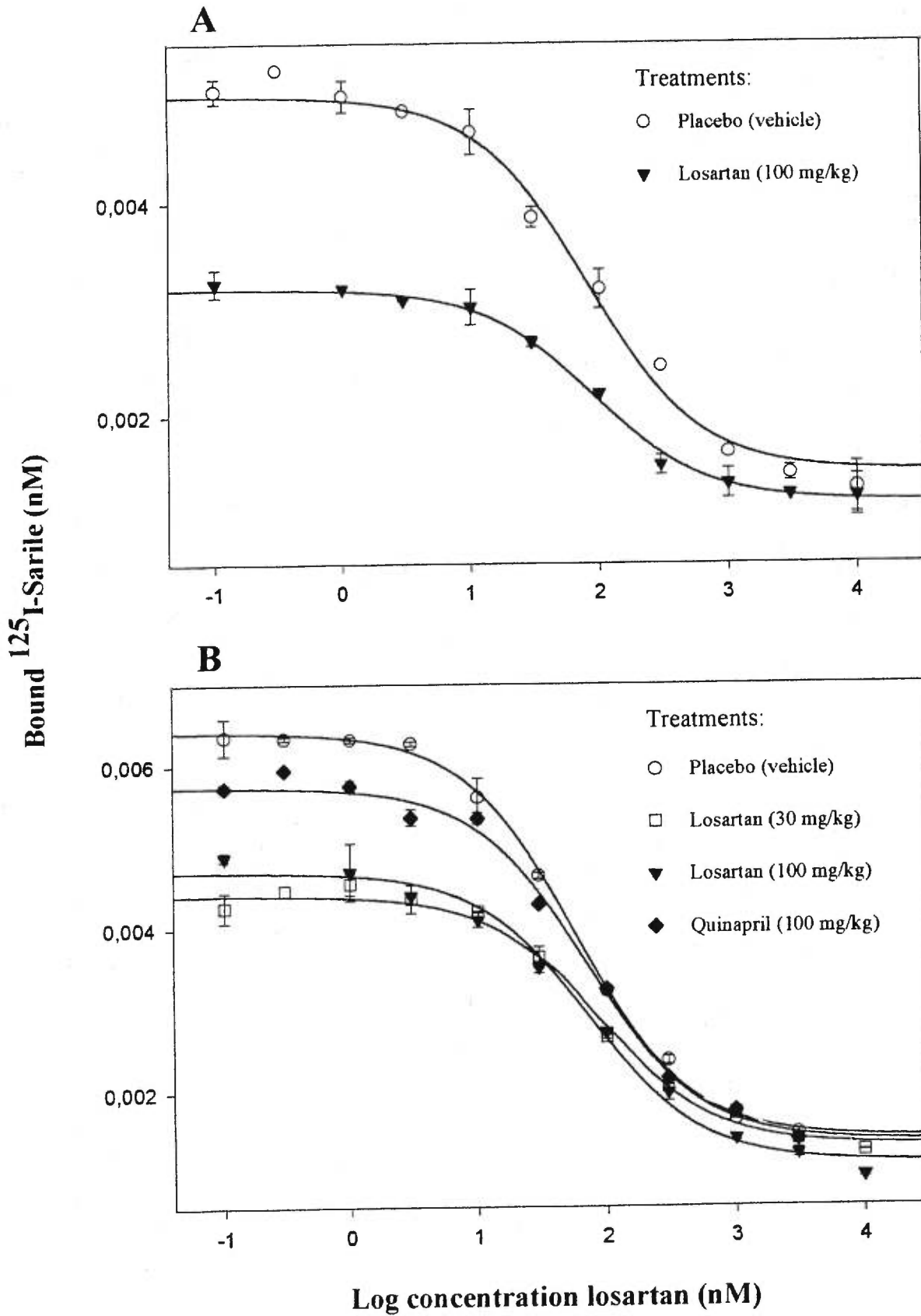


TABLE 2

ventricular concentration of angiotensin II in inbred control (450-day-old) and cardiomyopathic hamsters in end-stage heart failure after chronic AT₁ blockade and ACE inhibition.

Inbred Controls	0.023 ± 0.014 ^a
Cardiomyopathics	
Placebo	0.036 ± 0.004 ^a
Losartan (100 mg/kg)	ND
Quinapril (100 mg/kg)	ND

^a: fmol/mg protein, N = 4/group, data are expressed as mean ± SEM, ND = under the limit of detection.

inbred control animals. Chronic treatment with losartan or quinapril in cardiomyopathic hamsters resulted in significant reductions in ventricular angiotensin II concentrations to values below the detection limit.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that chronic *in vivo* AT₁ blockade with the specific antagonist losartan downregulates AT₁ specific binding in cardiac tissues of inbred control and cardiomyopathic hamsters whereas ACE inhibition has no effects. The reduction in receptor density induced by losartan is observed in both groups of animals which suggests a drug-related effect independent of the presence of the pathology.

The mechanism by which AT₁ receptors are modulated following chronic inhibition of the renin-angiotensin system with losartan is still unknown. Results obtained using cultured cells and isolated tissues have shown that downregulation of angiotensin II receptors can be induced by prolonged exposure to angiotensin II [10]. While it is generally acknowledged that agonist exposure represents a potent stimulus for downregulation of G protein-coupled receptors [11], it is surprising to observe this effect in the presence of antagonists. Interestingly, it was recently reported that losartan displays inverse agonist activity, indicating that this drug not only prevents the binding of agonists but also decreases the propensity of the receptor to assume an active state [12]. In this context, Barker et al. [13] have shown that chronic treatment of cells with an inverse agonist, but not with neutral antagonists, causes downregulation of the 5-HT_{2c} receptor. Thus, the fact that losartan but not quinapril downregulates AT₁ receptor expression is consistent with the idea that the

antagonist is directly implicated in the downregulation process of its receptor. Our results are also supported by the observation that administration of losartan to normotensive rats has been shown to downregulate AT₁ receptor level in the adrenal cortex and liver [14].

Analysis of ventricular angiotensin II concentrations has revealed a tendency toward increased levels (although not significant) in the cardiomyopathic hamsters when compared with inbred control animals, suggesting that the cardiac renin-angiotensin system is activated during the severe stage of failure. When losartan or quinapril were chronically administered to these hamsters, the concentrations of angiotensin II became undetectable within the ventricular tissue compared with placebo-treated animals. These reductions are most probably related to an inhibition of angiotensin II synthesis. The low concentration of angiotensin II in the ventricles suggest that alternate pathways that synthesize angiotensin II, independently of the angiotensin converting enzyme, do not greatly contribute to the production of the peptide, at least during severe stages of heart failure.

There is accumulating evidence for the expression of components of the RAS in the heart as well as for a role of this system in the development of cardiac hypertrophy and/or remodeling [1, 15]. Moreover, angiotensin II has been shown to have a direct effect in stimulating protein synthesis and myocyte growth both in cultured cells and in *in vivo* models [2, 16]. Until now, the majority of published studies comparing ACE inhibitors and AT₁ antagonists in different experimental models of heart failure have reported similar increases in hemodynamic variables and cardiac function [17,18], similar decreases in ventricular remodeling [19-21] and similar increases in survival [22]. However, speculations about any direct action of AT₁ receptor blockade on cardiac growth in these studies have been confounded by a considerable decrease of left ventricular systolic pressure or

arterial blood pressure in treated versus untreated animals. In our study, as hemodynamic parameters were not monitored, the contribution of any peripheral effects of the drugs on blood pressure is unknown. However, since it is well established that cardiomyopathic hamsters have low blood pressure [23-24], we believe that additional preload and afterload reductions would have provided little effect. This hypothesis is supported by our observation that sub-chronic treatment (22 ± 2 days) of 350-day-old cardiomyopathic hamsters with losartan (100 mg/kg/day) or quinapril (100 mg/kg/day) had no effects on mean arterial pressure and heart rate compared to placebo-treated animals [6].

In agreement with our results, several recent studies using different species and models of hypertrophic remodeling have not been associated with beneficial effects of AT₁ antagonists. For example, using models of ventricular hypertrophy induced by aortic stenosis in rats [25], by salt-loading in Dahl salt-sensitive rats [26], as well as by rapid pacing in dogs [27], various groups have failed to observe any influence of AT₁ receptor blockade on cardiac hypertrophy, ventricular dilatation, cardiac function and/or probability of survival, whereas ACE inhibition always had beneficial effects. Our results are also in line with a recent study by Lanza et al. [23] who reported that 3-month effective AT₁ receptor blockade with L-158,809 did not mitigate the remodeling process in TO-2 cardiomyopathic hamsters, contrasting with improvement in the left ventricular mass previously observed with the ACE inhibitor captopril [28].

In the present study, the important reduction in ventricular angiotensin II concentration and the significant decrease in AT₁ receptor density caused by chronic AT₁ blockade were not associated with any regression and/or prevention of cardiac hypertrophy. Our results and those of others do

not exclude the possibility that angiotensin II may be involved in the development of cardiovascular diseases. However, they suggest that cardiac AT₁ receptors are not directly involved or play a minor role in cardiomyocyte growth and progression of hypertrophy in experimental models of cardiac hypertrophy. In addition to the results obtained with our genetic model of non-pressure-overload cardiac hypertrophy, results from a recent study using angiotensin II type 1a receptor knockout mice [29] also support the notion that angiotensin II signaling through the AT₁ receptor is not essential for the development of cardiac hypertrophy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Ms. Marie-France Legault for excellent technical assistance and Dr. André De Léan and Normand McNicoll for giving us access to their iodination and computer facilities.

This work was supported in part by a grant from the Medical Research Council of Canada to S.M. M.S. is recipient of a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada and S.M. is a Scientist of the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

- 1) Dostal, D.E. and Baker, K.M. (1993) Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends Cardiovasc. Med.* **3**, 67-74.
- 2) Baker, K.M., Chernin, M.I., Wixson, S.K. and Aceto, J.F. (1990) Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol.* **259**, H324-H332.
- 3) Hallen, S.T., Weishaar, R.E., Overhiser, R.W., Bousley, R.F., Keiser, J.A., Rapundalo, S.R. and Taylor, D.G. (1991) Effects of quinapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor, on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster. Hemodynamic, morphological and biochemical correlates. *Circ. Res.* **68**,1302-1312.
- 4) Nakamura, F., Nagano, M., Kobayashi, R., Higaki, J., Mikami, H., Kawasgushi, N., Onishi, S. and Ogihara, T. (1994) Effects of an angiotensin-converting inhibitor, cilazapril, on congestive heart failure in cardiomyopathic hamsters. *In* The cardiomyopathic heart (Nagano, M., Takeda, N. and Dhalla, N.S. Eds.). pp. 145-156, Raven Press, New York.
- 5) Lambert, C., Massillon, Y. and Meloche, S. (1995) Upregulation of cardiac angiotensin II AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ. Res.* **77**, 1001-1007.
- 6) Bastien, N.R., Juneau, A.V., Lambert, C. (1998) Chronic AT₁ receptor blockade and ACE inhibition in (CHF 146) cardiomyopathic hamsters: Effects on cardiac hypertrophy and survival. Under Revision October *Cardiovasc. Res.*
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75.
- 8) De Léan, A., Hancock, A.A. and Lefkowitz, R.J. (1982) Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **21**, 5-16.
- 9) De Silva, P.E., Husain, A., Smeby, R.R. and Khairallah, P.A. (1988) Measurement of immunoreactive angiotensin peptides in rats tissues: some pitfalls in angiotensin II analysis. *Anal. Biochem.* **174**, 80-87.
- 10) Griendling, K.K., Delafontaine, P., Rittenhouse, S.E., Gimbrone, M.A.Jr. and Alexander, R.W. (1987) Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J.Biol. Chem.* **262**, 14555-14562.

- 11) Böhm, S.K., Grady, E.F., and Bunnett, N.W. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **322**, 1-18.
- 12) Groblewski, T., Maigret, B., Larguier, R., Lombard, C., Bonnafous, J.C. and Marie, J. (1997) Mutation of ASN 111 in the third transmembrane domain of the AT1a angiotensin II receptor induces its constitutive activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 1822-1826.
- 13) Barker, E.L., Westphal, R.S., Schmidt, D. and Sanders-Bush, E. (1994) Constitutively active 5-hydroxytryptamine 2c receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **269**, 11687-11690.
- 14) Regitz-Zagrosek, V., Auch-Schwelk, W., Hess, B., Klein, U., Duske, E., Steffen, C., Hildebrandt, A.G. and Fleck, E. (1995) Tissue- and subtype specific modulation of angiotensin II receptors by chronic treatment with cyclosporine A, angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT1 antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**, 66-72.
- 15) Baker, K.M., Booz, G.W. and Dostal, D.E. (1992) Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 227-241.
- 16) Sadoshima, J. and Izumo S. (1993) Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT₁ receptor subtype. *Circ. Res.* **73**, 413-423.
- 17) Raya, T.E, Fonkel, S.J., Lee, R.W., Daugherty, S., Goldman, S., Wong, P.C. and Timmermanns, P.B.M.W.M. (1991) Hemodynamic effects of direct angiotensin blockade compared to converting enzyme inhibition in rat model of heart failure. *Am. J. Hypertension.* **4**, 3345-3405.
- 18) Linz, W. and Scholkens, B.A. (1992) A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 771-771.
- 19) Schieffer, B., Wirger, A., Meybrunn, M., Seitz, S., Holtz, J., Riede, U.N. and Drexler, H. (1994) Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation.* **89**, 2273-2282.
- 20) Liu, Y.H., Yang, X.P., Sharov, V.G., Nass, O., Sabbah, H.N., Peterson, E. and Carratero, O.A. (1997) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors angiotensin II type 1 receptor antagonists with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J. Clin. Invest.* **99**, 1926-1935.
- 21) Dixon, I.M., Ju, H., Reid, N.L., Scammell-La Fleur, T., Werner, J.P. and Jasmin, G. (1997) Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic Syrian hamster and the effect of losartan. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**, 1837-1850.

- 22) Milavetz, J.J., Raya, T.E., Johnson, C.S., Morkin, E. and Goldman, S. (1996) Survival after myocardial infarction in rats: captopril versus losartan. *J. Am. Coll. Cardiol.* **27**, 714-719
- 23) Lanza, G.M., Scott, M.J., Davison, G., Hall, C.S., Christy, D.H., Miller, J.G. and Wickline, S.A. (1997) Angiotensin II receptor blockade in Syrian hamsters (T0-2) cardiomyopathy does not affect microscopic cardiac material properties: implications for mechanisms of tissue remodeling. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **11**, 521-529.
- 24) Mitchell, S.F., Marks, E.S., Patterson, R.E., Speir, E.H., Steadman, K.A. and Keiser, H.R. (1987) Correlation of changes in cardiac calcium channels with hemodynamics in Syrian hamster cardiomyopathy and heart failure. *Life Sciences.* **41**, 153-159.
- 25) Weinberg, E.O., Lee, M.A., Weigner, M., Lindpainter, K., Bishop, S.P., Benedict, C.R., Ho, K.K., Douglas, P.S., Chafizadeh, E. and Lorell, B.H. (1997) Angiotensin AT₁ receptor inhibition: effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation.* **95**, 1592-1600.
- 26) Sugimoto, K., Gotoh, E., Takasaki, I., Ebina, T., Iwamoto, T., Takisawa, T., Shionoiri, H. and Ishii, M. (1996) AT₁ receptor antagonist, TCV 116, does not prevent cardiac hypertrophy in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**, 282-286.
- 27) Spinale, F.G., Holzgrefe, H.H., Mukherjee, R., Hird, R.B., Walker, J.D., Arnim-Barker, A., Powell, J.R. and Koster, W.H. (1995) Angiotensin-converting enzyme inhibition and the progression of congestive cardiomyopathy: effects on left ventricular and myocyte structure and function. *Circulation.* **92**, 562-578.
- 28) Davison, G., Hall, C.S., Miller, J.G., Scott, M. and Wickline, S.A. (1994) Cellular mechanisms of captopril-induced matrix remodeling in Syrian hamsters cardiomyopathy. *Circulation.* **90**, 1334-1342.
- 29) Harada, K., Komuro, I., Yunzeng, Z., Kudoh, S., Kijima, K., Matsubara, H., Sugaya, T., Murakami, K. and Yazaki, Y. (1998) Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice. *Circ.Res.*, **82**, 779-785.

LEGENDS FOR FIGURES

FIGURE 1

Experimental groups used in this study.

FIGURE 2

Representative competition binding curves of losartan for the binding of ^{125}I -sarile to ventricular membranes prepared from 175-day-old inbred control (panel A) and cardiomyopathic (panel B) hamsters. Membranes were incubated at 25°C for 60 min with 0.2 nmol/L ^{125}I -sarile and varying concentrations of losartan. Bound ^{125}I -sarile was determined by rapid filtration on GF/B filters. Data shown for each curve were obtained from a single representative experiment with duplicate determinations of each point. Binding data were analysed by non linear least-squares regression analysis. The solid lines represent the computerized fit of data.

ARTICLE 3

**MYOCYTE APOPTOSIS AND THE CARDIOMYOPATHY
OF THE SYRIAN HAMSTER**

Natacha Rachel Bastien ^{1,2}, Théorêt Yves ^{1,2}, and Chantal Lambert ¹

¹ Département de Pharmacologie, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

² Charles Bruneau Cancerology Center, Hôpital Ste-Justine, 3175 Chemin de la Côte Ste-
Catherine, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

Address correspondence to: Dr. Chantal Lambert

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine

Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6506

Fax : (514) 343-2291

E-mail : lambec@ere.umontreal.ca

MYOCYTE APOPTOSIS AND THE CARDIOMYOPATHY OF THE SYRIAN HAMSTER

Natacha Bastien Rachel, Yves Théoret and Lambert Chantal

ABSTRACT

Objectives The morphological and biochemical alterations associated with the cardiomyopathy of the Syrian hamster are well described but the precise mechanism(s) underlying this pathology is(are) still under investigation. The aim of this study was to determine whether or not apoptosis is present in cardiomyopathic cells. **Methods and Results** The detection and quantification of apoptosis in left ventricles of inbred control and cardiomyopathic hamsters was done using an immunohistochemical technique which labels the 3'OH ends of fragmented DNA (TUNEL assay). Subsequent immunohistochemical staining for α -sarcomeric actin revealed that apoptotic manifestations affected both myocyte and non-myocyte cell-types. To support these observations, ultrastructural features characteristic of apoptosis were evidenced by electron microscopy. Few TUNEL-positive nuclei, mainly of myocyte origin, were observed throughout the left ventricles of 50-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters suggesting a role in postnatal cardiac morphogenesis. Very few TUNEL-positive nuclei (none of myocyte origin) were observed in the cardiac tissue of 175- and 350-day-old inbred control hamsters. Interestingly, significant numbers of TUNEL-positive nuclei (4% of all positive nuclei were of myocyte origin) were observed in the left ventricles of 175- and 350-day-old cardiomyopathic hamsters. In both age groups, the TUNEL-positive nuclei were mainly localised in areas of fibrosis with a higher density in the older animals. **Conclusions** These results suggest that apoptosis relates to the cellular loss that occurs during the development of cardiomyopathy (hypertrophy and/or progressive heart failure).

KEY WORDS : Apoptosis, cardiomyopathic hamster, hypertrophy, progressive heart failure, immunohistochemistry, electron microscopy.

INTRODUCTION

The cardiomyopathic strain of Syrian hamsters has a cardiac disease that originates from a genetically transmitted metabolic defect. Degenerative lesions are induced in all striated muscles but with particular consistency and intensity in the heart ⁽¹⁾. The cardiomyopathic hamster is an interesting model of experimental cardiomyopathy since the slow progression of the disease allows the cardiac system to be studied at different steps in the development of the pathology and since the abnormalities at each stage of the disease are reproducible and predictable.

The cardiomyopathy of the hamster is characterized by the occurrence of focal myocardial degeneration resulting in congestive heart failure. During the development of the pathologic changes, the following phases might be identified: 1) pre-necrotic phase (25 to 30 days), 2) necrotic phase (70 to 75 days), 3) healing stage with fibrosis and hypertrophy (125 to 175 days), 4) progressing dilatation (225 to 250 days), and 5) heart failure (325 to 350 days) ⁽²⁾. Although the pathological and biochemical alterations that occur in the ventricles of cardiomyopathic hamsters are well described, the precise mechanism(s) underlying the development of this pathology is(are) still under investigation.

Apoptosis is an important type of cell death which is implicated in the regulation of cellular homeostasis in many physiological processes such as the maturation of the immune system ⁽³⁾, the regulation of hormone-dependent tissues or organs ⁽⁴⁾, and the embryogenic development ⁽⁵⁾. A role for apoptosis has been suggested in different pathological situations such as cancer and neurodegenerative diseases ⁽⁶⁻⁷⁾ as well as more recently, ischemic myocardial injury, cardiac overload and heart failure ⁽⁸⁾.

In the ventricular walls of the cardiomyopathic hamsters, progressive cell loss is attributed to necrosis. On the other hand, since it is well established that marked increases in intracellular calcium concentrations occur in cardiomyopathic cells ⁽⁹⁾ and since sustained increases of intracellular calcium concentrations are potent inducers of apoptosis ⁽¹⁰⁾, it is therefore possible that this phenomenon could also be implicated in cardiomyopathic cell death. The objective of this study was to determine whether or not the apoptotic process is activated in the ventricles of cardiomyopathic hamsters during different phases of the development of the cardiomyopathy.

MATERIAL AND METHODS

Experimental model

Male Syrian inbred control (CHF 148, n = 33) and cardiomyopathic (CHF 146, n = 33) hamsters were purchased from the Canadian Hybrid Farm (Hall Harbour, Nova Scotia, Canada). The study was performed using 50-, 175- and 350-day-old animals.

All procedures for animal experimentation conformed to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were monitored by an institutional animal care committee.

Qualitative *in situ* apoptotic detection (TUNEL assay)

The animals (n = 6 per group) were anaesthetized with thiopental (50 mg/kg, i.p.). The hearts were quickly removed and rinsed in cold phosphate-buffered saline (PBS). The left ventricular walls were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Ten-micron thick sections were cut transversely in the mid-portion of the ventricles.

Immunohistochemical staining of tissue sections was done for apoptotic detection as described in ApopTag procedures (TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling, TUNEL assay, Oncor). Briefly, after deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase was quenched by treatment with 2% hydrogen peroxide in PBS for 15 min. Sections were then treated, in a humidified chamber at 37 °C for 1 hour, with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), an enzyme that adds digoxigenin-dUTP residues to the 3'-OH ends of DNA strand breaks resulting from the apoptotic process. The reaction was stopped by immersing tissue sections in pre-warmed working strength stop/wash buffer for 30 min. The anti-digoxigenin antibody that carries peroxidase at the reaction site recognized the digoxigenin-dUTP heteropolymer formed from the catalyzing step and the resulting complex was visualized by reacting the peroxidase with a chromogenic substrate, 0.05% diaminobenzidine in PBS. Tissue sections were counterstained with methyl green, dehydrated and mounted before examination. By this technique, positive stained nuclei show dark brown staining. Slides were examined with a microscope Nikon (Optiphot-2) equipped with a Sony 3CCD color (DXC-930). The signal was fed to a Matrox IM-640 card, the image was grabbed using a Clemex Vision 2.1.041 software (Clemex Technologies Inc.) and saved into TIFF files. The images were tiled and the color intensity was standardized using Adobe Photoshop software (Version 3.0). The composite photos were printed using a Kodak XLS 8600 postscript printer. Left ventricular

myocardial sections consecutive to those used for apoptotic detection, were stained for morphological identification with haematoxylin-phloxin-saffron (HPS) as described by Luna⁽¹¹⁾.

Positive and negative controls were included in the procedures to confirm the specificity of the reaction. Adrenal cortices from 4-day-old Sprague-Dawley rats (n = 14) (St-Constant, Québec) were used as positive controls as it has been reported that this tissue presents large numbers of apoptotic cells during the first week of postnatal life⁽¹²⁾. The negative controls consisted of consecutively stained tissue sections in which the TdT enzyme was replaced with distilled water.

Cell-type identification

After the TUNEL assay but using anti-sheep digoxigenin FITC-labeled antibody, the type of cells undergoing apoptosis was identified by rinsing the tissue sections in PBS and staining for α -sarcomeric actin. The tissues were first incubated at room temperature for 30 min with the primary mouse antibody (monoclonal anti- α -sarcomeric actin specific for α -skeletal and α -cardiac muscle actin, clone 5C5, Sigma), diluted 1:100 in PBS containing 10% goat serum, and 30 min subsequently with anti-mouse IgG TRITC-labeled antibody (Sigma), diluted 1:30 in PBS containing 10% goat serum. The sections were rinsed in PBS and mounted before examination. The examination was done with excitation-emission filters for FITC (EX 450-490, DM 505, BA 520), which enabled the identification of incorporated dUTP in the nuclei and for TRITC (EX 510-560, DM 575, BA 590), which enabled the identification of α -sarcomeric actin⁽¹³⁾. By this technique, TUNEL-positive nuclei show bright green staining and α -sarcomeric actin of the myoplasm appears reddish under fluorescence microscopy. As negative controls for α -sarcomeric actin, consecutive tissue sections were stained without the primary antibody and showed no staining.

Quantitative *in situ* evaluation of apoptosis

After the double immunostaining for cell-type identification, the left ventricular sections were examined for the quantification of apoptosis. For each tissue section, the ventricular walls were examined at X625. The TUNEL-positive nuclei (myocyte and non-myocyte cell-types) were counted and values were expressed as number of TUNEL-positive nuclei per mm^2 of left ventricular section ($n = 5$ animals per group).

Left ventricular sections next to those used for the apoptotic detection were stained with HPS. The number of nuclei (myocyte and non-myocyte cell-types) was determined in 15 randomly selected fields of $64 \mu\text{m}^2$ on each tissue section using a microscope Nikon (Optiphot-2) equipped with an ocular grid. Following this quantification, the tissue sections were magnified at X35 (Nikon SMZ-2T stereomicroscope equipped with a Dage CCD-72 camera), the images were grabbed (Matrox IP-8 video card, IPX image acquisition software) and stored on a microcomputer. The left ventricular surfaces were measured using Sigma Scan Image software (Jandel Scientific). Combining these two determinations (number of nuclei per $64 \mu\text{m}^2$ X total surface), the total number of nuclei per section was estimated. The number of TUNEL-positive nuclei per left ventricular section was therefore also reported per 10^6 nuclei.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Comparison between groups was made using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student-Newman-Keuls analysis for multiples comparisons. The critical level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Ultrastructural analysis of apoptosis

TUNEL assay is recognised as a selective method for examining apoptotic nuclei *in situ* because these nuclei contain a far greater degree of DNA fragmentation. However, since it has been reported by Ansari et al. ⁽¹⁴⁾ that this technique is not specific for programmed cell death and that, it may also labels degenerate nuclei representing the end stage of accidental cell death, it is important to support the observations by studying the morphological features of TUNEL-positive cells in greater details. Therefore, in order to strengthen the results obtained by immunohistochemical staining, selected regions (showing high apoptotic staining) of paraffin embedded left ventricular walls from cardiomyopathic hamsters of 175 days of age (n = 2) were cut ($\approx 2 \text{ mm}^3$) and immersed overnight in xylene to remove paraffin. After partial rehydration up to 50% ethanol, these formalin-fixed tissue blocks were immersed in ice-cold 0.1 mol/L cacodylate-buffered 2.5% glutaraldehyde (pH 7.3) for 1 hour. The specimens were then washed 3 times in 0.1 mol/L cacodylate buffer and treated for 1 hour in 0.1% cacodylate-buffered 1% OsO₄. Following this, the samples were dehydrated, infiltrated with propylene oxide and embedded in epon. Areas of interest were detected from toluidine-blue stained semithin sections (3 μm). Ultrathin sections were cut (800 Å), mounted on solid grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined using a Phillips EM 301 transmission electron microscope at magnifications ranging from X3,000 to X7,500.

RESULTS

Detection of TUNEL-positive nuclei in

left ventricles of inbred control and cardiomyopathic hamsters

The left ventricular surfaces measured in 50-, 175- and 350-day-old inbred and cardiomyopathic hamsters are presented in Table 1. While there were no differences between the two groups at 50 days of age, significant manifestations of cardiac hypertrophy were observed in the older cardiomyopathic animals compared with the inbred controls.

The double immunohistochemical staining in left ventricular sections of 175- and 350-day-old cardiomyopathic hamsters shows that TUNEL-positive nuclei were detected both in myocyte (Fig. 1-C and D) and non-myocyte cell-types (Fig. 1-C to F). Left ventricular tissues from inbred control animals of the same ages showing no apoptotic staining (Fig. 1-A) served as positive controls for α -sarcomeric actin (Fig. 1-B).

Table 2 presents the numbers of TUNEL-positive nuclei (total and myocyte cell-types) that were counted in sections of left ventricular walls of inbred control and cardiomyopathic hamsters of 50, 175 and 350 days of age. This method of quantification was selected considering the slow progression of the cardiomyopathy. In fact, other methods such as the commonly used nucleosome ladder assay ⁽¹⁵⁾ as well as the measurement of caspase activities either by using fluorogenic tetrapeptide derivative substrates or by looking for specific substrate cleavage products by Western blot analysis ⁽¹⁶⁾ have not been positive in this study probably because of the small number of apoptotic cells in our tissue preparation (data not shown).

TABLE 1

**Left ventricular surfaces (mm²) in 50-, 175-, 350-day-old
inbred control and cardiomyopathic hamsters**

	50-day-old n = 5	175-day-old n = 5	350-day-old n = 5
Inbred Controls	13.9 ± 0.7	22.5 ± 0.8	19.4 ± 0.5
Cardiomyopathics	15.4 ± 0.9	27.9 ± 1.5*	23.4 ± 0.7*

* $p \leq 0.05$ compared with their respective corresponding inbred control group.

FIGURE 1

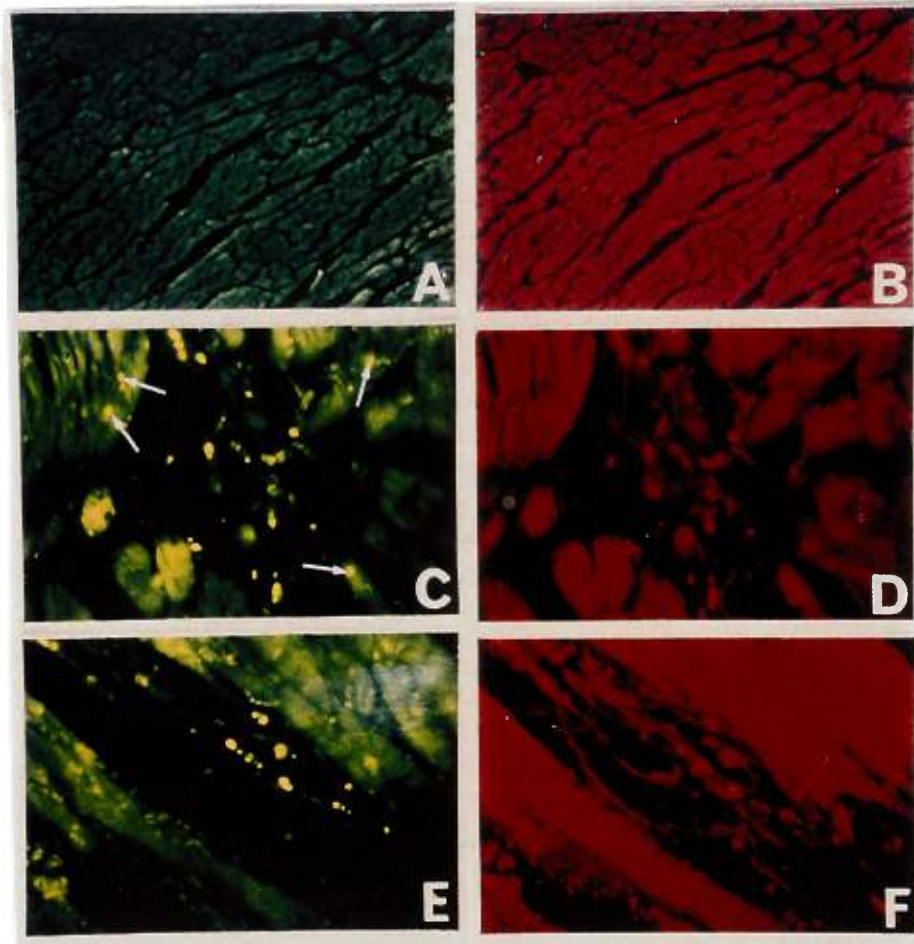


TABLE 2

Number of TUNEL-positive nuclei per mm² (or 10⁶ total nuclei) of left ventricular sections of inbred control and cardiomyopathic hamsters

	50-day-old n = 5		175-day-old n = 5		350-day-old n = 5	
	All cell-types	Myocytes	All cell-types	Myocytes	All cell-types	Myocytes
Controls						
mm ² of tissue	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0	0.1 ± 0.0	0
10 ⁶ nuclei	42.6 ± 13.3	31.2 ± 10.6	16.2 ± 4.9	0	37.6 ± 12.5	0
Cardiomyopathies						
mm ² of tissue	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.8 ± 0.5	0.1 ± 0.0	5.2 ± 0.6	0.2 ± 0.0
10 ⁶ nuclei	38.4 ± 14.9	29.8 ± 12.8	948.7 ± 134.6 ^{*b}	39.9 ± 5.0 ^b	1826.7 ± 139.8 ^{*ab}	59.6 ± 10.4 ^b

Values are presented as mean ± SEM

* p ≤ 0.05 compared with the 50-day-old cardiomyopathic group; ^a p ≤ 0.05 compared with the 175-day-old

cardiomyopathic group; ^b p ≤ 0.05 compared with their corresponding inbred control group.

Using the TUNEL assay and the α -sarcomeric actin staining, few TUNEL-positive nuclei, mainly of myocyte origin ($\approx 75\%$, Table 2), were observed throughout the left ventricular tissue of inbred control (Fig. 2-A) and cardiomyopathic hamsters (Fig. 2-C) of 50 days of age. The HPS staining of consecutive myocardial sections confirmed that at that age, no histological cardiac lesions could be observed in the left ventricles of cardiomyopathic hamsters (Fig. 2-D).

Very few TUNEL-positive nuclei were found in the left ventricular tissue of inbred control hamsters of 175-day-old (Fig. 3-A) and all cells were of non-myocyte origin. In contrast and interestingly, significant apoptotic manifestations were observed in the left ventricles of cardiomyopathic hamsters of the same age (Fig. 3-C). In these tissue sections, approximately 4% of all TUNEL-positive nuclei were of myocyte origin based upon positive labeling with α -sarcomeric actin antibody (Table 2). Few TUNEL-positive nuclei were found throughout the myocardium but most of them were found in areas of fibrosis, as demonstrated by the HPS staining of consecutive myocardial sections (Fig. 3-D).

There were very few indications of the apoptotic process in the left ventricular tissue of 350-day-old inbred control hamsters and again, no TUNEL-positive nuclei were of myocyte origin. TUNEL-positive nuclei were observed in the left ventricles of cardiomyopathic animals at a higher frequency compared with the results obtained in 175-day-old cardiomyopathic animals (Table 2). In these tissue sections from 350-day-old animals, approximately 4% of all TUNEL-positive nuclei were of myocyte origin based upon positive labeling with α -sarcomeric actin antibody (Table 2). The TUNEL-positive nuclei were mainly found in areas of fibrosis as demonstrated by the HPS staining of consecutive myocardial sections (data not shown).

FIGURE 2

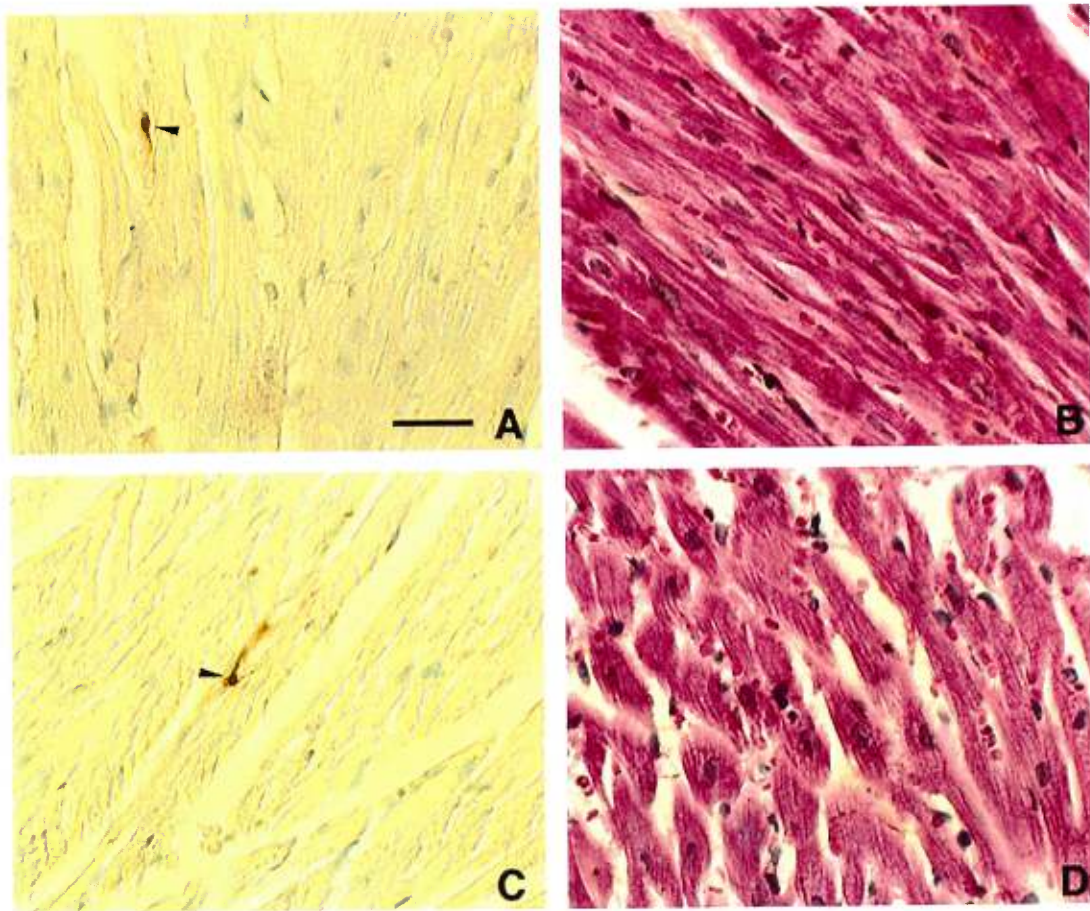
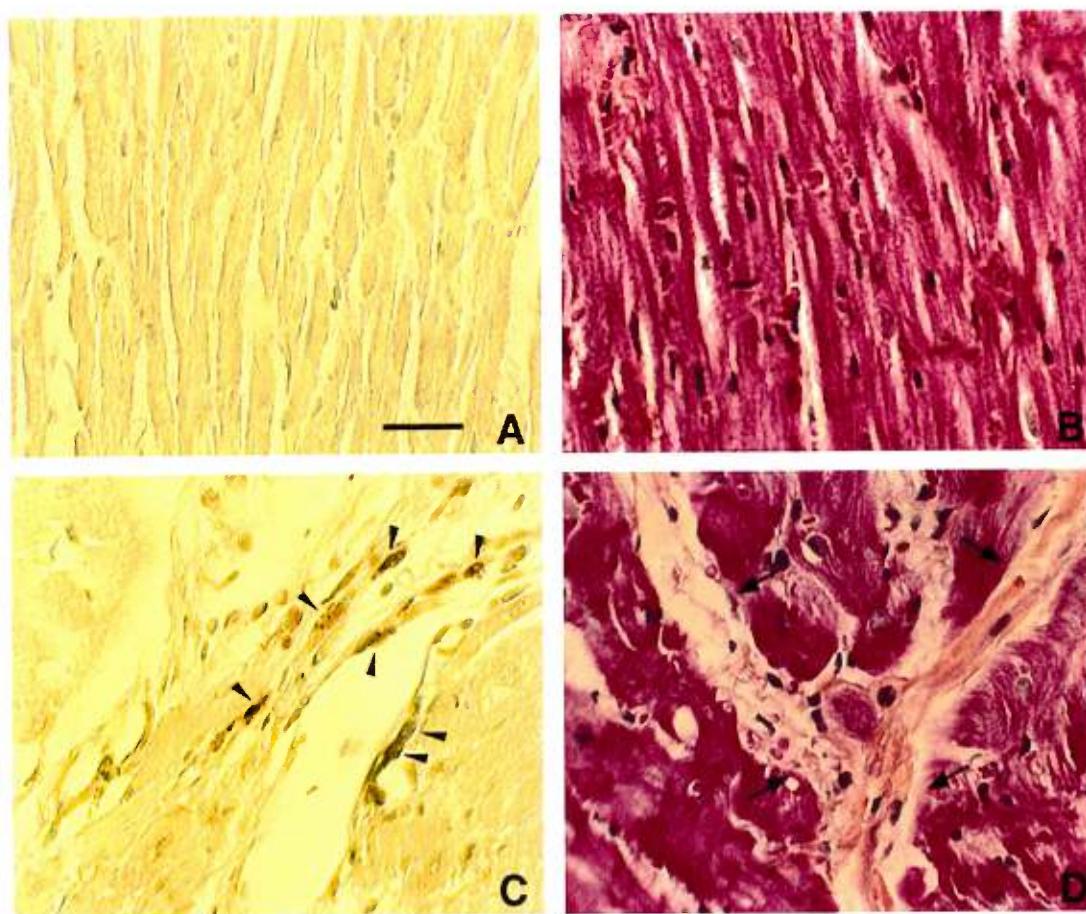


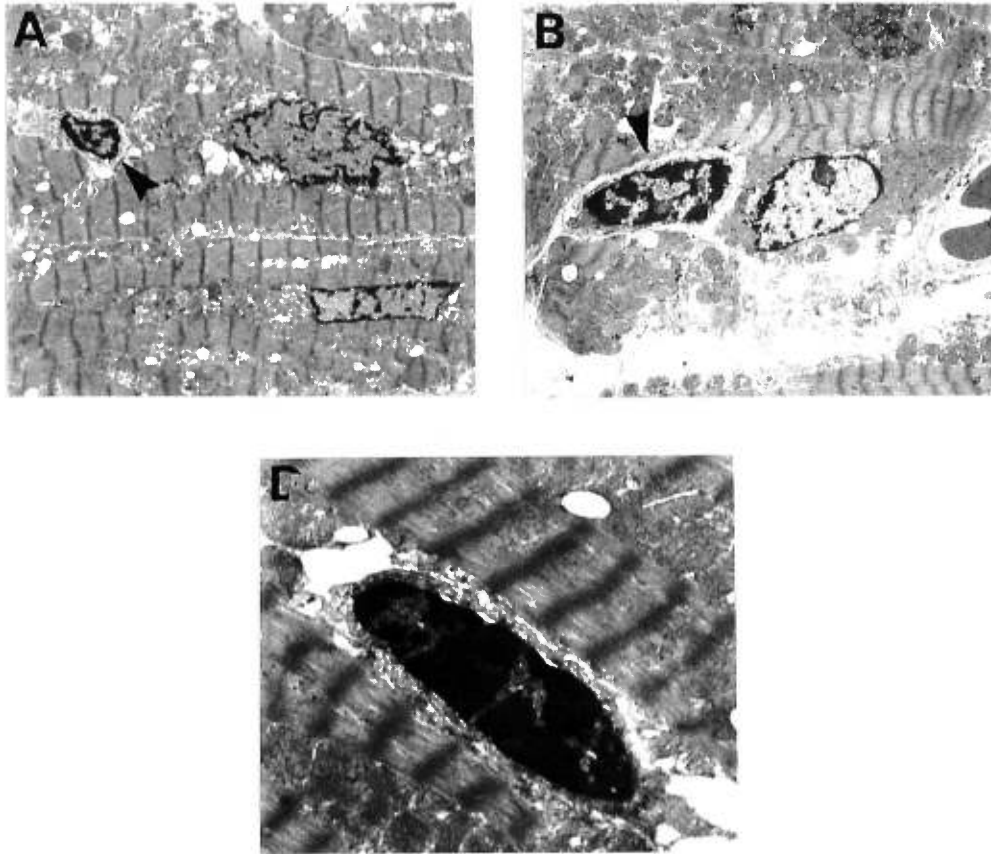
FIGURE 3



Ultrastructural analysis of apoptosis

In difference to necrosis, apoptosis is undergone by individual cells that are surrounded by healthy neighbours ⁽⁸⁾. In our tissue samples, ultrastructural features characteristic of the apoptotic process were observed by electron microscopy in individual cells of left ventricular tissue from cardiomyopathic hamsters of 175 days of age. These cells exhibited clumping of nuclear chromatin into sharply delineated granular masses marginated to the nuclear envelope (Fig. 4-A to -C) contrasting with adjacent normal viable cells that presented evenly distributed chromatin (Fig. 4-A and -B). In the cells with condensed chromatin, the integrity of the plasmatic membrane appeared preserved. These observations are in agreement with those presented by other investigators ⁽¹⁷⁾. When combined with the evaluations obtained with immunohistochemical staining, these results strongly suggest the presence of an apoptotic process in the left ventricles of cardiomyopathic hamsters.

FIGURE 4



DISCUSSION

Apoptosis, believed to be an important and ubiquitous physiological mode of cell death, is different from the cell mortality induced by necrosis. It is generally characterized by specific changes in the cytoplasm of cells. Marked condensation and margination as well as fragmentation of chromatin occur as a result of cleavage by endonucleases at linker DNA sites between nucleosomes, yielding DNA fragments of multimers of 180- to 200-bp nucleosomal units⁽¹⁸⁾. With apoptosis, as opposed to what is seen with necrosis, cell volume rapidly reduces, cell membrane remains preserved and there is apparently no inflammatory reaction⁽¹⁹⁾.

The precise mechanisms of apoptosis are unknown, but it is now established that it can be triggered by a variety of intrinsic and extrinsic signals such as, among others, chemotherapeutic drugs and UV radiation, heat shock and viral infection, growth factor withdrawal, some neurotransmitters as well as by calcium⁽¹⁰⁾. It has been demonstrated that many inducers of apoptosis clearly increase intracellular calcium concentrations, that calcium ionophores readily induce apoptosis and furthermore, that the prevention of increases in calcium concentrations blocks the induction of the apoptotic process. It is postulated that the role of calcium is explained by the fact that several nucleases and factors responsible for the early DNA degradation are calcium-dependent⁽²⁰⁾.

In the cardiomyopathic cells, marked increases in intracellular calcium concentrations are possibly related to a decreased mitochondrial calcium uptake, an augmented/reduced sarcolemmal calcium influx/efflux or a decreased sarcoplasmic reticular calcium pump ATP-ase activity⁽⁹⁾. The hypothesis that apoptosis has a role in the development of the cardiomyopathy (hypertrophy and/or progressive heart failure) of the Syrian hamster was therefore highly plausible.

It is actually proposed that whereas necrosis may be considered the accidental form of cell destruction, apoptosis represents the functional form. This biological function might imply the deletion of cells required for only a given time in tissue development and function, as well as the elimination of cells that have been produced in excess, that have developed improperly or that have sustained genetic damage^(10, 21). In our experiment, few TUNEL-positive nuclei, mainly of myocyte origin, were observed throughout the left ventricle of both groups of 50-day-old hamsters. These results suggest that apoptosis has a role in the postnatal morphogenesis of the heart. This is in agreement with the results of Kajstura et al.⁽²²⁾ who evaluating the heart of rats soon after birth, concluded that apoptosis may be a major component of the differential ventricular growth adaptation during postnatal development. Our results are also supported by the observations of James⁽²³⁾ who reported that the human conduction system undergoes remarkable morphological transformation after birth. He proposed that the final geometric design of this system may be explained by the fact that some myocytes have been programmed genetically for selective deletion.

Since the review of James in 1994⁽²⁴⁾ proposing that apoptosis may participate in the genesis and pathophysiology of different cardiac disorders, the presence of apoptosis in the heart and cardiomyocytes has been recognised by several authors^(18-19, 25-27). In our experiment, significant apoptotic manifestations (4.2% of all TUNEL-positive nuclei were of myocyte origin) were observed in the left ventricles of 175-day-old cardiomyopathic hamsters whereas almost very few TUNEL-positive nuclei (none of myocyte origin) were found in the ventricular tissue of inbred control hamsters of the same age. These results suggest that, in this experimental model, apoptosis is responsible of part of the cell death which was previously attributed to necrosis and, moreover, that the apoptotic process plays an important role in the development of cardiac hypertrophy. These

possibilities are in agreement with the observations of Teiger et al. ⁽¹⁵⁾ who reported, using a model of pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat, that the cardiac hypertrophy was preceded by a wave of apoptosis of cardiomyocytes. These authors concluded that apoptosis might be involved in the pathogenesis of heart remodelling.

Hypertrophy has long been thought to be beneficial as a non-specific compensatory response to varied deleterious stimuli decreasing the functional capacity of the myocardium ⁽⁹⁾. However, it is evident that after a period of compensated function, events arrive which are associated with dysfunction and the demise of the myocardium. Despite numerous investigations, the fundamental mechanism(s) underlying the transition from hypertrophy to heart failure is(are) still yet poorly understood. Among other hypotheses, it has been proposed by Bing ⁽¹⁹⁾ that chronic hypertrophy may induce apoptosis and, that progressive left ventricular dysfunction occurs, in part, as a result of ongoing and sustained loss of viable cardiomyocytes. Our results are in agreement with this possibility since TUNEL-positive nuclei (4 % of all apoptotic nuclei were of myocyte origin) have been observed in the left ventricles of 350-day-old cardiomyopathic animals whereas very few TUNEL-positive nuclei (non of myocyte origin) were present in the ventricular tissue of inbred control hamsters of the same age. Also supporting the concept that ongoing death of cardiomyocytes occurs in cardiac failure, the presence of apoptosis in ventricular myocardium has been recently reported in two different dog models of chronic heart failure produced by multiple intracoronary microembolizations ⁽¹⁷⁾ and by rapid left ventricular pacing ⁽²⁸⁾ as well as, in human idiopathic dilated cardiomyopathy ⁽²⁹⁾ and end-stage failure^(30,31). Altogether these data undeniably provide a potential mechanism for the progressive loss of functional cardiac units in cardiac failure.

In our experiment, 4% of the TUNEL-positive nuclei, observed in the cardiomyopathic animals, were of myocyte origin. These numbers are in agreement with the previous report of Sharov et al.⁽¹⁷⁾ who showed, in a canine model of heart failure, that 12 and 3% of the total apoptotic nuclei that were observed in border and remote left ventricular regions of old infarcts were of myocyte origin. Due to the rapidity of the apoptotic process as well as to the fact that it is actually not known how many apoptotic bodies that do not contain α -sarcomeric actin are of myocyte or non-myocyte origin, the exact rate of myocyte apoptotic process in hypertrophy or heart failure cannot actually be calculated. In our samples, apoptotic cells recognised as myocytes represented 0.01% of the total nuclei. Even if this number might seem low, it is important to keep in mind that, as recently discussed by Colucci⁽³²⁾, assuming that a cell undergoing apoptosis is only detectable for 24 hours, it could be estimate that the loss of 0.2% of myocyte cells per day, if sustained for one year, might result in the loss of or more than 50% of the total pool of cardiac myocytes.

It is becoming more and more recognised that apoptotic cell death can be either a normal and beneficial or an abnormal and harmful event⁽²⁴⁾. In this regard, further studies are obviously necessary to determine the role of apoptosis in the promotion of cardiac remodelling and hypertrophy as well as, in the transition from hypertrophy to chronic heart failure. Nevertheless, these new possibilities certainly offer interesting avenues for a better understanding of the fundamental mechanism(s) underlying these pathophysiological conditions. Moreover, the evaluation of the effects of pharmacological treatments that increase the survival of the cardiomyopathic hamster on the presence and importance of apoptosis will undoubtedly add information pertinent in the development of new therapeutic interventions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mrs. Elisabeth Pérès for the art work, Mr. Gaston Lambert for the photographic work and Mrs. Élise Donnedieu for the technical assistance. Personnel support was provided by Bio-Méga Boehringer Ingelheim Recherche Inc. and Ste-Justine's Research Center to Natacha Bastien, Fondation Charles Bruneau to Yves Théorêt, and by Fonds de la recherche en santé du Québec to Richard Bertrand. This work was supported, in part, by a Medical School Grant from Merck & Co.

REFERENCES

1. Chemla D, Scalbert E, Desché P, Lecarpentier Y. La cardiomyopathie du hamster Syrien: Aspects physiopathologiques et thérapeutiques. *Arch Mal Coeur* 1991;84:85-87.
2. Hunter EG, Hugues V, White J. Cardiomyopathic hamsters, CHF 146 and CHF 147: a preliminary study. *Can J Physiol Pharmacol* 1984;62:1423-1428.
3. Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1994;6:279-289.
4. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal DNA cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology* 1993;133:591-599.
5. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissues kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
6. Green DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis control malignancy. *Curr Opin Immunol* 1995;7:694-703.
7. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; 262:695-700.
8. Brömme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why ? *Mol Cell Biochem* 1996;163/164:261-275.
9. Dhalla NS, Afzal N, Beamish RE, Naimark B, Takeda N, Nagano M. Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Can J Cardiol* 1993;9:873-887.

10. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
11. Luna LG. Routine staining procedures. In: Luna LG. ed. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1968:32-46.
12. Willie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J Pathol* 1973;111:255-261.
13. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86-107.
14. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993;170:1-8.
15. Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996;97:2891-2897.
16. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of Ice-like and Cpp32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996;380:723-726.
17. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996;148:141-149.
18. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995;26:642-648.

19. Bing OHL. Hypothesis: Apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:943-948.
20. Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; 9:219-228.
21. Binder C, Hiddemann W. Programmed cell death - many questions still to be answered. *Ann Hematol* 1994;69:45-55.
22. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995;219:110-121.
23. James TN. Cardiac conduction system: fetal and postnatal development. *Am J Cardiol* 1970;25:213-226.
24. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Circulation* 1994;90:556-573.
25. Gottlieb RA, Bureson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-1628.
26. Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994;75:426-433.
27. Bardales RH, Hailey LS, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. *In situ* apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 1996;149:821-829.
28. Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 1995;73:771-787.

29. Yao M, Keogh A, Spratt P, Dos Remedios CG, Kiessling PC. Elevated DNase I levels in human idiopathic dilated cardiomyopathy: an indicator of apoptosis? *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:95-101.
30. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw Ban-An. Apoptosis in myocytes in end-stage failure. *N Eng J Med* 1996;335:1182-1189.
31. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing heart. *N Eng J Med* 1997;336:1131-1141.
32. Colucci WS. Apoptosis in the heart. *N Eng J Med* 1996;16:1224-1226.

LEGENDS TO FIGURES

FIGURE 1

Sections of left ventricular walls of 175-day-old inbred control (panels A and B; X625) and cardiomyopathic hamsters (panels C to F; X1250) stained with an *in situ* fluorescein apoptotic detection kit (TUNEL assay) and α -sarcomeric actin antibody revealed with TRITC. Microscopic fields were photographed with a 35 mm camera (Nikon, 601 M) loaded with a color slide film (Kodak, EPL 400). Panel A illustrates negative staining for apoptosis and panel B positive staining for α -sarcomeric actin. Panels C and E show positive fluorescein stained nuclei (intense bright green chromatin) whereas panels D and F illustrate the same respective sections stained with α -sarcomeric actin antibody. TUNEL-positive nuclei were mainly detected in areas of fibrosis. Some areas (panel C) contained both myocytes (arrows) as well as cells not recognised by α -sarcomeric actin antibody (most probably of non-myocyte cell-types) whereas other regions (panel E) showed only most probably non-myocyte cell-types.

FIGURE 2

Sections of left ventricular walls of 50-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters stained with an *in situ* peroxidase apoptotic detection kit (TUNEL assay) (A, C) and HPS (B, D). Arrowheads are pointing to TUNEL-positive nuclei (dark brown chromatin); X950; calibration bar represents 50 μ m. Representative results obtained from inbred control hamster are shown in panels A and B and from cardiomyopathic hamster in panels C and D. Few TUNEL-positive nuclei were found throughout the myocardium of either groups of animals. Slides were examined with a microscope Nikon (Optiphot-2) equipped with a Sony 3CCD color (DXC-930). The signal was fed to a Matrox IM-640 card, the image was grabbed using a Clemex Vision 2.1.041 software (Clemex Technologies Inc.) and saved into TIFF files. The images were tiled and the color intensity was standardized using Adobe Photoshop software (Version 3.0). The composite photos were printed using a Kodak XLS 8600 postscript printer.

FIGURE 3

Sections of left ventricular walls of 175-day-old inbred control and cardiomyopathic hamsters stained with an *in situ* peroxidase apoptotic detection kit (TUNEL assay) (A, C) and HPS (B, D). Arrowheads are pointing to TUNEL-positive nuclei (dark brown chromatin) and arrows to areas of fibrosis; X950; calibration bar represents 50 μ m. Panels A and B illustrate left ventricular sections of inbred control hamster where no evidences of an apoptotic process were observed. Panels C and D present left ventricular sections of cardiomyopathic hamster where TUNEL-positive nuclei were detected mainly in areas of fibrosis. The slides were examined and the microscopic films were taken as described in Figure 2.

FIGURE 4

Electron micrographs of left ventricular sections of cardiomyopathic hamsters of 175 days of age. Panels A and B show cells that exhibit condensation and margination of chromatin to the nuclear envelope (arrowheads) neighbouring normal cells with almost evenly distributed chromatin; X3,000. At higher magnification (X7,500), panel C illustrates a nucleus containing large compacted masses of chromatin segregated to the nuclear envelope.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

1.0 Blocage chronique du récepteur AT₁ et inhibition chronique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II chez des hamsters cardiomyopathiques: effets sur l'hypertrophie cardiaque et la survie.

1.1 Problématique

Le récepteur AT₁ à l'angiotensine II est surexprimé dans les ventricules du hamster cardiomyopathique alors que le récepteur AT₂ n'est pas détecté. Puisque la surexpression est présente à un moment où les lésions histologiques cardiaques ne sont pas détectables, ces résultats suggèrent que l'angiotensine II joue un rôle dans le développement et/ou le maintien de la cardiomyopathie. Une étude de survie a été réalisée afin de comparer les effets d'un antagoniste spécifique du récepteur AT₁, le losartan, à ceux d'un inhibiteur de l'ECA, le quinapril, sur la sévérité des lésions histologiques, le degré d'hypertrophie ainsi que la survie des animaux. Aucune différence dans l'incidence des lésions histologiques n'a été observée suite à l'administration de losartan ou de quinapril par rapport au placebo. Le losartan n'a pas modifié l'indice d'hypertrophie (30 mg/kg/jour) ou l'a augmenté (100 mg/kg/jour) alors qu'il était significativement diminué par le quinapril. Le losartan (100 mg/kg/jour) a diminué la durée de vie des animaux alors que le quinapril l'a augmentée de façon significative. Nos résultats suggèrent que la contribution du système des kinines et/ou celle du récepteur AT₂ dans la progression et/ou la régression de l'hypertrophie ainsi que dans l'augmentation de la survie des animaux sont importantes dans ce modèle expérimental. Il est également possible que la surexpression du récepteur AT₁ soit un phénomène adaptatif et que dans ce cas, l'action inotrope positive de l'angiotensine II soit essentielle afin de soutenir un coeur défaillant. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces résultats et une conclusion générale est que le récepteur AT₁ cardiaque ne semble pas directement impliqué dans le développement ou la régression de l'hypertrophie cardiaque chez le hamster cardiomyopathique.

À la lumière de nos résultats, nous ne pouvons cependant pas exclure une contribution de l'angiotensine II via le récepteur AT₁ cardiaque au cours du développement de la physiopathologie du hamster Syrien. En, effet, dans notre étude, les animaux cardiomyopathiques qui recevaient le placebo ont eu une espérance de vie supérieure à ceux traités avec le losartan. De même, l'hypertrophie ventriculaire était moins importante chez les hamsters qui recevaient le placebo

lorsqu'ils étaient comparés aux animaux traités avec le losartan (100 mg/kg/jour). Si des effets délétères sont observés suite au blocage chronique du récepteur AT₁, il demeure donc possible qu'il contribue au développement de la pathologie ou que l'angiotensine II, par son effet inotrope, soit essentielle au maintien de la fonction cardiaque chez des animaux en défaillance cardiaque.

Bien qu'aucune étude de survie chez le hamster cardiomyopathique n'ait été effectuée auparavant, des études ont déjà rapporté des effets cardioprotecteurs dans d'autres modèles expérimentaux d'hypertrophie ou de défaillance cardiaque suite à l'administration d'antagonistes du récepteur AT₁. Chez le rat avec infarctus du myocarde induit par la ligature d'une artère coronaire, une amélioration des variables hémodynamiques et de la fonction cardiaque, une réduction du remodelage ventriculaire et une augmentation de la survie ont été observées (Dixon et coll., 1997; Liu et coll., 1997; Milavetz et coll., 1996; Schieffer et coll., 1994; Timmermans et coll., 1993). Chez des rats spontanément hypertendus (Nunez et al. 1997) ou en défaillance cardiaque induite par une fistule aorto-cavale (Qing et al, 1992; Nishikimi et al. 1995; Ruzicka et al. 1994), une régression de l'hypertrophie ainsi qu'une amélioration des paramètres hémodynamiques et/ou de la fonction cardiaque ont été notées. Puisque les effets de l'angiotensine II au niveau du système cardiovasculaire sont nombreux et complexes, il est difficile d'expliquer sur le plan physiopathologique les différences entre nos données et celles de la littérature. L'explication peut cependant résider en partie dans les différences entre les modèles utilisés ainsi que dans la conception des protocoles expérimentaux.

1.2 Modèle expérimental de défaillance cardiaque

Plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés afin d'étudier la physiopathologie de la défaillance cardiaque tels que la surcharge volémique induite par une altération de la valve aortique ou une fistule aortocavale, l'augmentation de la pression systémique induite par la constriction de l'aorte, l'infarctus du myocarde provoqué par la ligature d'une artère coronaire et l'entraînement électrique rapide du coeur. Comparativement à la cardiomyopathie génétique progressive, l'utilisation de modèles où l'hypertrophie cardiaque se développe suite à une intervention chirurgicale agressive introduit des différences importantes dans le décours vers la défaillance cardiaque, comme par exemple une surcharge pressive importante. Les bénéfices obtenus par le blocage du récepteur AT₁ ou par l'inhibition de l'ECA dans plusieurs modèles avec surcharge pressive étaient accompagnés d'une

amélioration significative des paramètres hémodynamiques (Qing et coll, 1992; Nishikimi et coll. 1995; Nunez et coll. 1997). Il est difficile d'exclure la contribution de ces paramètres dans les bénéfices observés. Dans des modèles de défaillance cardiaque sans surcharge pressive (Mc Donald et coll. 1994; Ruzicka et coll. 1994), l'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur AT_1 n'a pas prévenu ou entraîné de régression de l'hypertrophie cardiaque alors que l'inhibition de l'ECA a eu des effets positifs. En accord avec ceci, chez le rat avec une défaillance induite par une sténose aortique où donc avec une surcharge pressive est maintenue, l'administration d'un antagoniste du récepteur AT_1 n'a pas modifié l'hypertrophie ventriculaire (Weinberg et coll., 1994). Par ailleurs, une étude récente montre que l'hypertrophie cardiaque induite par surcharge pressive est observée chez des souris où le gène du récepteur AT_{1a} a été supprimé (Harada et coll., 1998).

Notons également que notre modèle expérimental présente une caractéristique importante, qui est celle de l'absence du récepteur AT_2 cardiaque à l'âge adulte. En se basant sur les effets actuellement connus du récepteur AT_2 comme l'inhibition de la croissance cellulaire et l'induction d'apoptose, il est possible que ce récepteur ait contribué dans d'autres modèles expérimentaux aux effets observés sur le remodelage et/ou la fonction cardiaque expliquant ainsi la variabilité dans les réponses pharmacologiques en fonction du modèle étudié.

1.3 Choix et initiation de la thérapie

Parmi les possibilités qui peuvent expliquer les divergences de résultats se trouve le choix des antagonistes administrés qui ont souvent des propriétés pharmacologiques différentes. Dans notre étude, le choix du quinapril était justifié par sa grande liposolubilité permettant théoriquement une inhibition supérieure de la formation d'angiotensine II tissulaire (Jackson et coll., 1996).

Le moment où la thérapie est débutée par rapport à l'apparition des lésions myocardiques peut certainement générer des différences dans les réponses pharmacologiques obtenues. Ainsi, lorsque nos résultats sont comparés à ceux de Haleen et coll. (1991), nous constatons que les hamsters traités avec le quinapril dans notre étude avaient une espérance de vie supérieure. Dans l'étude de nos collègues, l'intervention pharmacologique a été initiée lorsque les lésions de nécrose et l'hypertrophie cardiaque étaient présentes et lorsque la détérioration de la performance ventriculaire était mesurable.

Dans notre projet, le traitement a débuté à 50 jours d'âge c'est-à-dire avant même que les lésions histologiques cardiaques ne soient détectables. En dépit d'objectifs initiaux différents et pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent qu'une intervention précoce sur l'ECA conduit à des bénéfices supérieurs.

1.4 Voie AT₁-dépendante et AT₁-indépendante

Les résultats de notre étude suggèrent que la cardiomyopathie du hamster Syrien se développe sans les effets de l'angiotensine II via son récepteur AT₁ cardiaque. En accord avec cette possibilité, une étude récente rapporte une hypertrophie cardiaque, induite par surcharge pressive, chez des souris où le gène du récepteur AT_{1a} est supprimé (Hamada et coll., 1998). Ces auteurs suggèrent que l'hypertrophie cardiaque se développe via une voie AT₁-dépendante et/ou une voie AT₁-indépendante, la voie AT₁-indépendante substituant la voie AT₁-dépendante lorsque celle-ci est bloquée ou supprimée. Les facteurs impliqués de la voie AT₁-indépendante ne sont pas identifiés. Le système sympathique ainsi que des facteurs neurohumoraux notamment l'endothéline-I sont néanmoins des candidats hautement probables. Comme l'angiotensine II, l'endothéline I est un peptide vasoconstricteur qui, *in vitro*, stimule la croissance des fibroblastes (Takuwa et coll., 1989; Yanagisawa et coll., 1988). Elle induit l'hypertrophie des cardiomyocytes et elle est associée à l'activation de gènes musculaires spécifiques telles la troponine I, l'actine α -sarcomérique et la myosine à chaînes légères de type 2 (Ito et coll., 1991). L'ARN messager de l'endothéline-1 est de plus présent dans le myocarde et l'endothéline-1 peut être sécrétée par des cardiomyocytes en culture (Ito et coll., 1993; Sakurai et coll., 1991). Le rôle de l'endothéline-1 dans les désordres cardiovasculaires n'est pas encore établi. Néanmoins, il est possible que le blocage du récepteur AT₁ émette des signaux de sécrétion de facteurs neurohumoraux qui prendraient alors la relève du système rénine-angiotensine dans le développement de la cardiomyopathie du hamster. Bien que purement hypothétique, cette proposition est tout à fait en accord avec les résultats inattendus que nous avons obtenus.

2.0 Concentrations cardiaques d'angiotensine II et densité du récepteur AT₁ suite à une inhibition chronique du système rénine-angiotensine chez le hamster cardiomyopathique.

2.1 Problématique

Nous avons observé que le blocage chronique (~ 450 jours) du récepteur AT₁ par le losartan (100 mg/kg/jour) est associé à une augmentation de l'hypertrophie cardiaque ainsi qu'à une diminution significative de la durée de vie des animaux cardiomyopathiques alors que l'inhibition de l'ECA par le quinapril a des effets inverses. L'objectif de cette seconde étude était d'évaluer d'avantage l'implication du récepteur AT₁ cardiaque dans le développement de l'hypertrophie ventriculaire dans notre modèle. Les concentrations cardiaques d'angiotensine II et la densité du récepteur AT₁ cardiaque ont donc été évaluées suite au blocage chronique du récepteur AT₁ ou à l'inhibition de l'ECA. Le traitement au losartan a entraîné une diminution de la densité du récepteur AT₁ alors qu'elle n'était pas modifiée par le traitement au quinapril. L'administration du losartan et du quinapril était reliée à une diminution importante des concentrations cardiaques d'angiotensine II. Le fait que le traitement au losartan ait été associé à une réduction des concentrations cardiaques d'angiotensine II, à une diminution de la densité du récepteur AT₁ cardiaque et à une augmentation de l'hypertrophie cardiaque, suggère que le peptide et son récepteur AT₁ cardiaque ne sont pas directement impliqués dans le processus de remodelage chez le hamster cardiomyopathique. Ces résultats appuient les premières conclusions émises suite aux résultats obtenus dans l'étude de survie. Finalement, en accord avec de récentes études, il est de plus intéressant de souligner que nos résultats puissent être compatibles avec l'existence d'une activité agoniste inverse du losartan.

2.2 Angiotensine II cardiaque

Selon des données de la littérature, l'administration chronique des antagonistes du récepteur AT₁ augmente la sécrétion de rénine et ainsi, la formation d'angiotensine II plasmatique et tissulaire (Campbell, 1996). Les résultats de notre seconde étude montrent toutefois que l'angiotensine II cardiaque n'est pas détectable chez les hamsters cardiomyopathiques suite à l'administration chronique du losartan. Les différences entre nos données et celles de la littérature pourraient s'expliquer: 1) par un niveau d'activité du système rénine-angiotensine cardiaque, lors de la détermination des concentrations, i.e. avant le stade de décompensation, non comparable à celui du système rénine-angiotensine circulant; 2) par une sensibilité différente du tissu cardiaque par rapport à d'autres organes ou tissus (rein, poumon, etc...) suite à une intervention pharmacologique prolongée (490 jours). Des données expérimentales supportent par ailleurs l'existence d'une

dissociation entre les niveaux d'angiotensine II plasmatiques et tissulaires lors d'interventions sur le système rénine-angiotensine. Dans ce sens, Mizuno et coll. (1994) montrent chez des rats spontanément hypertendus que l'administration de TCV-116, un antagoniste spécifique du récepteur AT₁, entraîne une inhibition complète de la synthèse cardiaque d'angiotensine II alors que les niveaux plasmatiques sont augmentés.

Il est important de souligner que la diminution des concentrations d'angiotensine II cardiaque suite à l'inhibition chronique de l'ECA est observée malgré que la chymase soit présente dans le coeur de hamster cardiomyopathique et qu'elle constitue une voie de conversion de l'angiotensine II indépendante de l'ECA. En effet, le groupe de Shiota (1997, 1998) rapporte, aux stades de fibrose, d'hypertrophie et de défaillance cardiaque, une augmentation de l'ARN messager de la chymase dans le coeur de hamster cardiomyopathique. Nos données suggèrent que cette dernière ne joue toutefois pas un rôle majeur dans la formation d'angiotensine II cardiaque et que son influence dans le développement de la cardiomyopathie n'est pas significatif.

3.0 Apoptose myocytaire et cardiomyopathie du hamster Syrien

Plusieurs indices suggèrent que l'apoptose intervient au cours du développement de la cardiomyopathie du hamster Syrien. Premièrement, il est clairement établi qu'il y a des augmentations de Ca²⁺ intracellulaire dans les cellules cardiomyopathiques (Dhalla et coll., 1994). Sachant que des élévations de Ca²⁺ intracellulaire peuvent induire l'apoptose (Cigola et coll, 1997), le processus apoptotique pourrait donc hypothétiquement être impliqué dans le développement de cette pathologie. Deuxièmement, la protéine *c-myc* est présente et elle est augmentée dans les ventricules du hamster cardiomyopathique dans les phases de fibrose, d'hypertrophie et de dilatation (Fujitani et coll., 1996). Bien que cette protéine régule la croissance et la prolifération cellulaires et qu'elle soit une candidate potentielle impliquée dans le mécanisme de l'hypertrophie, elle semble intervenir également dans le processus apoptotique. Troisièmement, de nombreux facteurs neurohumoraux tels l'angiotensine II, les cathécolamines et l'ANP possèdent une influence sur l'induction d'apoptose et leurs niveaux plasmatiques et/ou tissulaires sont augmentés chez le hamster cardiomyopathique. Finalement, de nombreuses études rapportent la présence d'apoptose dans des désordres cardiovasculaires expérimentaux et chez l'humain, spécifiquement dans les modèles d'hypertrophie

et de défaillance cardiaque chronique. L'objectif de notre troisième étude était de déterminer si le processus apoptotique est présent dans les ventricules du hamster cardiomyopathique. Le marquage immunohistochimique "TUNEL" a permis la détection d'un nombre significatif de noyaux marqués chez les hamsters cardiomyopathiques âgés de 175 et 350 jours. Le marquage à l'actine α -sarcomérique a de plus révélé que les manifestations apoptotiques affectaient les cellules myocytaires (4% des cellules marquées étaient d'origine myocytaire) et les cellules non-myocytaires. Afin de confirmer ces observations, des caractéristiques ultrastructurales de l'apoptose telle la condensation de la chromatine, ont été identifiées par microscopie électronique. Nous concluons que l'apoptose est impliquée, tout comme la nécrose, dans la perte myocytaire suggérant ainsi sa contribution au développement de l'hypertrophie et de la défaillance cardiaque chez le hamster cardiomyopathique.

Bien que des manifestations apoptotiques ainsi que des caractéristiques ultrastructurales de l'apoptose aient été observées respectivement par la technique "TUNEL" et par microscopie électronique, une des limites de notre étude est l'absence de confirmation quantitative par d'autres méthodes telles la microscopie par fluorescence après coloration de la chromatine (Pollman et coll, 1996), ou la dégradation de l'ADN visible par gel d'électrophorèse. Les résultats que nous avons obtenus avec cette dernière méthode étaient négatifs fort probablement en raison de la faible quantité de cellules apoptotiques. Dans ce contexte, l'ajout de radionucléotide marqué (^{32}P -CTP) aurait possiblement permis la détection de l'ADN fragmenté confirmant ainsi nos observations qualitatives. Finalement, la détection des protéines impliquées dans le processus apoptotique telles p53, bcl-2, bax, l'antigène Fas aurait permis d'évaluer leur participation dans ce processus chez le hamster cardiomyopathique.

3.1 Importance du système rénine-angiotensine et des récepteurs AT₁ et AT₂

Bien que nous n'ayons pas étudié la présence du processus apoptotique chez les hamsters cardiomyopathiques suite à l'inhibition de l'ECA et au blocage du récepteur AT₁, il est tentant d'associer l'ampleur de ce phénomène à l'influence du système rénine-angiotensine et à celle des récepteurs AT₁ et AT₂. En effet, Diez et coll. (1997) rapportent que le niveau d'activité de l'ECA dans les ventricules de rat spontanément hypertendu est associé temporellement avec une augmentation de l'apoptose. De plus, comme déjà rapporté, que l'activation du récepteur AT₁ induit l'apoptose dans les cardiomyocytes (Kajstura et coll., 1997). Les résultats de notre étude de survie

suggère que le blocage du récepteur AT_1 ainsi que la normalisation de la densité dans les ventricules seraient reliés à une diminution du processus apoptotique. Le développement accru de l'hypertrophie ventriculaire chez les animaux traités au losartan supporte cette hypothèse. De plus, chez les hamsters cardiomyopathiques, le traitement au quinapril diminue l'hypertrophie ventriculaire alors que la densité du récepteur AT_1 n'est pas modifiée toujours en accord avec cette hypothèse. Une étude récente a montré chez des rats spontanément hypertendus, qu'un traitement chronique au losartan diminue la susceptibilité à l'apoptose puisqu'une diminution de l'index apoptotique et du ratio Bcl-2/Bax étaient observés (Fortuno et coll., 1997). Ces auteurs rapportent toutefois une diminution de la pression systolique ainsi qu'une normalisation de l'hypertrophie cardiaque.

Il est également possible de spéculer sur le rôle du récepteur AT_2 auquel est attribuées une inhibition de la croissance cellulaire et une activation de l'apoptose. Il a été proposé que l'inhibition de la croissance cellulaire par le récepteur AT_2 est liée, comme dans le cas de la bradykinine, à l'augmentation intracellulaire du GMPc via le monoxyde d'azote (Liu et coll., 1997). L'accumulation du contenu en GMPc contribuerait à l'inhibition de protéines kinases, potentiellement responsables de la modulation de la synthèse protéique (Matsuoka et coll., 1996). Dans ce contexte, il est vraisemblable que l'effet négatif du losartan sur l'hypertrophie ventriculaire s'explique par l'absence du récepteur AT_2 dans notre modèle.

4.0 Discussion générale

4.1 Implication en pathologie humaine

Dans la défaillance cardiaque humaine, les inhibiteurs de l'ECA améliorent la fonction cardiaque et ils diminuent la mortalité des patients (CONSENSUS, 1987; SOLV, 1992; AIRE 1993; SAVE, 1992). Malgré ces effets bénéfiques, la mortalité imputable à la défaillance cardiaque demeure élevée, soit presque 50% des patients sur une période de 4 ans.

L'inhibition de l'ECA et le blocage du récepteur AT_1 ont des profils thérapeutiques différents. Ainsi, dans une perspective clinique, les antagonistes du récepteur AT_1 représentent une stratégie importante compte tenu de l'inhibition spécifique et possiblement complète du récepteur. Jusqu'à présent, les données cliniques montrent que les antagonistes du récepteur AT_1 et plus particulièrement le losartan,

sont bien tolérés et qu'ils possèdent une efficacité hémodynamique similaire à celle obtenue avec les inhibiteurs de l'ECA. Les études cliniques visant à évaluer l'efficacité et l'innocuité à long terme des antagonistes du récepteur AT_1 dans la défaillance cardiaque ne sont cependant pas encore disponibles. Les résultats d'une récente étude, ELITE (Pitt et coll., 1997) ont montré une diminution de la mortalité chez des patients défaillants cardiaques traités avec le losartan lorsqu'ils étaient comparés à ceux qui recevaient du captopril. Il faut cependant noter qu'une limite importante de cette étude est que son objectif primaire était de comparer l'innocuité des traitements notamment l'incidence de dysfonctionnement rénal et non d'évaluer la mortalité. Mentionnons de plus que la diminution de la mortalité était attribuable à une réduction de la mort subite vraisemblablement liée à des arythmies et non à une diminution de la mortalité par défaillance cardiaque progressive. Il est donc périlleux de comparer les résultats de notre étude à ceux d'ELITE.

L'extrapolation de nos résultats à la situation clinique est possiblement limitée par un profil d'expression des récepteurs à l'angiotensine II différent chez l'humain et chez le hamster. Dans le myocarde humain sain, les récepteurs AT_1 et AT_2 sont présents dans une proportion AT_1/AT_2 de 3:1. Chez les patients atteints de défaillance cardiaque, il y a une diminution sélective du récepteur AT_1 alors que le niveau d'expression du récepteur AT_2 est inchangé (Haywood et coll., 1997). Par ailleurs, chez le hamster cardiomyopathique, le récepteur AT_1 est surexprimé dans le myocarde à tous les stades du développement de la pathologie (30 à 350 jours d'âge tout au moins) et il n'y a pas de récepteur AT_2 cardiaque (Lambert et coll., 1995). L'importance de ces différences d'expression demeure toutefois incertaine et le rôle physiologique du récepteur AT_2 de même que son implication dans la physiopathologie de la défaillance expérimentale ou clinique sont à être établis.

Nous croyons néanmoins que dans des conditions cliniques chroniques sans surcharge de pression, les antagonistes du récepteur AT_1 ne seront pas aussi efficaces que les inhibiteurs de l'ECA dans la prévention de l'hypertrophie cardiaque et peut-être même de la mortalité par défaillance progressive. Les bénéfices obtenus avec l'inhibition de l'ECA dans notre modèle expérimental indiquent que l'administration de ces agents constitue le choix le plus sécuritaire et ce jusqu'à ce que les résultats d'étude à long terme chez des patients en défaillance cardiaque traités avec un antagoniste spécifique du récepteur AT_1 soient connus. Mentionnons enfin que des investigateurs explorent présentement

la possibilité d'effets additifs ou synergiques d'un traitement alliant les deux types de médicaments. Cette stratégie pourrait vraisemblablement s'avérer être une intervention clinique plus efficace dans la prévention de la mort subite ainsi que dans la régression du remodelage ventriculaire.

4.2 Projets futurs

Suite à nos études, plusieurs projets de recherche pourraient être réalisés. Il serait entre autre intéressant d'étudier le mécanisme par lequel l'inhibition de l'ECA par le quinapril diminue l'hypertrophie ventriculaire et augmente la durée de vie. Ceci permettrait possiblement de déterminer le rôle et l'importance des kinines endogènes chez le hamster cardiomyopathique. Pour ce faire, l'étude devrait évaluer les effets à long terme chez un premier groupe de hamsters traités avec le quinapril et chez un second groupe traité avec du quinapril et un antagoniste spécifique des récepteurs B_1/B_2 à la bradykinine.

Pour ce qui est du rôle du récepteur AT_2 , des études dans des cellules ou des organes isolés avec des antagonistes spécifiques permettraient une meilleure compréhension de ses fonctions physiologiques et de ses mécanismes d'action. Des études dans des modèles expérimentaux et chez l'humain où le récepteur AT_2 est exprimé préciseraient ses implications physiopathologiques. Ces études pourraient déterminer si l'influence antiproliférative et/ou pro-apoptotique de ce récepteur est réelle.

La détection et la quantification de l'apoptose dans le coeur de hamster cardiomyopathique ayant reçu des inhibiteurs du système rénine-angiotensine, notamment le losartan et le quinapril, pourraient être réalisées afin de déterminer la susceptibilité des cardiomyocytes au processus apoptotique suite à ces traitements. Dans ce contexte, le rôle du récepteur AT_1 pourrait être également étudié. Pour ce faire, la technique de dissociation enzymatique pour isoler les myocytes de hamsters témoins consanguins et cardiomyopathiques pourrait être utilisée. La détection de l'apoptose dans des myocytes isolés, par microscopie électronique, permettrait plus particulièrement d'évaluer la susceptibilité des cardiomyocytes au processus apoptotique comparée à celle des cellules saines. Les études utilisant des myocytes isolés pourraient également être réalisées chez des hamsters cardiomyopathiques âgés de 0 à 50 jours permettant ainsi d'évaluer la contribution de la surexpression du récepteur AT_1 dans

l'initiation et l'évolution de l'apoptose.

Le système rénine-angiotensine possède des effets nombreux et complexes dans l'ensemble du système cardiovasculaire. Il semble de plus participer au développement et/ou au maintien de la cardiomyopathie du hamster Syrien. Ses effets précis dans le myocarde et les tissus extracardiaques sont encore mal connus. Bien que le hamster cardiomyopathique soit un modèle abondamment utilisé, les mécanismes primaires responsables des lésions dégénératives ainsi que l'importance des mécanismes compensatoires ne sont pas encore totalement élucidés. Des recherches soutenues utilisant ce modèle expérimental de défaillance cardiaque conduiront certainement à une meilleure compréhension de la pathologie clinique ainsi qu'au développement de nouvelles approches pharmacologiques.

BIBLIOGRAPHIE

Aceto JF, Baker KM. [Sar¹] Angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells. *Am J Physiol*. 1990. 258:H806-H808.

The AIRE investigators. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivor of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The acute infarction Ramipril Efficacy (AIRE). *Lancet* 1993;342:1104-1107.

Al-Merani SA, Brocks DP, Chapman BJ, Munday KA. The half-lives of angiotensin II, angiotensin II-amide, Sar¹-Ala⁸-angiotensin II and renin in the circulatory system of the rat. *J Physiol*. 1978;278:471.

Allen IS, Cohen NM, Dhalla RS, Gaa ST, Lederer WJ, Rogers TB Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into the underlying biochemical mechanism. *Cir Res*. 1988;62:524-534.

Allo SN, Carl LL, Morgan He. Acceleration of growth of cultured cardiomyocytes and translocation of protein kinase C. *Am J Physiol*. 1992. 263:C319-C325.

Asano K, Dutcher DL, Port JD, Minobe WA, Tremmel KD, Roden RL, Bohlmeier TJ, Bush EW, Jenkin MJ, Abraham WT, Reynolds MV, Zisman LS, Perryman BM, Bristow MR. Selective downregulation of the angiotensin II AT₁-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation*. 1997;95:1193-1200.

Askews DS, Ashmun RA, Simmonds BC, Cleveland JL. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*. 1991;6:1915-1922.

Azaki T, Shimizu M, Sugihara N, Yoshio H, Ino H, Takeda N, Dhalla NS (eds) In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic heart*. New York. Raven Press. 1994;137-143.

Bachetti T, Cordi A, Giordano A, Ferrari R. Tumor necrosis factor-alpha in chronic heart failure. In Singal PK, Dixon IMC, Beamish RE, Dhalla SN (eds). *Mechanisms of heart failure*.

Kluwer Academic Publisher. Boston. 1995:3-8.

Bajusz E. Hereditary cardiomyopathy: A new disease model. *Am Heart J.* 1969;77:686-696.

Baker KM. Cardiac action of angiotensin II *J. Vasc. Med Biol.* 1991;3:31-37.

Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells *Am J Physiol* 1990;259:H610-H618.

Baker KM, Singer HA: Identification and characterization of guinea pig angiotensin II ventricular and atrial receptors: Coupling to inositol phosphate production. *Circ Res.* 1988; 62:896-904.

Barry M, Reynolds J, Eastman A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.* 1993;53:2349-2357.

Beaulieu M, Brakier-Gingras L, Bouvier M. Upregulation of α_{1a} and α_{1b} -adrenergic receptor mRNAs in the heart of cardiomyopathic hamsters. *J Moll Cell Cardiol.* 1997;29:111-119.

Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res.* 1995;77:1136-1142.

Bernier SG, Bellemare JM, Escher E, Guillemette G. Characterization of AT4 receptor from bovine aortic endothelium with photosensitive analogues of angiotensin IV. *Biochemistry.* 1998;37:4280-4287.

Bhambi B, Eghbali M. Effect of norepinephrine on myocardial gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment. *Am J Pathol.* 1991;139:1131-1142.

Binder C, Hiddeman W. Programmed cell death - many questions still to be answered. *Ann of Hematol.* 1994;69:45-55.

- Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996;28:635-640.
- Borg TK, Jonhson LD, Lill PH. Specific attachment of collagen to cardiac myocytes: in vivo and in vitro. *Dev Biol*. 1983;97:417-423.
- Briand SI, Bellemare JM, Bernier SG, Guillemette G. Study on the functionality and molecular properties of the AT₄ receptor. *Endocr Res*. 1998;24:315-323.
- Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur Heart Journal*. 1994;15:45-52.
- Brink AL, Lochner A. Contractility and tension development of the myopathic hamster (BIO 14.6) heart. *Cardiovasc Res*. 1969;3:453-458.
- Brömme JH, Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why ? *Mol Cell Biochem*. 1996;163/164:261-275.
- Brooks DP, Ruffolo RR Jr. Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. In Ruffolo RR Jr. ed. *Angiotensin II receptors*. (vol.1) Boca Raton: CRC Press. 1994:71-87.
- Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders I, Kromer EP, Riegger GA, Schunkert H. Blockade of the renin angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension* 1995;25:250-259.
- Campbell JD. Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor type 1 antagonist. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;supp3:S125-S131.
- Cahill PR, Redmond EM, Foster C, Sitzman JV. Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1995;288:219-229.
- Chassagne C, Servant MJ, Meloche S. Récepteurs de l'angiotensine II: rôles dans le contrôle

de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal. *Med. Sci.* 1996;12:1351-1360.

Chemla D, Scalbert E, Desché P, Lecarpentier Y. La cardiomyopathie du hamster Syrien: aspects physiopathologiques et thérapeutiques. *Arch Mal Coeur.* 1991; 84:85-87.

Cheng CP, Suzuki M, Ohte N, Ohno M, Wang ZM, Little WC. Altered ventricular and myocyte response to angiotensin II in pacing induced heart failure. *Circ Res.* 1996;78:880-892.

Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Research.* 1997;231:363-371.

Cohen-Gould L, Robinson TF, Factor SM. Intrinsic connective tissue abnormalities in the heart muscle of cardiomyopathic Syrian hamster. *Am J Pathol.* 1987;127:327-334.

Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S, Franciosa JA, Harston WE, Tristani FE, Dunkman WB, Jacobs W, Francis GS, Flohr KH, Goldman S, Cobb FR, Shah PM, Saunders R, Fletcher RD, Loeb HS, Hughes VC, Baker B. Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure: results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med.* 1986 ;314 :1547-1552.

Coleman JKM, Krebs LT, Hamilton TA, Ong B, Lawrence KA, Sardinia MF, Harding JW, Wright JW. Autoradiographic identification of kidney angiotensin binding sites and angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats. *Peptides.* 1998;19:269-277.

Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci Ws. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation.* 1998;98:1329-1334.

The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study. *N Engl J Med.* 1987;316:1429-1435.

Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1029-1034.

Dansel AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system. *Heart*. 1996;73:28-32.

Dargie HJ, McAlpine HM, Morton JJ. Neuroendocrine activation in acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;9:S21-S24.

Desoize B, Sen S. L'apoptose ou mort cellulaire programmée: concepts, mécanismes et apport en cancérologie. *Bull Cancer*. 1992;79:413-425.

Desoize B. Apoptose et mort cellulaire programmée. *Bull Cancer*. 1995;82:70-76.

Dhalla NS, Lee SL, Shah KR, Elimban V, Susuki S, Jasmin G. Behaviour of subcellular organelles during the development of congestive heart failure in cardiomyopathic hamsters (UM-X7.1). In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;1-14.

Dimmerler S, Rippmann V, Welland U, Haendeler J, Zelher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effects of nitric oxide. *Circ Res*. 1997;81:970-976.

Dickstein K, Gottlieb SS, Fleck E, Kostis J, Levine B, DeKock M, LeJemtel T. Hemodynamic and neurohumoral effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with heart failure. *J Hypertension*. 1994;12(2):S31-S35.

Dimitrov Y, Muller S, Hannedouche T. Effets rénaux des antagonistes du récepteur AT₁ de l'angiotensine (AT1ra). *La Presse Médicale*. 1997;26:1981-1986.

Dixon IMC, Ju H, Reid NL, Scammell-La Fleur T, Werner JP, Jasmin G. Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic hamster and the effect of losartan. *J Mol Cell Cardiol*

1997;29:1837-1850.

Dostal DE, Baker KM. Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends Cardiovasc Med.* 1993;3:67-74.

Dostal DE, Baker KM. Angiotensin II stimulation of the left ventricular hypertrophy in the adult rat heart: mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* 1992;5:276-280.

Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acid in rat and mouse tissues. *Endocrinology.* 1987;120:2334-2338.

Dzau VJ. Autocrine and paracrine mechanisms in the pathophysiology of heart failure. *Am J Cardiol.* 1992;70:4C-11C.

Dzau VJ, Colucci WS, Hollenberg NK, Williams GH. Relation of renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation.* 1981;63:645-651.

Edwards RM, Ruffolo RR Jr. Angiotensin II receptor subclassification. In Ruffolo RR Jr. ed. *Angiotensin II receptors.* (vol.1) Boca Raton: CRC Press. 1994:11-24.

Ertl G, Alexander RW, Kloner RA. Interactions between coronary occlusion and the renin-angiotensin system in the dog. *Basic Res Cardiol.* 1983;78:518-533.

Factor SM, Minase T, Cho SH, Dominitz R, Sonnenblick EH. Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: a preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation.* 1982;62:342-354.

Farber JL. Biology of disease. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest.* 1982;47:114-123.

Feldman AM, Bristow MR, Parmley WW, Carson PE, Pepine CJ, Gilbert EM, Strobeck JE, Hendrix GH, Powers ER, Bain RP, et al for Vesnarinone Study Group. Effects of vesnarinone

on morbidity and mortality in patients with heart failure. *N Eng J Med* 1993;329:149-155.

Feldman MD, Copelas L, Gwathmey JK, Philipps P, Warren SE, Shoen FJ, Grossman W, Morgan JP. Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation*. 1987;75:331-339.

Ferrario CM, Iyer SN. Angiotensin (1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Reg Pep*. 1998;79:13-18.

Finckh M, Hellmann W, Ganten D, Furtwangler A, Allgeier J, Boltz M, Holtz J. Enhanced cardiac angiotensinogen expression and angiotensin converting enzyme activity in tachypacing-induced heart failure in rats. *Basic Res Cardiol*. 1991;86:303-316.

Finkel MS, Marks ES, Patterson RE, Speir EH, Steadman KA, Keiser HR. Correlation of changes in cardiac calcium channels with hemodynamics in Syrian hamster cardiomyopathy and heart failure. *Life Sci*. 1987;41:153-159.

Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*. 1996;79:949-956.

Ford WR, Clanachan AS, Jugdutt BI. Opposite effects of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor antagonists on recovery of mechanical function after ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Circulation* 1996;94:3087-3089.

Fortuno MR, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT₁ blockade with losartan. *Hypertension*. 1998;32:280-286.

Francis GS, Mc Donald K.M. Neurohumoral mechanisms in heart failure. In Singal PK, Dixon IMC, Beamish RE, Dhalla SN (eds). *Mechanisms of heart failure*. Kluwer Academic Publisher. Boston. 1995:96-116.

Francis M. The neurohumoral hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:248-254.

Freer RJ, Pappano AJ, Peach MJ, Bing KT, McLean MJ, Vogel S, Sperelakis N. Mechanism for the positive inotropic effect of angiotensin II on isolated cardiac muscle. *Circ Res*. 1976;39:178-183.

Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin (1-7) inhibits vascular smooth muscle cells growth. *Hypertension*. 1996;28:104-108.

Freeman EJ, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensins differentially active phospholipase D in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertension*. 1995;8:1105-1111.

Fujitani N, Kawaguchi N, Toda S, Matsumura S, Kimura H, Onishi S. Immunocytochemical detection of enhanced expression of c-myc protein in the heart of cardiomyopathic hamster. *Mol Cell Biochem*. 1997;169:73-78.

Garg R, Gorlin R, Smith T, Yusuf S. For the digitalis investigation group. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1997; 336:525-533.

Garg R, Yusuf S for the Collaborative Group on ACE inhibitor Trial. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. *J Am Med Assoc*. 1995;273:1450-1456.

Gavras H, Kremer D, Brown JJ, Gray B, Lever AF, Mac Adam RF, Medina A, Morton JJ, Robertson JJ. Angiotensin- and norepinephrine-induced myocardial lesions: experimental and clinical studies in rabbits and man. *Am Heart J*. 1975;89:321-332.

Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy not hyperplasia of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 1988;62:749-756.

Goldstein P, Ojcius Dm, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev.* 1991;121:26-65.

Gottlieb SS, Dickstein K, Fleck E, Kostis J, Levine TB, LeJemtel T, De Kock M. Hemodynamic and neurohumoral effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1993;88:1602-1609.

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994; 94:1621-1628.

Gunther S, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature.* 1980;287;230-232.

Haleen SJ, Weishaar RE, Overhiser RW, Bousley RF, Keiser JA, Rapundalo SR, Taylor DG. Effect of quinapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor, on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster. Hemodynamics, morphological, and biochemical correlates. *Circ Res.* 1991;68:1302-1312.

Hamada H, Hakamata I, Ohsuzu F, Nakamura H. Age-related effects of norepinehrine on rat ventricular hypertrophy. *Jpn Heart Journal.* 1997;38:433-443.

Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995;26:642-648.

Hanatani A, Yoshiyama M, Kim S, Omura T, Toda I, Akioka K, Teragaki M, Takeuchi K, Iwao H, Takeda T. Inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist of cardiac phenotype modulation after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:1905-1914.

Hanton G, Barnes P, Shepperson NB, Walley R. Effects of hydrochlorothiazide and captopril on the survival and heart weight of cardiomyopathic hamsters. *Res Com Chem Pathol and Pharmacol.* 1993; 81:159-166.

Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H,

Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation*. 1998;97:1952-1959.

Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *J Biol Chem*. 1996;271:21985-21992.

Haywood GA, Gullestad L, Katsuya T, Hutchinson HG, Pratt RE, Moriuchi M, Fowler MB. AT₁ and AT₂ angiotensin receptor gene expression in human heart failure. *Circulation*. 1997;95:1201-1206.

Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*. 1995;377:744-747.

Hirsch AT, Muellerleile M, Dzau VJ. Cardiovascular tissue angiotensin systems: activation and actions in heart failure. In McCall D, Rahimtoola SH (eds.). *Heart failure* 1995;117-134.

Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res*. 1991;69:475-482.

Hodge RL, Ng KK, Vane JR. Disappearance of angiotensin from the circulation of the dog. *Nature*. 1967;215:138-141.

Hodsman GP, Kohzuki M, Howes LG, Sumithran E, Tsunoda K, Johnson CI. Neurohumoral responses to chronic myocardial infarction in rats. *Circulation*. 1988;78:376-381.

Homcy, CJ, Vatner SF, Vatner DE. β -adrenergic receptor regulation in the heart in pathophysiological states: Abnormal adrenergic responsiveness in cardiac disease. *Annu Rev Physiol*. 1991;53:137-159.

Hunt RA, Ciuffo GM, Saavedra JM, Tucker DC. Sympathetic innervation modulates the expression of angiotensin II receptors in embryonic rat heart grafted *in Oculo*. 1995. *J Mol Cell Cardiol*. 27:2445-2452.

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, OKuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Miimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin I type-2 receptor. *Nature*. 1995;377:748-750.

Ikegaya T, Kobayashi A, Hough RB, Masuda H, Kanedo M, Yamazaki N. Stimulatory guanine-nucleotide binding protein and adenylate cyclase activities in BIO 14.6 cardiomyopathic hamsters at the hypertrophy stage. *Mol Cell Biochem*. 1992;110:83-90.

Inagami T, Mizukoshi M, Guo DF. Angiotensin II receptor: molecular cloning, function, and regulation. In Saavedra JM, Timmermans PBMWM eds. *Angiotensin receptors* New York: Plenum Press. 1994:1-15.

Ino T, Nishimoto K, Okubo M, Akimoto K, Yabuta K, Kawai S, Okada R, Sueyoshi N. Apoptosis as a possible cause of wall thinning in end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1997;79:1137-1141.

Isaacs JT. Role of programmed cell death in carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1993;101:27-34.

Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1993;92:398-403.

Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino S, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi R, Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1991;69:209-215.

Iwai N, Inagami T. Regulation of the expression of the rat angiotensin II receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;182:1094-1099.

Iwami K, Ashizawa N, Do YS, Graf K, Hsueh WA. Comparison of Ang II with others growth factor on Egr-1 and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*. 1996;270:H2100-H2107.

Izumo S, Nadal-Gimard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85:339-343.

Jackson EK, Garrison JC. Renin and angiotensin. In Hardman JG, Limbird LE eds. *Goodman & Gilman's, The Pharmacological basis of therapeutics*. New York. Mc Graw Hill. 1996, 733-758.

Jaiswal N, Diz DI, Chapell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Differential regulation of prostaglandin synthesis by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells: subtypes of angiotensin receptors involved. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265:664-673.

James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in human heart from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation*. 1995;90:556-573.

Jasmin G, Proschek L. Comparative effects of calcium antagonist and of inotropic agents on the development of hereditary cardiomyopathy in the hamster. In Bender F, Meesmann W, *Treatment with gallopamil*. Darmstadt: 1989: 13-24.

Jasmin G, Proschek L. Paradoxical effect of isoproterenol on hereditary polymyopathy. *Muscle and Nerve*. 1982;6:408-415.

Jasmin G, Proschek L. Calcium and myocardial cell injury. An appraisal in the cardiomyopathic hamster. *J physiol Pharmacol*. 1984;62:891-898.

Jossefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology*. 1996;88:140-146.

Ju H, Dixon IMC. Cardiac extracellular matrix and its role in the development of heart failure. In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;73-86.

Kabour A, Henegar JR, Janicki JS. Angiotensin II (AII)-induced myocyte necrosis: role of the

AII receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;23:547-553.

Kabour A, Henegar JR, Devineni VR, Janicki JS. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. *Cardiovasc Res.* 1995;29:543-548.

Kagiya T, Hori M, Iwakura K, Iwai K, Watanabe Y, Uchida S, Yoshida H, Kitabatake A, Inoue M, Kamada T. Role of increased α_1 -adrenergic activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Am J Physiol.* 1991;260:H80-H88.

Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res.* 1995;219:110-121.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 1996; 74:86-107.

Kajstura J, Cigola, E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes *In vitro*. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:859-870.

Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;183:1090-1096.

Karliner JS, Alabaster C, Stephens H, Barnes P, Dollery C. Enhanced noradrenaline response in cardiomyopathic hamsters: possible relation to changes in adrenoreceptors studied by radioligand binding. *Cardiovasc Res.* 1981;15:296-304.

Kato M, Takeda N, Takeda A, Ohkubo T, Nagai M, Nagano M. Inhibitory effects of captopril on the onset of cardiomyopathy in cardiomyopathic hamsters. In Korecky B, Dhalla NS (eds) *Subcellular basis of contractile failure*. Kulwer Academic. Boston. 1990;193-208.

Katsung BG, Parmley WW. Cardiac glycosides & others drugs used in congestive heart failure. In Katsung BG (ed). *Basic & Clinical Pharmacology*. Norwalk: Appelton & Lange. 1995;188-229.

Katz, MA. Cardiomyopathy of overload: a major determinant of pronostic in congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1990;322:100-110.

Kawaguchi H, Sano H, Kudo T, Okada H, Kitabatake A. Inositolphosphatides metabolism in the cardiomyopathic hamster. In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;105-114.

Kawaguchi H, Shoki M, Sano H, Kudo T, Sawa H, Okamoto H, Sakata Y, Yasuda H. The studies of cell damaging and cells growth factors wich induce cardiomyopathy. *Jpn Circ J*. 1992;56:1037-1044.

Kelly RA, Smith TW. Pharmacological treatment of heart failure. In Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds) *Goodman and Gilman's. The pharmacological basics of therapeutics*. Mc Graw Hill. New York. 1996;809-838.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-257.

Kessler PD, Cates Ae, Van Dop C, Feldman AM. Decrease bioactivity of the guanine-nucleotide binding protein that stimulate adenylyl cyclase in hearts from cardiomyopathic hasmters. *J Clin Invest*. 1989;84:244-252.

Knape JTA, van Zwieten PA. Positive chronotropic activity of angiotensin II in the pithed normotensive rat is primarily due to activation of cardiac β 1-adrenoreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1988. 338:185-190.

Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S. Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *Eur J Pharmacol*.1978;50:17-25.

Kohlstaedt KG, Helmer OM, Page IH. Activation of renin by blood colloids. *Proc Soc Exp Med.* 1938;39:214.

Kojima M, Shiojima I, Yamazaki T, Komuro I, Zou Z, Wang Y, Mizuno T, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T et al. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation.* 1994;89:2204-2211.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJE, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1996;98:2854-2865.

Kurosawa H, Narita H, Kaburaki M, Yabana H, Doi H, Itogawa E, Okamoto M. Prolongation of life span of cardiomyopathic hamster by the adrenergic β -selective partial agonist denopamine. *Jpn J Pharmacol.* 1996;72:325-333.

Lambert C, Godin D, Fortier P, Nadeau R. Direct effects in vivo of angiotensin I and II on the canine sinus node. *Can J Physiol.* 1991;69:389-392.

Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Upregulation of cardiac angiotensin AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ Res.* 1995;77:1001-1007.

Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358:15-16.

Lanotte M, Riviere J, Hermounet S, Houge G, Vintermyr OK, Gjertsen BT, Doskeland SO. Programmed cell death is induced rapidly and with positive cooperativity by activation of cAMP kinase I in a myeloid leukemia cell line. *J Cell Physiol.* 1991;146:73-80.

Lassègue B, Griendling KK, Alexander RW. Molecular biology of angiotensin II receptors. In Saavedra JM, Timmermans PBMWM eds. *Angiotensin receptors.* New York: Plenum Press. 1994:17-48.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirie GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-

ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994; 371:346-347.

Lee S, Christakos S, Small MB. Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Curr Op Cell Biol*. 1993;5:286-291.

Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cells line by widely diverging stimuli. *Cell Prolif*. 1991; 24:203-214.

Lesch M, Gorlin R, Sonnenblick EH. Myocardial amino acid transport in the isolated rapid right ventricular papillary muscle: general characteristics and effects of passive stretch. *Circ Res*. 1970;27:445-460.

Levine TB, Francis GS, Goldsmith SR, Simon AB, Cohn JN. Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1982;49:1659-1666.

Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Frammingham Heart Study. *Am J Cardiol*. 1987;60:560-565.

Li W, Ye Y, Fu B, Wang J, Yu L, Ichiki T, Inagami T, Ichikawa I, Chen X. Genetic deletion of AT₂ receptor antagonizes angiotensin-II induced apoptosis in fibroblasts of the mouse embryo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:72-76.

Li Z, Bing OL, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transtion to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1997; 41:H2313-2319.

Lilly LS, Pratt RE, Alexander RW, Larson DM, Ellison KE, Gimbrone MA, Dzau VJ. Renin expression by vascular endothelial cells in culture. *Circ Res*. 1984;57:312-318.

Lindpainter K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensinogen system: an appraisal of present

experimental and clinical evidence. *Circ Res*. 1991;68:905-921.

Lindpainter K, Lu W, Niedermayer N, Schieffer B, Just H, Ganten D, Drexler H. Selective activation of cardiac angiotensinogen expression on post-infarction ventricular remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:133-145.

Linz W, Scholkens BA. A specific β_2 -bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol*. 1992;105:771-772.

Linz W, Scholkens BA, Han YF. Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rats hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986;8(suppl. 10):S91-S99.

Linz W, Scholkens BA, Han YF. Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharm*. 1986;8:S91-S99.

Liu YH, Yang XP, Sharov CG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carratero OA. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors angiotensin II type 1 receptor antagonists with heart failure. *J Clin Invest*. 1997;99:1926-1935.

Liu YH, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest*. 1995;73:771-787.

Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Sigmon DH, Sabbah HN, Carratero OA. Paracrine systems in the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Hypertension*. 1996;27:7-13.

Lopez JJ, Lorell BH, Ingerfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁ and AT₂-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts *Am J Physiol*. 1994;267:H844-H852.

Makino N, Masutomo K, Nishimura M, Maruyama T, Yanaga T. Cardiac collagen expression in the development of two types of cardiomyopathic hamsters (Bio 14.6 and Bio 53.58). In

Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;57-64.

Malhotra A. Contractile and regulatory proteins in hamster cardiomyopathy. In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;31-39.

Mansoor AM, Honda M, Kuramochi T, Tanaka K, Morioka S, Takabatake T. Effects of ACE inhibition and beta-blockade on collagen remodelling in the heart of bio 14.6 hamsters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:43-49.

Marcus ML, Harrison DG, Chilian WM, Koyanagi S, Inou T, Tomanek RJ, Martins JB, Eastman CL, Hiratzka LF. Alterations in the coronary circulation in hypertrophied ventricles. *Circulation*. 1987;75(suppl I):I-19-I-25.

Marcus FI. Use of digitalis in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1980;62:17-19.

Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *TIBS*. 1994;19:26-30.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, Imaizumi T. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;27:14-18.

Mc Donald KM, Garr M, Carlyle PF, Francis GS, Hauer K, Hunter DW, Parish T, Stillman A, Cohn JN. Relative effects of α_1 -adrenoreceptor blockade, converting enzyme inhibitor therapy, and angiotensin II subtype receptor blockade on ventricular remodeling in the dog. *Circulation*. 1994;90:3034-3046.

Mc Call D. Epidemiology, etiology and natural history. In Mc Call D, Rahimtoda SH (eds). *Heart failure: current topics in cardiology*. Chapman & Hall. New York. 1995;1-13.

Meggs L, Coupet J, Huang H, Cheng W, Li P, Capasso JM, Homcy CJ, Anversa P. Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocyte after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1993;72:1149-1162.

Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéines de l'apoptose: un

enjeu thérapeutique pour demain ? *Medecine/Sciences*. 1998;14:9-17.

Milavetz JJ, Raya TE, Jonhson CS, Morkin E, Goldman S. Survival after myocardial infarction in rats: captopril versus losartan. *JACC*. 1996;27:714-719.

Minshall RD, Nakamura F, Becker RP, Rabito SF. Characterization of bradikinin B₂ receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res*. 1995;76:773-790.

Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human heart with myocardial infarction. *Circulation*. 1996;94:1506-1512.

Miura M, Shu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell*. 1993;75:653-660.

Mizuno K, Niimura S, Katoh K, Fukuchi S. TVC-116, a newly developed angiotensin II receptor antagonist, induces regression of cardiac hypertrophy through suppression of the tissue renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 1994;54:1987-1994.

Moeller I, Allen AM, Chai SY, Zhuo J, Mendelsohn FAO. Bioactive angiotensin peptides. *J Hum Hypertens*. 1998;12:289-293.

Morgan JP. Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac dysfunction. *N Engl J Med*. 1991;325:625-632.

Mulder P, Devaux B, Richard V, Henry JP, Wimart MC, Thibout E, Macé B, Thuillez C. Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure: effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling. *Circulation* 1997;95:1314-1319.

Naftilan AJ, Zuo WM, Ingelfinger J, Ryan TJ, Pratt RE, Dzau VJ. Localisation and differential

regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest.* 1991;87:1300-1311.

Nahmias C, Strosberg AD. The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal transduction pathways and physiological function. *Trends. Pharmacol Sci.* 1995;16:223-225.

Nakajima M, Hutchison HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:10663-10667.

Nakamura Y, Roke T, Tanaka N, Ohkusa T, Matsuzaki M. Celiprolol, a β -adrenoceptor 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; 31:171-178.

Nakamura F, Nagano M, Kobayashi R, Higaki J, Mikami H, Kawasguchi N, Onishi S, Ogihara T. Effects of an angiotensin-converting inhibitor, cilazapril, on congestive heart failure in cardiomyopathic hamsters. In: Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic heart.* New York. Raven Press Publishers. 1994;145-156.

Narita H, Kaburaki M, Doi H, Ogiku N, yabana H, Kurosawa H, Ohmachi. Prolonging action of imidapril on the lifespan expectancy of cardiomyopathic hamster. *J Cardiovas Pharmacol.* 1996;27:861-871.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw Ban-An. Apoptosis in myocytes in end-stage failure. *N Eng J Med.* 1996;335:1182-1189.

Neyses L, Vetter H. Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:1435-1443.

Nigro V, Okaaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuba 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. *Human Mol Gen* 1997; 6:601-607.

Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest*.1995;95:46-54.

Nishimiki T, Tani T, Ohmura T, Yamagishi H, Yanagi S, Yoshimaya M, Toda I, Teragaki M, Akioka K, Takeuchi K, Takeda T. Angiotensin II type-1 receptor antagonist as well as angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates the development of heart failure in aortocaval fistula rats. *Jpn Circ J*. 1995; 59:754-761.

Nishimiki T, Yamagishi H, Takeuchi K, Takeda T. An angiotensin II receptor antagonist attenuates left ventricular dilatation after myocardial infarction in hypertensive rat. *Cardiovasc Res*. 1995;29:856-861.

Nozawa Y, Miyake H, Haruno A, Yamada S, Uchida S, Ohkura T, Kimura R, Susuki H, Hoshino T. Down-regulation of angiotensin II receptors in hypertrophied human myocardium. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:514-518.

Nunez E, Hosoya K, Susic D, Frohlich ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension*. 1997;29:519-524.

Nunez G, Clarke MF. The bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol*. 1994;4:399-403.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing heart. *N Eng J Med*. 1997; 336:1131-1141.

Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer S. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-619.

Opie L.H. Myocardial contraction and relaxation. In Opie L.H (ed.) *The heart: physiology and metabolism*. Raven Press. 1991:176-194.

Patterson JH, Adams KF. Pathophysiology of heart failure. *Pharmacotherapy*. 1993;13:S73-S81.

Packer M, Colucci WS, Sackner-Bernstein JD, Liang CS, Goldscher DA, Freeman I, Kukin ML, Kinhal V, Udelson JE, Klapholz M, Gottlieb SS, Pearle D, Cody RJ, Gregory JJ, Kantrowitz NE, LeJemtel TH, Young ST, Lukas MA, Shusterman NH. Double-blind, placebo-controlled study of the effects of carvedilol in patients with moderate to severe heart failure.

The PRECISE trial. Prospective Randomized Evaluation of Carvedilol on Symptoms and Exercise. *Circulation*. 1996;94:2793-2799.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*. 1985;72:406-412.

Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, Mallis GI, Sollano JA, Shannon J, Tandon PK, DeMets DL. For the PROMISE Study Research Group. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. *N. Eng. J Med*. 1991;325:1468-1475.

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med*. 1940;71:29-42.

Paquet JL, Bandouin-Legros M, Brunelle G, Meyer P. Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypert*. 1990;8:565-572.

Parodi O, De Maria R, Oltrona L, Testa R, Sambuceti G, Roghi A, Merli M, Belingheri L, Accini R, Spinelli L, Pellegrini A, Baroldi G. Myocardial blood flow distribution in patients with ischemic heart disease or dilated cardiomyopathy undergoing heart transplantation. *Circulation*. 1993;88:509-522.

Patel JM, Martens JR, Li YD, Gelband CH, Raizada MK, Block ER. Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol*. 1998;275:1061-1068.

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of actions. *Physiol Rev*. 1977;57:313-370.

Phillips MI, Speakman EA, Kimura B. Tissue renin-angiotensin systems. In Raizada MK, Phillips MI, Summers C. eds. *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. Boca Raton: CRC Press 1993;97-130.

Piechaczyk M. *Myc*: le paradoxe d'un oncogène induisant la mort cellulaire programmée. *Medecine/Sciences*. 1992;8:586-587.

Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR. Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidneys, and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation*. 1995;92:3105-3012.

Pinsky D, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor β . *J Clin Invest*. 1995;95:677-685.

Pitt B., Segal R., Martinez F.A., Meurers G., Cowley A.J., Thomas I., Deedwania P.C., Ney D.E., Snively D.B., Chang P.I. ELITE. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 1997;349:747-752.

Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*. 1996;79:748-756.

Qing G, Garcia R. Chronic captopril and losartan (DuP753) administration in rats with high-output heart failure. *Am J Physiol*. 1992;263:H833-H840.

Raya TE, Fonkel SJ, Lee RW, Dougherty S, Goldman S, Wang PC, Timmermanns PBMWM, Morkin E. Hemodynamic effects of direct angiotensin II blockade compared to converting enzyme inhibition in rat model of heart failure. *Am J Hypertension*. 1991;4:3345-3405.

Re R, Fallon JT, Dzau VJ, Quay SC, Haber E. Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. *Life Sci*. 1982;30:99-106.

Reiss K, Capasso JM, Huang H, Meggs LG, Li P, Anversa P. Ang II receptors, *c-myc*, and *c-jun* in myocytes after myocardial infarction and ventricular failure. *Am J Physiol*. 1993;264:H760-H769.

Rogg H, Schmid A, de Gasparo M. Identification and characterization of angiotensin II receptor subtypes in rabbit ventricular myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173:416-422.

Rosen MR, Reder RF. Does triggered activity have a role in the genesis of cardiac arrhythmias? *Ann Intern Med*. 1981;94:794-801.

Ruzicka M, Yuan B, Leenen FHH. Effects of enalapril versus losartan on regression of volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation*. 1994;90:484-491.

Saito K, Gutkind JS, Saavedra JM. Angiotensin II binding sites in the conduction system of the rat. *Am J Physiol*. 1987;253:H1618-H1622.

Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan U, Kimura S, Y Mitui, Goto K, Nasaki T. cDNA cloning analysis and tissue distribution of rat pre-proendothelin-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991. 175:44-47.

The SAVE Investigators. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. *N Engl J Med*. 1992;327:669-677.

Sawa H, Tokuchi F, Mochizuki N, Endo Y, Furuta Y, Shinohara T, Takada A, Kawaguchi H,

Yasuda H, Nagashima K. Expression of the angiotensinogen gene and localization of its protein in the human heart. *Circulation*. 1992;86:138-146.

Schelling P, Fisher H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens*. 1991; 9:3-15.

Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodelling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:2273-2282.

Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Cahng KC, Baker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 1993;72:1245-1254.

Sethi R, Takeda N, Nagano M, Dhalla NS. β -adrenergic receptor mechanisms in heart failure. In Singal PK, Dixon IMC, Beamish RE, Dhalla SN (eds). *Mechanisms of heart failure*. Kluwer Academic Publisher. Boston. 1995.19-35.

Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*. 1996;148:141-149.

Sheridan DJ, McAinsh A, O'Gorman DJ. The coronary circulation in cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22:S18-S28.

Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*. 1997;30:1198-1203.

Shichiri M, Sedivy JM, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 is a potent survival factor for c-myc-dependent apoptosis. *Mol Endocrinol*. 1998;12:172-180.

Shiota N, Fukamizu A, Takai S, Okunishi H, Murakami K, Miyazaki M. Activation of angiotensin II forming chymase in the cardiomyopathic hamster heart. *Journal of Hypertension*.

1997;15:431-440.

Simpson PC, Karns LR, Long CS. An approach to the molecular regulation of cardiac myocyte hypertrophy. In: Chien S (ed.) *Molecular biology of the cardiovascular system*. Malvern, Pa: Lea & Febiger. 1990:53-81.

Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res*. 1982;51:787-801.

Société cardiovasculaire canadienne. Diagnostic et traitement de l'insuffisance cardiaque - un rapport consensuel. *Can J Cardiol* 1994;10:613-631.

Sole MJ, Factor SM. Pathogenesis of stress-induced heart disease. Beamish RE, Panagia V, Dhalla NS (eds), Nijhoff, Boston, MA, 1987, 34-43.

The SOLVD Investigators: Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fraction. *N Engl J Med*. 1992;327:685-691.

Sonnenblick EH, Cheng W, Li B, Kajstura L, Li P, Wolin MS, Olivetti G, Anversa P. Load dependent-induced programmed myocyte cell death. *Circulation*. 1995;99:1-567.

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂ receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995;95:651-657.

Studer R, Reinecke H, Muller B, Holtz J, Just H, Drexler H. Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart: quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1994;94:301-310.

Sugimoto K, Gotoh E, Takasaki I, Ebina T, Iwamoto T, Takisawa T, Shionoiri H, Ishii M. AT₁ receptor antagonist, TCV 116, does not prevent cardiac hypertrophy in salt-loaded Dahl salt

sensitive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:282-286.

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JKM, Wright JW, Hall KL Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pep*. 1992;40:409-419.

Sweet CS, Rucinska EJ. Losartan in heart failure: preclinical experiences and initial clinical outcomes. *Eur H Journal*. 1994;15(D):139-144.

Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, Yamashita K, Masaki T. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 264:7856-7861.

Tallant EA, Higson JT. Angiotensin II activates distinct signal transduction pathways in astrocytes isolated from neonatal rat brain. *Glia* 1997;19:333-342.

Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*. 1996; 97:2891-2897.

Thibault G, Nemer M, Drouin J., Lavigne J.P., Ding J., Charbonneau C., Garcia R., Genest J., Jasmin G., Sole M., Cantin M. Ventricles as a major site of atrial natriuretic synthesis and release in cardiomyopathic hamsters with heart failure. *Circ. Res*. 1989; 65:71-82.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 199;267:1456-1462.

Thuillez C, Richard C, Loueslati H, Auzepy P, Giudicelli JF. Systemic and regional hemodynamic effects of perindopril in congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;15:527-535.

Tiegerstedt R, Bergman PG. Niere und kreislauf. *Scan Arch Physiol*. 1898;8:223.

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JM, Smith RR. Angiotensin II receptors and angiotensin receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993;45:205-251.

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Smith RD. The preclinical basis of the therapeutic evaluation of losartan. *J Hypertens.* 1995;13(1):S1-S13.

Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:8307-8313.

Trippodo N.C., Fox M., Natarajan V., Panchal B.C., Dorso CR, Asaad MM. Combined inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme in cardiomyopathic hamsters with compensated heart failure. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993. 267:108-115.

Tsuruya Y, Ikeda U, Ohta T, Yamamoto K, Seino Y, Ebata H, Hojo Y, Kanbe T, Shimada K. Na, K ATPase gene expression in the cardiomyopathic heart. In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;15-21.

Tsuzuki S, Eguchi S, Inagami T. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT₂) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;228:825-830.

Turker RK. Evidence for a prostacyclin-mediated chronotropic effect of angiotensin II in the isolated cat right atria. *Eur J Pharmacol.* 1982;83:271-275.

Urasawa K, Sato K, Igarashi Y, Kawaguchi H, Yusada H. A mechanism of catecholamine intolerance in congestive heart failure: Alterations in hormone sensitive adenylyl cyclase system of the heart. *Jpn Circ J.* 1992;56:456-461.

Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normals and failing human hearts. *Circ Res.* 1990;66:883-890.

van Meel JCA, Mauz ABM, Wiene W, Diederer W. Pimobendan increase survival of cardiomyopathic hamsters. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13:508-509.

Ver Donck L, Verellen G, Geerts H, Olrich HG, Mutschler E, Borgers M. Altered contractile behaviour of cardiomyopathic hamsters. In Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). *The cardiomyopathic hamster*. Raven Press. New York. 1994;49-55.

Ver Donck L, Wouters L, Oldrich HG, Mutschler E, Borgers M. Nebivolol increase survival in cardiomyopathic hamsters with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991;18, 1-3.

Vermes I, Haanen C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem*. 1994;31:177-246.

Wang L, Eberhard M, Kohler E, Erne P. A specific binding site for angiotensin II(3-8), angiotensin IV, in rabbit cardiac fibroblasts. *J Recept Signal Transduct Res*. 1995;15:517-527.

Walker PR, Sikorska M. Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol*. 1994;72:615-623.

Watkins L, Burton JA, Haber E, Cant JR, Smith FM, Barger AC. The renin-aldosterone system in congestive heart failure in conscious dog. *J Clin Invest*. 1976;57:1606-1617.

Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;82:1849-1865.

Webster WM, Fitzpatrick MA, Hamilton EJ, Nicholls MG, Ikram H, Wells JE. Effect of enalapril on ventricular arrhythmias in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1985;56:566.

Weinberg EO, Schoen FG, Georges D, Kayaya Y, Douglas PS, Litwin SE, Schunkert H, Benedict CR, Lorell BH. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1994;90:1412-1422.

White M, Evan G. The last cut is the deepest. *Nature*. 1995;376:17-18.

Wiemer G, Scholkens BA, Wagner A, Heitsch H, Linz W. The possible role of angiotensin II subtype AT₂ receptors in endothelial cells and ischemic rat heart. *J Hypertens*. 1993;11:234-235.

Willhelm MJ, Lindpainter K, Jin MW, Unger T, Lang RE, Ganten D. Evidence for local regulatory properties of an intrinsic cardiac renin-angiotensin. *Circulation*. 1987;76:340.

Willie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation *J Pathol*. 1987;153:313-316.

Wolny A, Clozel JP, Rein J, Mory P, Vogt P, Turino M, Kiowski W, Fischli W. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathway in the human heart. *Circ Res*. 1997;80:219-227.

Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Bio Chem*. 1997;272:14860-14866.

Wu JN, Edwards D, Berecek KH. Changes in renal angiotensin II receptors in spontaneously hypertensive rats by early treatment with the angiotensin-converting enzyme inhibition captopril. *Hypertension*. 1994;23:819-822.

Wuwong JR, Chiou WJ, Dickinson R, Opgenorth TJ. Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J*. 1997;320:733-737.

Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*. 1987;153:313-316.

Xiang JZ, Linz W, Becker H, Ganten D, Lang RE, Scholkens B, Unger T. Effects of converting enzyme inhibitors: ramipril and enalapril on peptide action and sympathetic neurotransmission in the isolated heart. *Eur J Pharmacol*. 1985;113:215-223.

Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:156-160.

Yamada H, Fabris B, Allen AM, Jackson B, Johnson CI, Mendelsohn AO. Localization of angiotensin converting enzyme in the rat heart. *Circ Res*. 1991;68:141-149.

Yamamura T, Nakamura H, Yamamoto T, Umemoto S, Fujii T, Kobayashi N, Matsuzaki M. Fas expression and apoptosis correlate with cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J*. 1999;63:149-154.

Yamashita T, Nakaya H, Tohse N, Kusaka, Uemura H, Sakuma I, Yasuda H, Kanno M, Kitabatake A. Depressed responsiveness to angiotensin II in ventricular myocytes of hypertrophic cardiomyopathic Syrian hamster. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:1429-1438.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yasaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. 1988. *Nature*;332:411-415.

Yasaki Y, Tsuchimochi H, Kurabayashi M, Komuro I. Molecular adaptation to pressure overload in human and rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1989;21:91-101.

Zhang X, Dostal DE, Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Li P, Huang H, Sonnenblick EH, Meggs LG, Baker MK, Anversa P. Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1995;269:H1791-H1802.

Zhang JH, Stobb JW, Hanesworth JM, Sardinia MF, Harding JW. Characterization and purification of the bovine adrenal angiotensin IV receptor (AT₄) using [¹²⁵I]Benzoylphenylalanine-Angiotensin IV as a specific photolabel. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:416-424.

Zierhut W, Zimmer H-G, Gerbes AM. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res*. 1991;69:609-617.

MANUSCRIPTS PUBLIÉS NON INCLUS DANS LA THÈSE

ANNEXE 1

Effect of Treatment on Survival in an 198 Animal Model of Chronic Heart Failure

Natacha Bastien, BsC, and Chantal Lambert, PhD

Much has been learned regarding the impact of treatment of chronic heart failure with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. ACE inhibition has been shown conclusively to slow the progression of disease and to improve survival in both experimental models and in humans.¹ We are only now beginning to investigate whether treatment with angiotensin II-receptor antagonists will have a comparable impact on patient outcomes in chronic heart failure.

CARDIOMYOPATHY IN THE HAMSTER MODEL

The cardiomyopathic hamster has a genetically determined metabolic defect that results in chronic heart failure, which resembles hypertrophic cardiomyopathy in humans.²⁻⁴ It has been used to evaluate the effects of digitalis, calcium antagonists, α_1 - and β -adrenergic antagonists, ACE inhibitors, and, most recently, angiotensin II-receptor antagonists on left ventricular hypertrophy and other clinical markers of chronic heart failure.² Compared with normal hamsters, the cardiomyopathic hamster has an activated renin-angiotensin system, similar to what is observed in patients with chronic heart failure.^{2,4} Hence, these animals appear to offer a suitable model for evaluating the role of the renin-angiotensin system and its components in chronic heart failure.⁴ Although the exact mechanisms implicated in the pathogenesis of cardiomyopathy in the hamster model are not fully understood, evidence points to a role for circulating and cardiac angiotensin II.^{4,5}

THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM

The renin-angiotensin system has been implicated in the development of hypertension and cardiac hypertrophy.^{5,6} In addition to the classic renin-angiotensin system, which produces circulating angiotensin II, there exists a local, tissue-bound renin-angiotensin system that is expressed in many types of tissue in the body, including the lungs, brain, the vasculature, and cardiac muscle.^{3-5,7} Most of the components of the cardiac renin-angiotensin system appear in myocardium extracts or in isolated myocytes.⁴ Cardiac tissue has been shown to contain renin, angiotensinogen, and ACE, which are capable of synthesizing angiotensin II.^{3,5,7}

Angiotensin II induces hypertrophy in cardiac myocytes.³ There are 2 major angiotensin II-receptor

subtypes: AT₁ and AT₂. Virtually all the known biologic actions of angiotensin II are mediated by the AT₁ receptor. The role of the AT₂ receptor remains elusive, although it may have a cardioprotective effect by inhibiting the response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects.^{4,7} It has also been recently proposed that the AT₂ receptor may exert antihypertrophic effects by inhibiting cell proliferation. In contrast to what is found in other species, only the AT₁ receptor is present and up-regulated in the ventricles of cardiomyopathic hamsters.^{3,4}

THE EFFECTS OF ACE INHIBITION

Research has demonstrated that ACE inhibition decreases ventricular hypertrophy and favorably alters ventricular material properties of cardiomyopathic hamsters.^{2,3} In addition, ACE inhibition with quinapril prevents the progression of left ventricular failure and increases the median probability of survival (Figure 1) in these animals.²

By blocking ACE, ACE inhibitors decrease the formation of angiotensin II. This is assumed to be a major factor in the effectiveness of these agents in treating chronic heart failure. In addition, increased bradykinin activity may contribute to the effectiveness of ACE inhibitors. ACE is identical to kininase II, which catabolizes bradykinin to inactive fragments.⁸ Inhibition of ACE allows for increased production of and increased activity of bradykinin. Bradykinin contributes to endothelial production of nitric oxide and other relaxing factors that counteract the pressor actions of angiotensin II. Bradykinin has also been shown to exert antihypertrophic effects.⁶ Thus, it seems likely that ACE inhibitor-induced accumulation of bradykinin contributes to the beneficial effects of ACE inhibitors.^{6,8}

THE EFFICACY OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR ANTAGONISTS

Controversy exists regarding the benefit of angiotensin II-receptor antagonists in blocking the progression of cardiac hypertrophy or remodeling. Their efficacy may depend on the particular disorder or experimental condition examined.⁹ For example, direct blockade of angiotensin II by a potent angiotensin II-receptor antagonist had only minor effects on hypertension and on cardiac hypertrophy in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats.¹⁰ The investigators concluded that the renin-angiotensin system may not contribute to the development of cardiac hypertrophy in these animals. Long-term angiotensin II-receptor blockade did not regress left ventricular hypertrophy in rats with persistent systolic pressure overload,¹ whereas other studies have shown that long-term ACE inhibition

From the Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Canada.

Address for reprints: Chantal Lambert, PhD, Department of Pharmacology, Université de Montréal Faculty of Medicine, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, H3C 3J7 Canada.

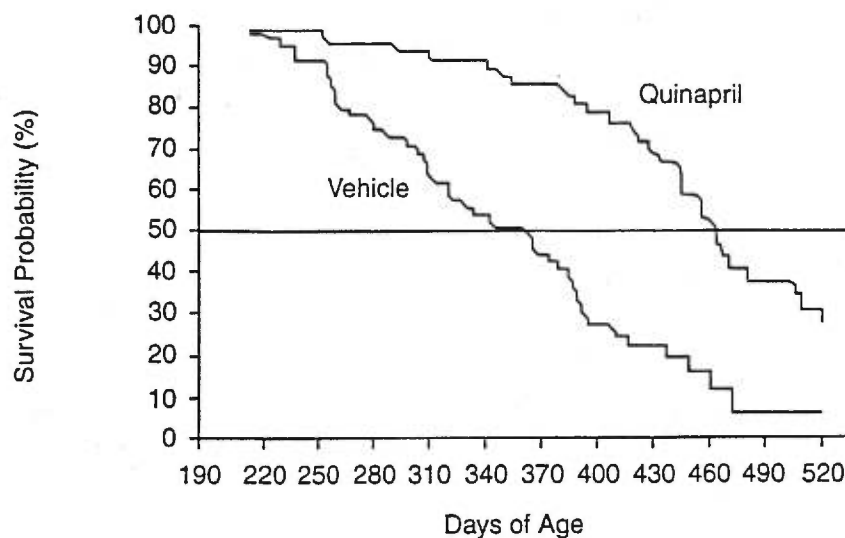


FIGURE 1. Effect of long-term administration of quinapril 100 mg/kg per day on the probability of survival of 146 cardiomyopathic hamsters with chronic heart failure. The age for the median probability of survival was 348 days in the control group compared with 460 days (significantly different; $p < 0.001$) in the group treated with quinapril. (Reproduced with permission from *Circ Res*.²)

regressed left ventricular hypertrophy, normalized survival, and improved left ventricular diastolic and systolic function in that model.¹

Lanza et al⁹ have reported that 3 months of effective AT₁-receptor blockade with L-158,809 did not mitigate the remodeling process in TO-2 cardiomyopathic hamsters, in contrast with the improvement in left ventricular mass previously observed by this group with the ACE inhibitor captopril.¹¹

We have recently completed a study directly comparing the impact of ACE inhibition with angiotensin II-receptor blockade on hypertrophy and survival in cardiomyopathic hamsters. Preliminary results indicate that hamsters that received the ACE inhibitor (quinapril) had a significant decrease in the development of hypertrophy compared with those that received the angiotensin II-receptor antagonist (losartan). Treatment with quinapril significantly increased the probability of survival among cardiomyopathic hamsters compared with animals receiving losartan. Unexpectedly and surprisingly, use of the angiotensin II-receptor antagonist actually decreased the survival rate compared with that in hamsters given placebo and quinapril.

CONCLUSIONS

It can be speculated that the improvement in hypertrophy and in survival seen with ACE-inhibitor treatment in our study resulted from the effects of ACE inhibition of both blocking the formation of angiotensin II and promoting bradykinin activity. As mentioned, the cardiomyopathic hamster is characterized by a lack of angiotensin II AT₂ receptors. Other studies have suggested that at least some of the beneficial effects of angiotensin II-receptor blockers may result from an activation of AT₂ receptors that accompanies AT₁-receptor blockade. Thus, the absence of

AT₂ receptors in the cardiomyopathic hamster might be another possible explanation for the lack of efficacy of AT₁-receptor inhibition in our study.

Long-term clinical trials can be expected to clarify further the effects of angiotensin II-receptor blockers, compared with ACE inhibitors, in patients with chronic heart failure.

- Weinberg EO, Lee MA, Weigner M, Lindpaintner K, Bishop SP, Benedict CR, Ho KKL, Douglas PS, Chafizadeh E, Lorell BH. Angiotensin AT₁ receptor inhibition: effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1997;95:1592-1600.
- Haleen SJ, Weishaar RE, Overhiser RW, Bousley RF, Keiser JA, Rapundalo SR, Taylor DG. Effects of quinapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster: hemodynamic, morphological, and biochemical correlates. *Circ Res* 1991;68:1302-1312.
- Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Upregulation of cardiac angiotensin II AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ Res* 1995;77:1001-1007.
- Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Renin-angiotensin system and the congenital cardiomyopathic hamster. In: Singal PK, Dixon IMC, Beamish RE, Dhalla NS, eds. *Mechanisms of Heart Failure*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1995:203-214.
- Dostal DE, Baker KM. Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends Cardiovasc Med* 1993;3:67-74.
- Linz W, Schölkens BA. A specific B₂-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol* 1992;105:771-772.
- Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂ receptor causes attenuated response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 1998;101:527-535.
- Bao G, Gohlke P, Qadri F, Unger T. Chronic kinin receptor blockade attenuates the antihypertensive effect of ramipril. *Hypertension* 1992;20:74-79.
- Lanza GM, Scott MJ, Davison G, Hall CS, Christy DH, Miller JG, Wickline SA. Angiotensin II receptor blockade in Syrian hamster (TO-2) cardiomyopathy does not affect microscopic cardiac material properties: implications for mechanisms of tissue remodeling. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:521-529.
- Sugimoto K, Gotoh E, Takasaki I, Ebina T, Iwamoto T, Takizawa T, Shionoiri H, Ishii M. AT₁ receptor antagonist, TCV 116, does not prevent cardiac hypertrophy in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:282-286.

11. Davison G, Hall CS, Miller JG, Scott M, Wickline SA. Cellular mechanisms of captopril-induced matrix remodeling in Syrian hamster cardiomyopathy. *Circulation* 1994;90:1334-1342.

QUESTIONS AND ANSWERS: CHANTAL LAMBERT, PhD

Question: You mentioned the lack of angiotensin II type 2 (AT₂) receptors in the cardiomyopathic hamster. How do you think this characteristic might affect the appropriateness of this model as a surrogate for chronic heart failure in human subjects?

Dr. Lambert: Due to the lack of AT₂²⁰⁰ receptors, the results obtained in the cardiomyopathic hamster using agonists/antagonists of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors might not be predictive of the human situation. However, this certainly does not change the interpretation of all the results that have previously been obtained with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and other agents. To the best of my knowledge, the cardiomyopathic hamster has always been considered an experimental model of chronic heart failure that can be extrapolated to the clinical situation, at least from the pharmacologic point of view.

ANNEXE 2

Angiotensin II receptor expression in the conduction system and arterial duct of neonatal and adult rat hearts

Natacha R. Bastien^a, Gladys M. Ciuffo^b, Juan M. Saavedra^b, Chantal Lambert^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, Québec, Canada

^b Section on Pharmacology, Laboratory of Clinical Science, National Institute of Mental Health, 9000 Rockville Pike, Building 10, Room 2D-45, Bethesda, MD 20892, Canada

Received 23 August 1995; revised 27 December 1995; accepted 7 January 1996

Abstract

Paralleling the classic circulating system, recent evidence has demonstrated the presence of a cardiac renin-angiotensin system, as well as the synthesis of angiotensin II in the heart. Two receptors for angiotensin II have been identified and classified as AT₁ and AT₂. The proportions of these receptor subtypes vary with the tissues, species and stage of development. From the results of other studies, it might be generalized that the expression of angiotensin II receptors and the proportion of AT₂ receptor subtype are much higher in fetal and neonatal tissues than in the same tissues from an adult. The aim of this study was to specifically evaluate the AT₁/AT₂ ratio in the neonatal and adult conduction systems of rat hearts by means of quantitative autoradiography. In the neonatal hearts, angiotensin II binding sites were highly concentrated in the vasculature, arterial duct, and conduction system, whereas their concentrations were barely detectable in the myocardium. Incubation with selective angiotensin II receptor ligands (losartan and CGP 42112) revealed that AT₂ was the major subtype in vasculature (86 ± 3%) and conduction system (73 ± 4%). In the adult conduction system, the total expression of angiotensin II receptors was greatly reduced meanwhile the AT₁ receptors represented the major proportion of the binding sites (80 ± 3%). Our results demonstrated that the pattern of angiotensin II receptor expression in the conduction system of the rat heart is developmentally regulated. We suggest, as others have already, that the renin-angiotensin system plays a role during the early stage of cardiac development.

Keywords: Angiotensin II receptor; Heart conduction system; Arterial duct; Neonatal and adult tissue; Quantitative autoradiography

1. Introduction

Paralleling the classic circulating system, recent biochemical and functional evidence has demonstrated the presence of a cardiac renin-angiotensin system, as well as the synthesis of angiotensin II in the heart [1]. In adult heart, angiotensin II receptors have been described in the atria, the ventricles, and the medial layer of the larger coronary vessels. A large number of receptors are also associated with intracardiac ganglia and parasympathetic nerves whereas other sites are located in the conduction system [2,3]. The hypothesis that a functionally active cardiac renin-angiotensin system exists in fetal and neonatal animals is supported by the localization of angioten-

sinogen and renin transcripts in the cardiac chambers of neonatal rat hearts [4].

The angiotensin II receptors have been classified into AT₁ and AT₂ subtypes, based on their affinities for specific receptor ligands and their sensitivity to reducing agents. AT₁ receptors mediate all the known physiologic effects of angiotensin II, whereas a physiologic role associated with the AT₂ receptors is still to be established [5,6]. The predominant receptor subtype, as well as the precise proportion of the sites that have been reported vary, depending on the tissues, the species and the stage of development. From the results of studies using autoradiography, radioligand binding assays, and functional assays, it might be generalized that the proportion of AT₂ receptors is much higher in fetal and neonatal tissues than in the same tissues from an adult animal [6,7]. Using quantitative autoradiography at three developmental stages, Viswanathan et al. [8] have reported a marked increase in angiotensin II receptor concentrations in fetal and neonatal

* Corresponding author. Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. Tel: +1 (514) 343-6506; fax: +1 (514) 343-2291; E-mail: lambec@ere.umontreal.ca

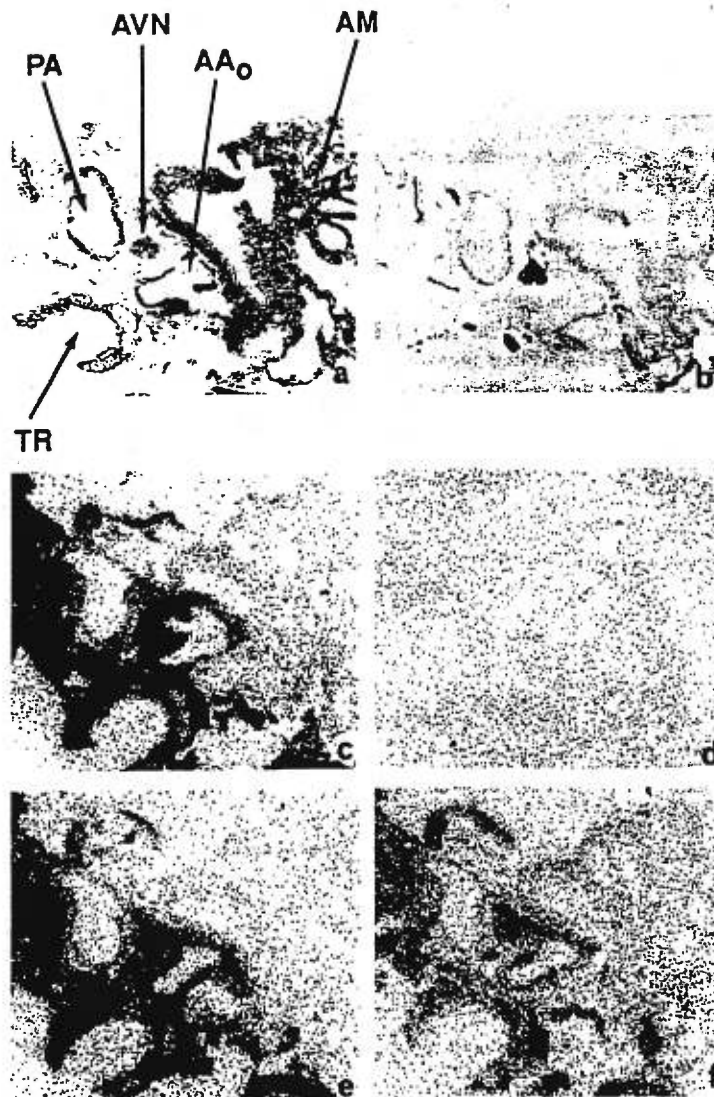
arta. These authors demonstrated that around 80% of angiotensin II receptors expressed in the aorta of the neonatal and 2-week-old rats are of the AT_2 subtype, whereas in the adult approximately 70% of the receptors are of the AT_1 subtype.

The purpose of this study was to identify specific areas in the cardiac conduction system and to determine AT_1/AT_2 receptor density in neonatal and adult rat hearts, using autoradiography. As already proposed by other investigators, the presence of AT_2 receptors in early stages of development suggests that these receptors play a role in the process of differentiation.

2. Material and methods

2.1. Animals and preparation of tissues

Sprague-Dawley rats purchased from Zivic Miller (Zelienople, PA, USA) were used in this study. Male and 18-day-pregnant rats were kept under standard laboratory conditions using a 12:12 h light/dark schedule with the lights going on at 06:00 h. Male (8-week-old) and neonatal (1-day-old) rats were killed between 09:00 and 11:00 h. The hearts were immediately removed by sectioning them at the junction of the superior vena cava and the right atrium, and beyond the initial segment of the aorta. They



Autoradiographic localization and subtype characterization of angiotensin II binding sites in neonatal (1-day-old) rat heart. (a) Haematoxylin and Acetylcholinesterase staining; (b) Acetylcholinesterase staining: Consecutive sections to a and b were incubated with 5×10^{-10} M of [125 I]Sar¹-angiotensin II; (c) alone binding; (d) with 1×10^{-6} M of unlabelled angiotensin II (nonspecific binding); (e) with 1×10^{-5} M of losartan (AT_2 receptors); (f) with 1×10^{-7} M of CGP 42112 (AT_1 receptors). AM, atrial myocardium; AAo, ascending aorta; AVN, atrioventricular node; PA, pulmonary artery; TR, tricuspid valve. $\times 20$.

were washed for 1 min in 3 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer, pH 7.4, containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂ and 11 mM glucose at room temperature. The adult hearts were dissected under a stereomicroscope so as to isolate the specific area of the atrioventricular node [2]. The tissues were then frozen by immersion in isopentane at -30°C and stored at -70°C for no longer than 7 days.

Dissected neonatal and adult hearts containing vascular, myocardial and conductive tissues were cut into 16 μm thick sections in a cryostat at -20°C . The haematoxylin and eosin staining was done on frozen sections to identify the cardiac structures, whereas the acetylcholinesterase staining was done to localize the cardiac conduction system. Sections were incubated for 60 min at room tempera-

ture in 65 mM sodium hydrogen maleate buffer, pH 6.0, containing 2 mM acetylthiocholine iodide, 5 mM sodium citrate, 3 mM copper sulfate and 0.5 mM potassium ferricyanide [9]. The area of intense positive acetylcholinesterase staining found on examination under a light microscope was identified as the atrioventricular node. Consecutive unstained sections to this area were thaw mounted onto gelatin-coated glass slides and placed under a vacuum at 4°C for no longer than 24 h prior to incubation.

2.2. Quantitative autoradiography

Sections were labelled in vitro using [¹²⁵I]Sar¹-angiotensin II (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA; iodinated by DuPont New England Nuclear, Willington,

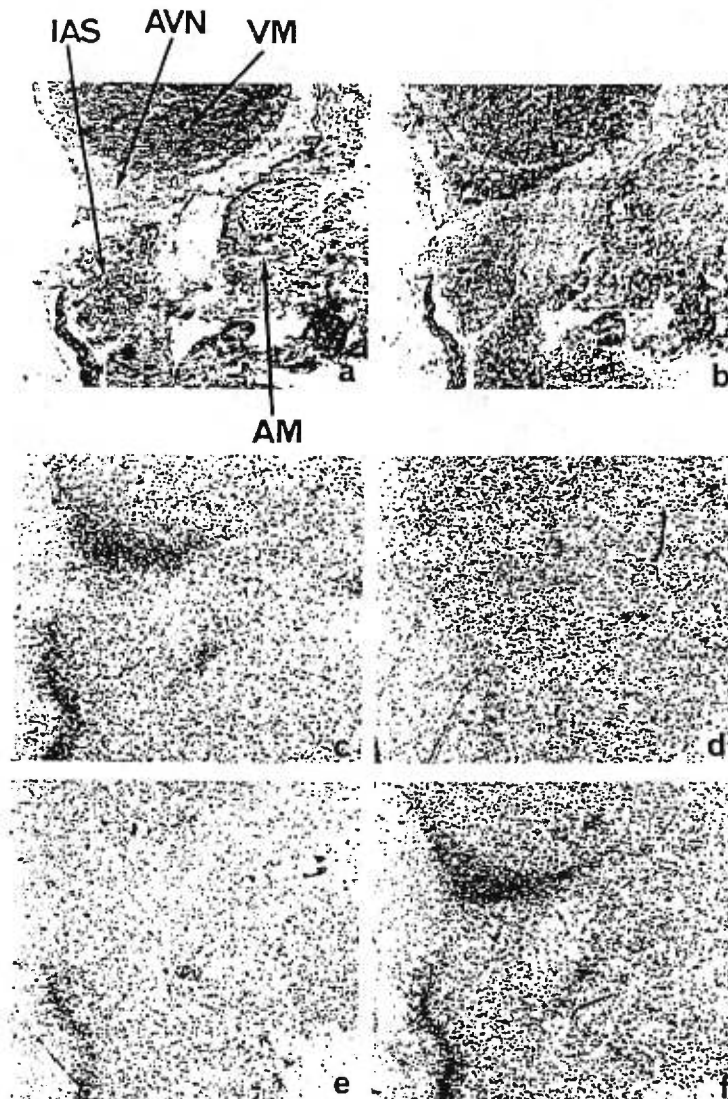


Fig. 2. Autoradiographic localization and subtype characterization of angiotensin II binding sites in adult (8-week-old) rat heart. (a) Haematoxylin and eosin staining; (b) Acetylcholinesterase staining; Consecutive sections to a and b were incubated with 5×10^{-10} M of [¹²⁵I]Sar¹-angiotensin II; (c) alone (total binding); (d) with 1×10^{-6} M of unlabelled angiotensin II (nonspecific binding); (e) with 1×10^{-5} M of losartan (AT₂ receptors); (f) with 1×10^{-7} M of CGP 42112 (AT₁ receptors). AM, atrial myocardium; AVN, atrioventricular node; IAS, interatrial septum; VM, ventricular myocardium; ($\times 20$).

DE, USA, specific activity 2200 Ci/mmol) as the ligand [10]. Consecutive sections were preincubated for 15 min at 22°C in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 120 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 0.005% bacitracin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 0.2% proteinase-free bovine serum albumin (Sigma). The sections were then placed in fresh buffer containing the ligand and incubated for 120 min at room temperature. After incubation, the slides were washed 4 times for 1 min in fresh ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, one time for 30 s in distilled ice-cold water and then dried under a cold stream of air. To identify AT₁ and AT₂ receptors, consecutive sections were incubated with 5×10^{-10} M of [¹²⁵I]Sar¹-angiotensin II, a concentration close to the dissociation constant value (K_d), in presence of either 1×10^{-5} M losartan (DuPont, Willington, DE) or 1×10^{-7} M CGP 42112 (Ciba-Geigy, Basle, Switzerland) [11]. Nonspecific binding was determined by incubating a consecutive section with 5×10^{-6} M of unlabelled angiotensin II (Peninsula).

In another experiment, angiotensin II AT₂ receptors were labelled with 2×10^{-10} M [¹²⁵I]CGP 42112, used as a ligand [12]. Non-specific binding was determined by adding 1×10^{-6} M of unlabelled CGP 42112 or 1×10^{-5} M of unlabelled angiotensin II using consecutive sections. The procedures used for the incubation and washing were as described above.

3.3. Computer microdensitometry and statistical analysis

The dry labelled sections together with a set of ¹²⁵I-standards (Amersham Company, Arlington Heights, IL) were apposed against ³H-Hyperfilm (Amersham) in X-ray

cassette (CGR Medical Corporation, Baltimore, MD). The films were developed for 4 min with D19 Kodak developer at 4°C. The optical densities of the autoradiograms were determined by computerized microdensitometry (NIH Image Program written by W. Rasband). The results were expressed in fmol/mg protein by comparison with the ¹²⁵I-standards [10]. The angiotensin II binding sites in vasculature, myocardium as well as specific areas of the conduction system in the neonatal and adult hearts were quantified and compared. Data are expressed as mean \pm standard error (SEM) and were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test with multiple comparisons. The critical level of significance was set as $P \leq 0.05$.

3. Results

In neonatal rat hearts, acetylcholinesterase activity was found throughout the cardiac tissues, but it was highly concentrated in very specific areas as shown by strong positive staining (Fig. 1b). These areas, localized near the vasculature, were identified as the conduction system. As expected, strong acetylcholinesterase activity, corresponding to the atrioventricular node, was also noted in the isolated tissues of the adult hearts (Fig. 2b).

In neonatal and adult myocardium, the density of the detected angiotensin II binding sites could not be reliably quantified, since the concentrations were below the detection limit of our technique (Fig. 1c–f and Fig. 2c–f).

Consistent with the recent report of Hunt et al. [13], in neonatal hearts the highest density of angiotensin II binding sites was localized on the cardiac vasculature (903 ± 99

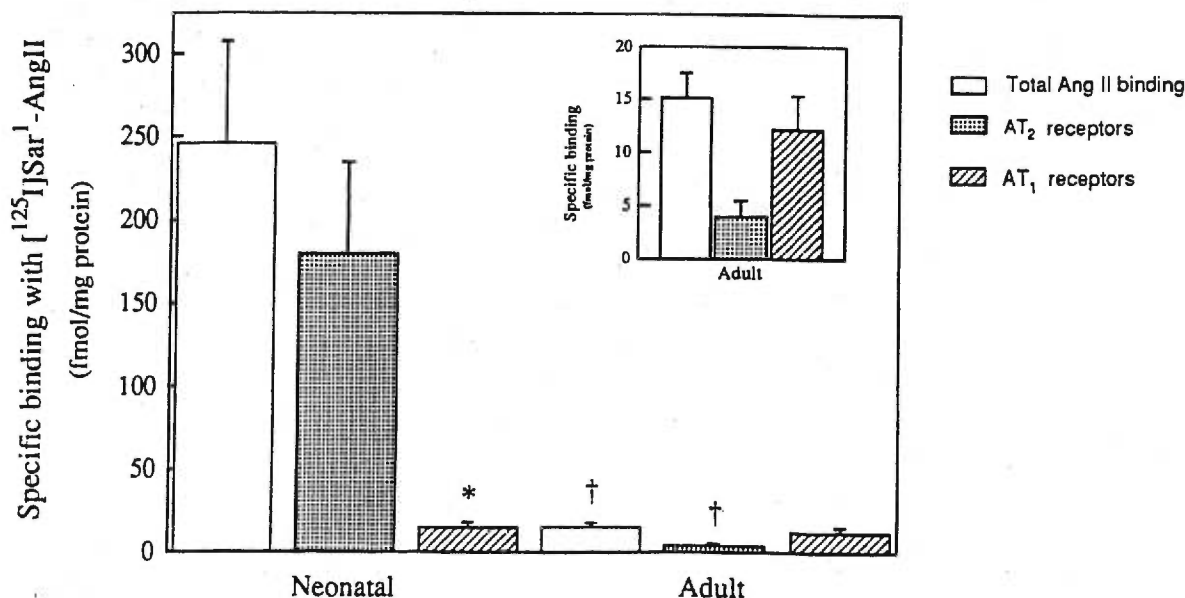


Fig. 3. Quantification of [¹²⁵I]Sar¹-angiotensin II binding sites in the atrioventricular node of the neonatal and adult rat hearts. Mean values obtained are expressed in fmol/mg protein from 7 neonatal and 5 adult hearts. Vertical bars represent SEM, * $P \leq 0.05$ compared with total binding in the neonatal group; † $P \leq 0.05$ compared with the corresponding neonatal binding.

fmol/mg protein for total binding, $n = 10$). High density binding sites were also found in the strong positive acetylcholinesterase stained areas corresponding to the atrioventricular node (246 ± 62 fmol/mg protein, $n = 7$), (Fig. 1c and Fig. 3). Fig. 2c and Fig. 3 show that compared with the neonatal hearts, the density of angiotensin II receptors in the conduction system was greatly reduced in adults (15 ± 2 fmol/mg protein, $n = 5$).

The binding of [125 I]Sar¹-angiotensin II to the cardiac vasculature and the conduction system in neonatal animals was only slightly displaced by losartan (decreases of $14 \pm 3\%$ and $26 \pm 4\%$ of total binding, respectively), suggesting that AT₂ receptors represent the major proportion of angiotensin II receptors in the neonatal hearts (Fig. 1e). In agreement with these results, low concentrations of AT₁ receptors were detected in both the vasculature and conduction system (79 ± 23 and 14 ± 3 fmol/mg protein). Most of the [125 I]Sar¹-angiotensin II binding was displaced by CGP 42112 (Fig. 1f), indicating a predominance of AT₂ receptors.

In the atrioventricular nodes of the adult hearts, the incubation of consecutive sections in the presence of selective AT₁ and AT₂ antagonists, demonstrated that the major proportion of angiotensin II receptors belongs to AT₁ subtype (Fig. 2f and Fig. 3). The AT₂ receptor density was near the detection limit of our technique (4 ± 2 fmol/mg

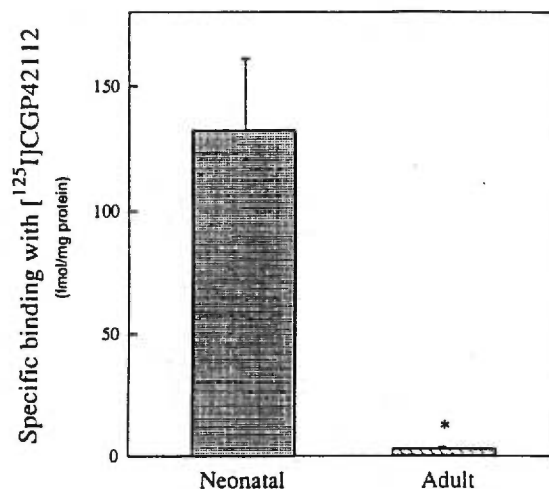


Fig. 5. Quantification of [125 I]CGP 42112 binding sites in the positive acetylcholinesterase stained areas of the neonatal and adult rat hearts. Mean values are expressed in fmol/mg protein from 7 neonatal and 5 adult hearts. Vertical bars represent SEM. * $P \leq 0.05$ compared with the total neonatal binding.

protein) (Fig. 2e). The presence of AT₂ receptors in the adult conduction system is therefore questionable.

The analysis of the binding sites of [125 I]CGP 42112 confirmed that high concentrations of AT₂ receptors are present in the vasculature and conduction system of the

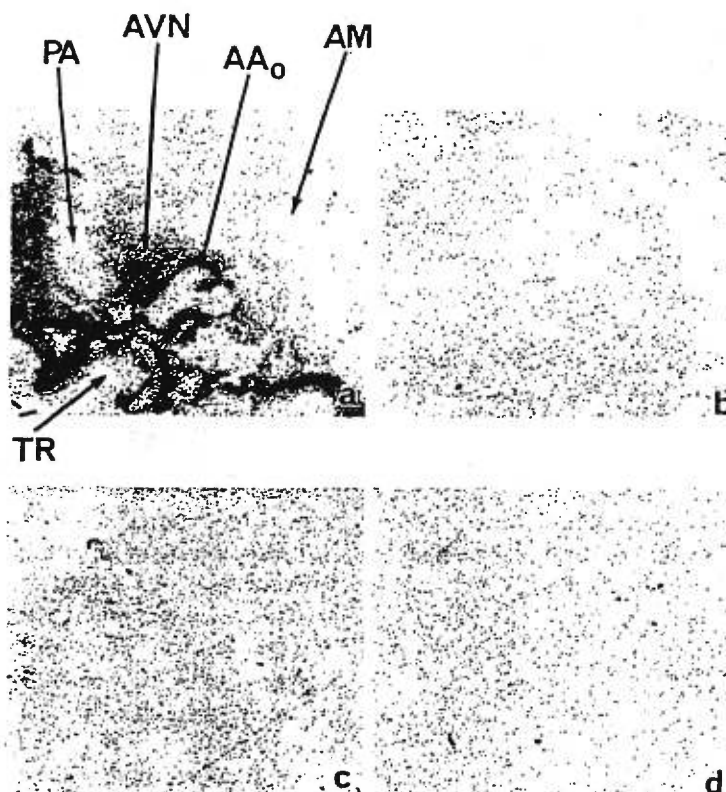


Fig. 4. Autoradiographic localization of AT₂ receptors in neonatal (a–b) and adult (c–d) rat hearts. Consecutive sections to f described in Fig. 1 and Fig. 2 were incubated with 2×10^{-10} M of [125 I]CGP 42112. (a,c) alone (total binding) and (b,d) with 1×10^{-6} M of unlabelled CGP 42112. AM, atrial myocardium; AAo, ascending aorta; AVN, atrioventricular node; PA, pulmonary artery; TR, trachea; ($\times 20$).

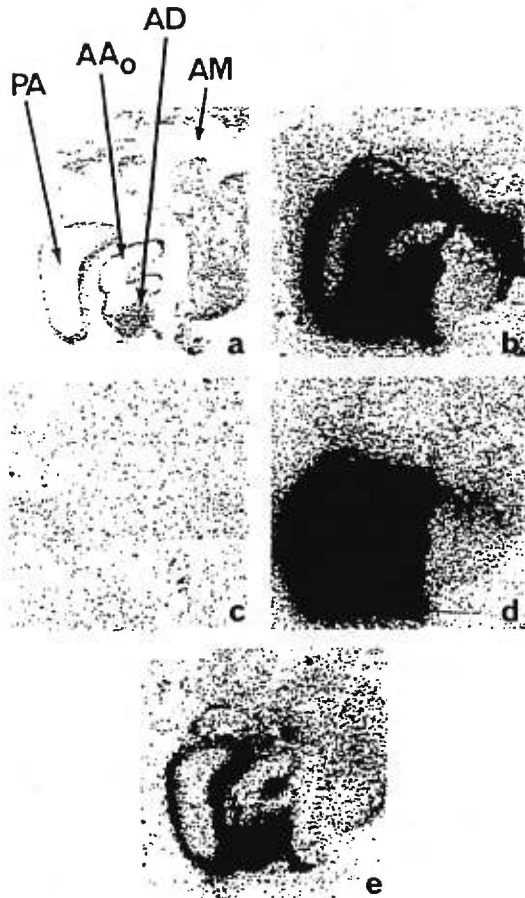


Fig. 6. Autoradiographic localization and subtype characterization of angiotensin II binding sites in neonatal (1-day-old) rat heart. (a) Haemacylin and eosin staining; Consecutive sections to a were incubated with $<10^{-10}$ M of [125 I]Sar 1 -angiotensin II; (b) alone (total binding); (c) with 1×10^{-6} M of unlabelled angiotensin II (nonspecific binding); (d) with 1×10^{-5} M of losartan (AT $_2$ receptors); (e) with 1×10^{-7} M of [3P] 42112 (AT $_1$ receptors). AD, arterial duct; AM, atrial myocardium; Ao, ascending aorta; PA, pulmonary artery; ($\times 20$).

neonatal hearts (536 ± 45 and 130 ± 30 fmol/mg protein, respectively, $n = 7$) (Figs. 4 and 5). Again very small numbers of AT $_2$ receptors were detected in the conduction system of adult hearts (3 ± 1 fmol/mg protein, $n = 5$) (Figs. 4 and 5). This is in agreement with the results of [125 I]Sar 1 -angiotensin II binding to AT $_2$ receptors in all tissues at both ages studied.

Finally, intriguingly and as previously observed in adults [Allen et al. [14], high density of angiotensin II binding sites was detected in the arterial duct of neonatal hearts ($n = 4$) (Fig. 6). Both AT $_1$ and AT $_2$ receptors were present in this specific area but with a clear predominance of AT $_2$ receptors.

Discussion

Several recent findings have provided evidence that local renin-angiotensin systems exist in many organs that

regulate cardiovascular homeostasis such as the blood vessels, kidneys, brain and heart. In cardiac tissue, the presence of almost all the components of the renin-angiotensin system has been reported in different experimental models [5]. Besides the known physiologic actions of this system in the regulation of blood pressure, fluid volume and electrolyte balance, it is now well recognized that angiotensin II might have a pronounced influence on cardiac function. Among other hypotheses, it has been suggested that angiotensin II may modulate heart chronotropy [15]. The last possibility is supported by numerous experimental demonstrations: (1) angiotensin II increased the spontaneous contractile frequency of cultured neonatal rat cardiomyocytes [16]; (2) angiotensin II generated a dose-dependent chronotropic effect in isolated canine atria [17]; and (3) the heart rate was significantly increased with angiotensin II injected directly into the sinus node artery of anaesthetized dogs treated with β -blockers [18]. These observations are in agreement with the localization by Saito et al. [2] of specific angiotensin II binding sites on the sinoatrial node, the atrioventricular node as well as on the vagus ganglia of rat hearts. In accordance with these previous reports, our results showed that in neonatal and adult rat hearts, angiotensin II binding sites were highly localized in the atrioventricular node, whereas their concentrations were barely detectable throughout the myocardium.

It has been reported by Wallace et al. [19] that during the late gestation and the first postnatal days of the rat, there is a marked increase in the circulating renin-angiotensin system activity. Following birth, these authors observed that the plasma renin activity, as well as the plasma renin and angiotensin II concentrations were significantly increased. The maximum plasma renin activity and concentrations were noted after 2–3 weeks of age, and thereafter rapidly decreased to reach normal adult values in 6 weeks. In these animals, a 4-fold augmentation in plasma angiotensin II concentrations was also observed with a maximum at 4–5 weeks followed by a decrease at 6–8 weeks of age. In another study using guinea-pigs, an activation of the renin-angiotensin system has been reported before birth as demonstrated by the increases in plasma renin and angiotensin converting enzyme concentrations. The concentrations increased gradually in the last days of gestation (between 40 and 70 days) and rapidly decreased within a few days after birth to reach normal adult values [20].

Also during late gestation, the presence of very high concentrations of angiotensin II binding sites in several tissues such as skeletal muscles, vascular and connective tissues has been demonstrated in rat by *in vitro* autoradiographic analyses [7,8,21]. As already mentioned for the activity of the circulating renin-angiotensin system, these important concentrations were maintained until birth and then dramatically decreased within 1 day. In these fetal and neonatal rat tissues, the angiotensin II receptors were

predominantly of the AT₂ subtype, whereas very low density was related to AT₁ subtype [7,8,22,23].

In the present study, we evaluated the angiotensin II receptor density in neonatal (1-day-old) and adult (8-week-old) rat hearts. Consistent with previous reports, in neonatal hearts, the expression of angiotensin II receptors was very high whereas the binding sites were highly concentrated in the vasculature and in the conduction system and were of the AT₂ subtype. AT₁ receptors were also present, but at very low concentrations. In contrast, in the adult hearts, a decrease in the expression of angiotensin II receptors was observed and the binding sites located in the conduction system were mainly of the AT₁ subtype as already described by Saavedra et al. [24]. Contrasting with our results, Sechi et al. [3] have reported an equal distribution between AT₁ and AT₂ receptors in the atrioventricular node of adult rat hearts. These divergent results might be explained by differences in methods of quantification.

We observed a high density of angiotensin II binding sites in the arterial duct of neonatal hearts. During mammalian fetal life, the arterial duct, connects the pulmonary trunk with the aorta. It is essentially active, since it allows most of the right ventricular output to bypass the unexpanded lungs [25]. Shortly after birth, closure of the arterial duct occurs via two main processes: the formation of intimal cushions and the constriction of the smooth muscle cells [26]. The mechanisms by which oxygen tension triggers this constrictive response as well as the pressor agents implicated are still under investigation [27]. The finding of high density of angiotensin II receptors in the arterial duct of neonatal hearts support the hypothesis that angiotensin II has a role in the events leading to the closure of the arterial duct.

Our results demonstrated that in the vasculature and in the specialised conduction system of the heart, the AT₂ receptors are developmentally regulated. The observed increases in the expression of functional angiotensin II receptors, as well as, the activation of the circulating and tissular renin-angiotensin systems in the late gestation and the first few days following birth, suggest that this system plays a role during the early stage of cardiac development. Supporting this hypothesis, Aceto and Baker [28] demonstrated that the incubation of embryonic chick cardiac cell preparations with angiotensin II significantly increased total protein concentration and protein synthesis. The physiological role of the AT₂ receptors in the conduction system of the heart remains obviously to be elucidated.

We have recently demonstrated, using an anaesthetized canine model, that angiotensin II exerts a significant chronotropic effect that is mediated via AT₁ receptors located in the region of the sinoatrial node. This effect was independent of the adrenergic system and it was decreased by the inhibition of the production of protein kinases and by the blockade of the voltage-sensitive L-type Ca²⁺ channels [29]. It is obviously beyond the scope of this study to extrapolate the physiological and/or pathological

roles of the AT₁ receptors in the conduction system of the adult hearts and further studies are certainly needed to elucidate this point. Nevertheless and despite the low density of AT₁ receptors retrieved, it is very tempting to postulate, as other investigators have, that the renin-angiotensin system, via angiotensin II, is implicated in the control of heart rate.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Mohan Viswanathan for his expert advice and critical review of the manuscript. Mr. Jean-Pierre Boisvert is acknowledged for his constant support. This work was supported by grants from Medical Research Council of Canada, National Institute of Health and Merck Frosst Canada.

References

- [1] Freed, M.I., Ilson, B.E., Shusterman, N.H. and Jorkasky, D.K., Therapeutic applications of angiotensin II antagonists. In R.R. Ruffolo (Ed.), *Angiotensin II Receptors*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1994, pp. 121–154.
- [2] Saito, K., Gutkind, J.S. and Saavedra, J.M., Angiotensin II binding sites in the conduction system of the rat hearts. *Am. J. Physiol.*, 253 (1987) H1618–H1622.
- [3] Sechi, L.A., Griffin, C.A., Grady, E.F., Kalinyak, J.E. and Schambelan, M., Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ. Res.*, 71 (1992) 1482–1489.
- [4] Dostal, D.E., Rothblum, K.N., Chermis, M.J., Cooper, G.R. and Baker, K.M., Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in the neonatal rat heart. *Am. J. Physiol.*, 263 (1992) C838–C850.
- [5] Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.M. and Smith, R.D., Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, *Pharmacol. Rev.*, 45 (1993) 205–251.
- [6] Edwards, R.M. and Ruffolo, R.R., Angiotensin II receptor subclassification. In R.R. Ruffolo (Ed.), *Angiotensin II Receptors*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1994, pp. 11–32.
- [7] Tsutsumi, K., Viswanathan, M., Stromberg, C. and Saavedra, J.M., Angiotensin II receptor subtypes in fetal tissues of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology*, 129 (1991) 1075–1082.
- [8] Viswanathan, M., Tsutsumi, K., Fernando, F.M.A. and Saavedra, J.M., Change in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179 (1991) 1361–1367.
- [9] Karnovsky, M.J., The localization of cholinesterase activity in rat cardiac muscle by electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 23 (1964) 217–232.
- [10] Nazarali, A.J., Gutkind, J.S. and Saavedra, J.M., Calibration of ¹²⁵I-polymer standards with ¹²⁵I-brain paste standards for use in quantitative receptor autoradiography. *J. Neurosci. Methods*, 30 (1989) 247–253.
- [11] Tsutsumi, K., Viswanathan, M., Stromberg, C. and Saavedra, J.M., Type-1 and type-2 angiotensin II receptors in fetal rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 198 (1991) 89–92.
- [12] Heemskerk, F.M.J., Zorad, S., Seltzer, A. and Saavedra, J.M., Characterization of brain angiotensin II AT₂ receptor subtype using [¹²⁵I] CGP 42112A. *NeuroReport*, 4 (1993) 103–105.

- [13] Hunt, R.A., Ciuffo, G.M., Saavedra, J.M. and Tucker, D.C., Quantification and localization of angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the developing rat heart. *Cardiovasc. Res.*, (1995) in press.
- [14] Allen, A.M., Yamada, H. and Mendelson, F.A.O., In vitro autoradiographic localization of binding to angiotensin receptors in the rat heart. *Int. J. Cardiol.*, 25 (1990) 25–33.
- [15] Dostal, D.E. and Baker, K.M., Evidence of a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing heart. *Trends Cardiovasc. Med.*, 3 (1993) 67–74.
- [16] Allen, S.I., Cohen N.M., Dhallan, R.S., Gaa, S.T., Leberer, W.G. and Rogers, T.B., Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: Insights into the underlying biochemical mechanisms. *Circ. Res.*, 62 (1987) 524–534.
- [17] Kobayashi, M., Furukawa, Y. and Chiba, S., Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 50 (1978) 17–25.
- [18] Lambert, C., Godin, D., Fortier, P. and Nadeau, R., In vivo direct effects of angiotensins I and II of the canine sinus node. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 69 (1991) 389–392.
- [19] Wallace, K.B., Hook, J.B. and Bailie, M.D., Postnatal development of the renin-angiotensin system in rats. *Am. J. Physiol.*, 238 (1980) R432–R437.
- [20] Raimbach, S.J. and Thomas, A.L., Renin and angiotensin converting enzyme concentrations in the fetal and neonatal guinea-pig. *J. Physiol.*, 423 (1989) 441–451.
- [21] Millan, M.A., Carvallo, P., Izumi, S.I., Zemel, S., Catt K.J. and Aguilera, G., Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus. *Science*, 244 (1989) 1340–1342.
- [22] Grady, F.E., Sechi, L.A., Griffin, C.A., Schambelan, M. and Kalinyak J.E., Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.*, 88 (1991) 921–933.
- [23] Ciuffo, G.M., Viswanathan, M., Seltzer, A.M., Tsutsumi, K. and Saavedra J.M., Glomerular angiotensin II receptor subtypes during development of rat kidney. *Am. J. Physiol.*, 265 (1993) F264–F271.
- [24] Saavedra, J.M., Viswanathan, M. and Shigematsu, K., Localization of angiotensin AT₁ receptors in the rat heart conduction system. *Eur. J. Pharmacol.*, 235 (1993) 301–303.
- [25] Heymann, M.A. and Rudolph, A.M., Control of the ductus arteriosus. *Physiol. Rev.*, 55 (1975) 62–79.
- [26] Slomp, J., van Munsteren, J.C., Poelmann, R.E., de Reeder, E.G., Bogers, A.J.J.C. and Gitterberger-de Groot, A.C., Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Athero*, 93 (1992) 25–39.
- [27] Cocceani, F., Kelsey, L. and Seidlitz, E., Evidence for an effector role of endothelin in closure of the ductus arteriosus at birth. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70 (1992) 1061–1064.
- [28] Aceto, J.F. and Baker, K.M., [Sar¹]angiotensin II receptor mediate stimulation of protein synthesis in chick heart cells. *Am. J. Physiol.*, 258 (1990) H806–H813.
- [29] Lambert, C., Mechanisms of angiotensin II chronotropic effect in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.*, 115 (1995) 795–800.